

Candida Türlerini Tanımlayan Bir Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Geliştirilmesi

Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for the Identification of *Candida* Species

Harun AĞÇA¹, Burcu DALYAN CİLO¹, Gülşah Ece ÖZMERDİVEN¹, Sezcan SAĞLAM¹, Beyza ENER¹

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

¹ Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Turkey.

* Bu çalışma, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (4-7 Haziran 2014, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 25.08.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.01.2015

ÖZ

Candida türleri, nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir sebebi olup, kan kültürlerinde en sık izole edilen dördüncü etkidir. Kan kültürlerinden en sık izole edilen türün *Candida albicans* olmasına karşın, albicans-dışı türlerin görülme sıklığı da giderek artmaktadır. *Candida* türlerinde antifungal duyarlılık paternleri değişken olabildiğinden albicans-dışı türlerin hızlı tanısı, tedavide kullanılacak antifungal ilaçların belirlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, sık rastlanılan *Candida* türlerini hızlı bir şekilde kan kültürü örneklerinden saptayabilen, tanımlayabilen ve kantitasyon yapabilen bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) testinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya, Haziran-Kasım 2013 döneminde laboratuvarımızda pozitif sonuç alınan 50 ardışık BACTEC (Beckton Dickinson, ABD) şişesi dahil edilmiştir. Kalite kontrolü amacıyla Sabouraud dekstroza agarda üretilen *Candida* spp. standart suşları (*C.albicans* ATCC 10231, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.tropicalis* ATCC 1021, *C.krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.dubliniensis* CD36) kullanılmıştır. Ayrıca *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üreyen BACTEC şişeleri çapraz reaktivitenin araştırılması amacıyla çalışılmıştır. DNA izolasyonu, ticari bir kit (Zymo Research, ABD) ile yapılmış; *Candida* türlerine ait 18S rRNA bölgesini hedef alan primer ve probolar kullanılarak Rt-PCR, LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı; 20 µl hacimde 2 µl DNA, 2 µl LightCycler Fast Start DNA Master Probe (Roche Diagnostics, Almanya), 2 µl MgCl₂ (5 mmol), 2 µl 10x PCR tamponu (Roche Diagnostics, Almanya), 0.5 µl her bir primerden (0.01 nmol/µl) ve 1 µl prob 1 ve 2 (0.1 µmol/µl)

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Harun Ağca, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 16059 Görükle, Bursa, Türkiye, **Tel (Phone):** +90 224 295 4113, **E-posta (E-mail):** drharunagca@yahoo.com

(TibMolBiol, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon döngüsü; 95°C'de 10 dk sonrasında 95°C'de 10 sn, 62°C'de 10 sn ve 72°C'de 20 sn'den oluşan 50 döngülük bir program ile uygulanmış; 50 döngü sonrasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Bu amaçla, ürünler önce 50°C'de 30 sn bekletilmiş ve ardından 80°C'ye kadar 0.1°C/sn artışla ısıtılarak eş zamanlı floresans ölçümü yapılmıştır. Kantitasyon için *C.albicans* ATCC 10231 suşundan hazırlanmış olan 3×10^5 ile 3×10^2 ng/μl arasındaki seri dilüsyon örnekleri kullanılmıştır. Test sonuçlarını karşılaştırmak için, tüm suşlar ayrıca dizi analizi ve geleneksel yöntemlerle de tanımlanmıştır. Çalışmamızda geliştirilen Rt-PCR testi ile tüm standart suşlar ve hasta örneklerinden izole edilen suşlar çoğaltılmış, tanımlanmış ve kantite edilmiştir. Hasta örneklerinin 26'sında *C.parapsilosis*, 15'inde *C.glabrata*, 6'sında *C.albicans* ve 3'ünde *C.tropicalis* olmak üzere toplam 50 suş saptanmış ve tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçların, geleneksel yöntemler ve dizi analizi sonuçları ile tam uyumlu olduğu gösterilmiş ve geliştirdiğimiz testin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, sık görülen *Candida* suşlarını saptamak, tanımlamak ve kantite edebilmek amacıyla geliştirilen Rt-PCR testinin, tekrarlanabilir, hızlı, güvenilir, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida*; tanımlama; gerçek zamanlı PCR; erime eğrisi.

ABSTRACT

Candida species are one of the major causes of nosocomial infections and are the fourth most common agent involved in bloodstream infections. The impact of non-albicans *Candida* species is increasing, however *C.albicans* is still the most common species. Since the antifungal susceptibility pattern among *Candida* spp. may be different, rapid diagnosis and identification of non-albicans *Candida* spp. are important for the determination of antifungal agents that will be used for treatment. The aim of the study was to describe a real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) assay that rapidly detects, identifies and quantitates *Candida* species from blood culture samples. A total of 50 consecutive positive blood culture bottles (BACTEC, Beckton Dickinson, USA) identified at our laboratory between June-November 2013, were included in the study. Reference strains of *Candida* spp. (*C.albicans* ATCC 10231, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.tropicalis* ATCC 1021, *C.krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019 and *C.dubliniensis* CD36) grown on Sabouraud dextrose agar were used for quality control. BACTEC bottles that were positive for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were also studied to search the cross-reactivity. A commercial kit (Zymo Research, USA) was used for DNA extraction. Real-time PCR was performed on LightCycler 480 (Roche, Germany) with primers and probes specific for 18S rRNA of *Candida* species. Twenty microlitres of the reaction mix contained 2 μl of extracted DNA, 2 μl of LightCycler Fast Start DNA Master Probe (Roche Diagnostics, Germany), 2 μl of MgCl₂ (5 mmol), 2 μl of 10x PCR buffer (Roche Diagnostics, Germany), 0.5 μl of each primer (0.01 nmol/μl) and 1 μl of each probe (0.1 μmol/μl) (TibMolBiol, Germany). Amplification was performed using the following conditions; 95°C for 10 mins and 50 cycles of denaturation at 95°C for 10 secs, annealing at 62°C for 10 secs and polymerisation at 72°C for 20 secs. A melting curve was created by cooling the products at 50°C for 30 secs and then heating to 80°C at a rate of 0.1°C/sec measuring of the fluorescence simultaneously. For the quantitation of fungal DNA according to the standard curve, serial dilutions of *C.albicans* ATCC 10231 DNA from 3×10^5 to 3×10^2 ng/μl were used. All of the strains were also identified by conventional methods and sequence analysis in order to compare the results obtained by Rt-PCR. In our study, all patient and standard samples could be amplified, identified and quantitated by this developed Rt-PCR method. A total of 50 strains, of them 26 were *C.parapsilosis*, 15 were *C.glabrata*, 6 were *C.albicans*, and 3 were *C.tropicalis* have been detected and identified among patient samples. The results were completely concordant with the sequencing and conventional methods, so the sensitivity and specificity of this method were estimated as 100 percent. In conclusion, it was novel Rt-PCR developed and evaluated in this study is considered as a rapid, accurate, reproducible, sensitive and specific method for the detection, identification and quantitation of commonly observed *Candida* spp. strains.

Keywords: *Candida*; identification; real-time PCR; melting curve.

GİRİŞ

İnvazif fungal enfeksiyonlar, immün yetmezliği olan ve özellikle kemoterapi alan hematolojik maligniteli hastalarda, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda ve AIDS hastalarında mortalite ve morbiditenin önemli bir sebebidir¹⁻⁵. *Candida* türleri ise, nozokomiyal enfeksiyonu olan hastaların kan kültürlerinden en sık izole edilen dördüncü etken olarak karşımıza çıkmaktadır⁶⁻⁸. Kan kültürlerinde en sık saptanan türün *C.albicans* olması karşın, albicans-dışı türler de giderek artan oranda izole edilmektedir⁹. İnvazif *Candida* enfeksiyonu açısından risk faktörleri ise kemoterapi, hematoloji ve onkoloji hastalarına uygulanan immün sistemi baskılayan tedavi, tedavi öncesi hastada var olan kolonizasyon, solunum yollarına uygulanan tedavi, kateter varlığı veya parenteral nutrisyondur¹⁰⁻¹³.

Candida türlerinde antifungal duyarlılık değişken olabilmekte; *C.krusei* flukonazole doğal dirençli iken, *C.glabrata*, *C.guilliermondii* ve *C.dubliniensis*'de flukonazole azalmış duyarlılık görülmektedir^{14,15}. *C.albicans* dışı türlerin hızlı tanısı, polien ve azollere karşı görülebilen direnç nedeniyle tedavide kullanılacak antifungal ajanın belirlenmesi açısından önemlidir^{16,17}. Günümüzde antifungal duyarlılık test sonuçlarının yorumlanmasının, türe özgü direnç sınır değerleri ile yapıyor olması, tür tanımlamasının önemli oluşunun bir diğer nedenidir. Günümüzde mayaların tanımlanmasında en sık uygulanan yöntemler; mikroskopi, kültür ve serolojik testlerdir¹⁸⁻²⁰. Ancak, invazif *Candida* enfeksiyonunun semptomları özgül olmadığından, uygulanmakta olan geleneksel tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür ve bu yöntemler hızlı sonuç vermemektedir²¹. Bu nedenle invazif fungal enfeksiyonların tanısında hızlı sonuç veren duyarlılığı yüksek moleküler testlere ihtiyaç vardır. Kan kültürlerinde *Candida* türlerine hızlı tanı koymaya yarayan ilk ticari sistem Septifast (Roche Diagnostics, Almanya) olmuştur²². LightCycler (Roche Diagnostics, Almanya), *Candida* türlerine hızlı tanı koymak için çeşitli şekillerde kullanılmış, ancak geliştirilen testlerin standardizasyonu yeterince başarılı olmamış ve bu testler için uzun süre ve emek yoğun bir çalışma gerekmesi kullanımlarını sınırlandırmıştır²³⁻²⁵. Bu çalışmada, en sık izole edilen *Candida* türlerini hızlı bir biçimde kan kültürü örneklerinden sap-tayabilen, tanımlayabilen ve kantitasyon yapabilen bir test geliştirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida Suşları

Çalışmaya, Haziran-Kasım 2013 döneminde kan kültür şişelerinde pozitif sonuç alınan 50 ardışık BACTEC şişesi (Becton Dickinson, ABD) dahil edildi. Kalite kontrolü amacıyla standart suşlar olan *C.albicans* ATCC 10231, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.tropicalis* ATCC 1021, *C.krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.dubliniensis* CD36, Sabouraud dekstrozağarda (SDA, Becton Dickinson, ABD) üretili.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, ticari kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı. Standart suşlar kültür plaklarından; hastalara ait örneklerde bulunan DNA ise pozitif sinyal veren BACTEC şişelerinden izole edildi. Bir BACTEC şişesi pozitif sinyal verdiğinde öncelikle şişeden alınan numuneden preparat hazırlanarak Gram bo-

yama yapıldı ve preparatta maya görülmesi halinde kan kültür şişesinden alınan 100 µl örnek DNA izolasyonu için kullanıldı. Kantitasyonu sağlamak için *C.albicans* ATCC 10231 suşu, steril 0.9'luk serum fizyolojik içerisinde sulandırıldı, 0.5 McFarland'a göre ayarlandı ve ardından DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası örnekten 1/10, 1/100 ve 1/1000'lik dilüsyonlar hazırlandı. Bu seri dilüsyonlar içerisindeki *C.albicans* DNA miktarı DU 730 Life UV/Vis spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD) ile üretici önerileri doğrultusunda ölçüldü ve miktarlarının 3×10^5 ile 3×10^2 ng/µl arasında olduğu belirlendi. Hazırlanan DNA izolatları kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı ve bu izolatlar hem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hem de dizi analizi için kullanıldı.

Gerçek Zamanlı PCR (Rt-PCR)

Candida türlerine ait 18S rRNA bölgesini hedef alan ve daha önce Loeffler ve arkadaşları^{23,24} tarafından belirlenmiş olan primer ve hibridizasyon problemleri kullanıldı. Kullanılan problemler; Prob1: LC 640 Red 5'-TGG CGA ACC AGG ACT TTT ACT TTG A; Prob 2: 5'-AGC CTT TCC TTC TGG GTA GCC ATT-3' *Fluorescein* şeklinde idi. Rt-PCR, Roche LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Yirmi mikrolitrelik reaksiyon karışımında 2 µl DNA, 2 µl LightCycler Fast Start DNA Master Probe (Roche Diagnostics, Almanya), 2 µl MgCl₂ (5 mmol), 2 µl 10x PCR tamponu (Roche Diagnostics, Almanya), 0.5 µl her bir primerden (0.01 nmol/µl) ve 1 µl prob 1 ve 2 (0.1 µmol/µl) (TibMolBiol, Almanya) bulunmaktaydı. Amplifikasyon için, 95°C'de 10 dk sonrasında 95°C'de 10 sn, 62°C'de 10 sn ve 72°C'de 20 sn'den oluşan 50 döngü uygulandı. Elli döngü sonrasında erime eğrisi analizi için önce ürünler 50°C'de 30 sn bekletildi ve ardından 80°C'ye kadar 0.1°C/sn artışla ürünler ısıtıldı ve eş zamanlı floresans ölçümü yapıldı. Hiçbir üreme saptanmayan 10 tane BACTEC şişesinden ekstraksiyon yapılarak testin yalancı pozitifliği araştırıldı. Çapraz reaksiyon varlığını araştırmak için *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üreyen BACTEC şişelerinden de DNA izolasyonu yapıldı. Tüm *Candida* spp. standart suşları her çalışmaya pozitif kontrol olarak dahil edildi. Kantitasyon için, *C.albicans* ATCC 10231 suşundan hazırlanmış olan 3×10^5 ile 3×10^2 ng/µl arasındaki seri dilüsyon örnekleri kullanıldı. Testin geliştirilmesi aşamasında, her bir dilüsyon örneğinden her bir testte üçer adet olmak üzere 3 ayrı çalışma gerçekleştirildi.

Dizi Analizi

Dizi analizi için, 18S rRNA gen bölgesini hedef alan *Fwd* 3'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG ve *Rev* 5'-G ATC CCT AGT CGG CAT AG primerleri ile aynı zamanda Rt-PCR için de kullanılan primerler kullanıldı. Elli mikrolitrelik karışım içerisinde 5 µl DNA, 5 µl LightCycler Fast Start DNA Master Probe (Roche Diagnostics, Almanya), 5 µl MgCl₂ (5 mmol), 5 µl 10x PCR tamponu (Roche Diagnostics, Almanya) ve 1.25 µl *Fwd* ve *Rev* primer (0.01 nmol/µl) bulunmaktaydı. Reaksiyon döngüsü için, 95°C'de 10 dk sonrasında 95°C'de 10 sn, 62°C'de 10 sn ve 72°C'de 20 sn'den oluşan 50 döngülük program hazırlandı. PCR ürünleri amplifikasyon varlığını kanıtlamak için etidyum bromür ile işaretlenmiş agaroz jel üzerinde görüntülendi. Tüm hasta örnekleri PCR sonrası Nucleospin Gel ve PCR Clean-up (Macherey Nagel GmbH Co., Almanya) kiti ile saflaştırıldıktan sonra dizi analizine alındı. Dizi analizi için DNA Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kiti ve Applied Biosy-

stems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazı kullanıldı. Diziler daha sonra FASTA formatına dönüştürülerek GenBank'ta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile tanımlandı.

Geleneksel Tanımlama Yöntemleri

BACTEC pozitif kan kültürü örnekleri SDA ve koyun kanlı agara ekilerek 37°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi. Belirginleşen kolonilerin tanımlanması için germ tüp testi, Mısır unu Tween 80 agarda mikroskopik inceleme ve API-ID32 (BioMerieux, Fransa) kitleri kullanıldı^{18,26}.

İstatistiksel Analiz

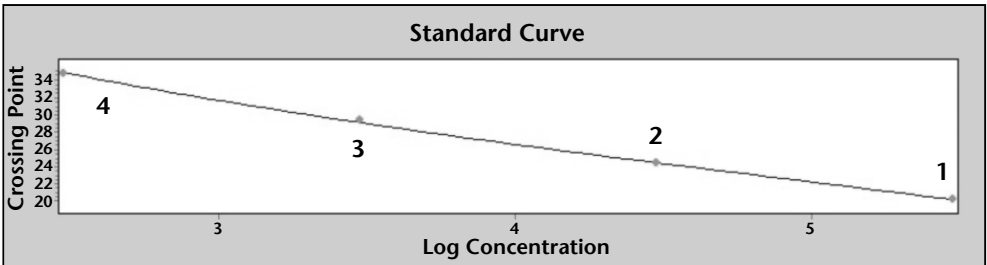
İstatistiksel analiz IBM SPSS Statistics v20 programı (SPSS Inc. Chicago, ABD) ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

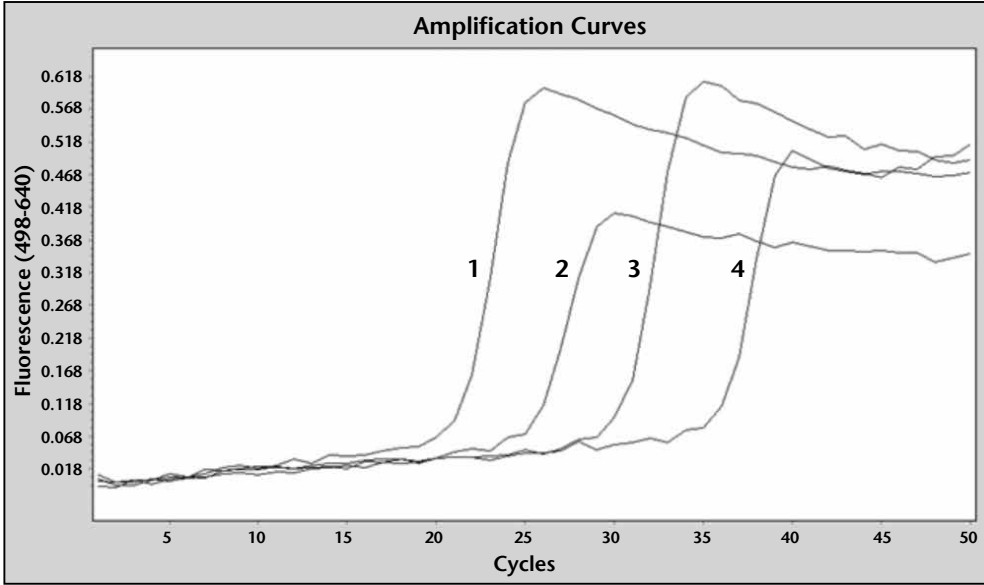
Çalışmamızda, *Candida* DNA'ları Rt-PCR ile başarılı bir biçimde çoğaltılmış ve PCR ürünleri yaklaşık 500 baz çifti (bç) uzunluğunda bant olarak jel elektroforezinde görülmüştür. Standart *Candida* spp. suşlarının seri dilüsyonları da jel elektroforezinde görülmüştür.

Gerçek zamanlı PCR yönteminin duyarlılığını ölçmek için *C.albicans* ATCC 10231 suşunun seri dilüsyonları kullanılmış ve geliştirilen testin 300 ng/μl *Candida* DNA'sını saptayabildiği belirlenmiştir. Testin analitik duyarlılığı, eldeki mevcut standartlar olan 300 ng/μl ile 300.000 ng/μl arasını kapsamaktadır. Bu örneklerle ait standart eğri Şekil 1'de, amplifikasyon eğrileri ise Şekil 2'de gösterilmiştir.

Gerçek zamanlı PCR yönteminin özgüllüğünü belirlemek için, üreme sinyali veren ve *E.coli*, *P.aeruginosa* ve *S.aureus* bakterilerini içerdiği bilinen BACTEC şişelerinden izole edilen DNA'lar ile yapılan PCR testi sonuçlarına göre çapraz reaksiyon olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca hasta örneklerinin ikisinin içeriğinde *Candida* spp.'nin yanı sıra BACTEC şişelerinden birinde *Enterobacter aerogenes* diğerinde ise *Klebsiella oxytoca* ve *Stomatococcus* spp. olduğu yapılan kültür sonucuyla belirlenmiş; ancak bu örneklerin her ikisinde de çapraz reaksiyon gözlenmemiş ve PCR ile *Candida* spp. varlığı saptanmış ve tanımlama yapılmıştır. Üreme sinyali alınmamış 10 BACTEC şişesinden yapılan izolasyon örneği ile iki kez



Şekil 1. Standart *C.albicans* (ATCC 10231) suşunun 1/10'luk dilüsyonlarına (1: 3×10^5 ; 2: 3×10^4 ; 3: 3×10^3 ; 4: 3×10^2 ng/μl) göre hazırlanmış standart eğri.



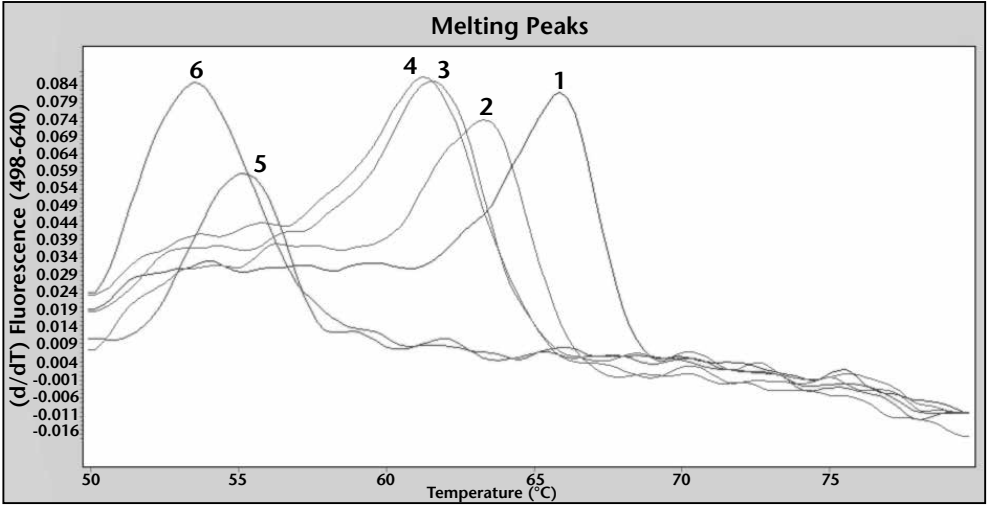
Şekil 2. Standart *C. albicans* (ATCC 10231) suşunun 1/10'luk dilüsyonlarına ait (1: 3.10^5 , 2: 3.10^4 , 3: 3.10^3 , 4: 3.10^2 ng/μl) amplifikasyon eğrileri.

Rt-PCR testi çalışılmış ve örneklerin hiçbirinde amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu verilere göre testin özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazında kullanılan program aracılığıyla testin PCR etkinliği belirlenmiş ve bu değerin 1.88 olduğu izlenmiştir. Kantitasyon için kullanılan standartların 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 ve 3×10^2 ng/μl'lik dilüsyonlarının, sırasıyla 19.12 ± 0.18 , 24.08 ± 0.28 , 28.98 ± 0.32 ve 35.06 ± 0.34 'üncü döngülere karşılık geldiği belirlenmiş; ortalama varyasyon katsayısı (CV) değeri 0.28 olarak bulunmuştur. Seri DNA dilüsyonlarının lineer aralığı ve standart eğrisi Şekil 1'de görülmektedir.

İçinde maya olduğu belirlenmiş olan ve pozitif sinyal veren tüm BACTEC şişeleri ve kültürde üreyen tüm standart suşlar Rt-PCR ile tanımlanmıştır. Erime eğrisinin tepe bölgesinin tam orta noktası LightCycler 480 içeriğindeki program tarafından erime ısı olarak belirlenmiştir. Standart suşların erime ısıları değerleri; *C. albicans* ATCC 10231 için 65.72 ± 0.30 , *C. glabrata* ATCC 90030 için 53.70 ± 0.07 , *C. krusei* ATCC 6258 için 55.00 ± 0.11 , *C. tropicalis* ATCC 1021 için 61.81 ± 0.10 , *C. parapsilosis* ATCC 22019 için 61.10 ± 0.24 ve *C. dubliniensis* CD36 için $63.32 \pm 0.35^\circ\text{C}$ olarak saptanmıştır. Araştırılan tüm standart suşlar ve hasta örneklerinden izole edilen tüm suşlar erime ısıları analizi ile ayırt edilmiştir (Şekil 3, Tablo I). Bu sonuçlara göre testin duyarlılığı %100 olarak belirlenmiştir.

Hasta örneklerinin tanımlanmasında, standart suşlar ile elde edilen erime ısıları değerleri kullanılmıştır. Örneklerin 26'sında *C. parapsilosis*, 15'inde *C. glabrata*, 6'sında *C. albicans* ve 3'ünde *C. tropicalis* olmak üzere toplam 50 suş tanımlanmıştır. Kan kültüründen nadiren izole edilen *Candida* cinsi dışındaki suşlara (*Trichosporon*, *Saprochaete*, *Rhodotorula* spp.) çalışma süresince rastlanmadığından bu türlerle ilgili bir veri elde edilememiştir. Birden



Şekil 3. Standart suşlara ait erime eğrisi analizi (1: *C. albicans* ATCC 10231; 2: *C. dubliniensis* CD36; 3: *C. tropicalis* ATCC 1021; 4: *C. parapsilosis* ATCC 22019; 5: *C. krusei* ATCC 6258; 6: *C. glabrata* ATCC 90030).

Tablo 1. Standart Candida Suşlarına Ait Erime Isısı Değerleri

Standart suş	Erime ısısı (°C)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	65.72 ± 0.30
<i>C. tropicalis</i> ATCC 1021	61.81 ± 0.10
<i>C. dubliniensis</i> CD36	63.32 ± 0.35
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	55.00 ± 0.11
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	53.70 ± 0.07
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	61.10 ± 0.24

fazla maya türünün birlikte izole edildiği bir örnek olmadığından, bu konuda da veri elde edilememiştir. Hasta örneklerinin tanımlanması için ayrıca konvansiyonel yöntemler ve dizi analizi de kullanılmış ve tüm yöntemlerle elde edilen tanımlama sonuçlarının birbiriyle tam olarak uyumlu olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Son zamanlarda invazif fungal enfeksiyonların sıklığındaki artış ve bu nedenle ortaya çıkan yüksek mortalite oranları, mayaların hızlı tanısı için kullanılabilecek testlere olan gereksinimi artırmaktadır. Hızlı ve kesin tanımlama ile fungal enfeksiyonların etkin antifungal ilaçlar ile tedavisi mümkün olabilecektir. Geleneksel yöntemlerle mayaların tanımlanması zaman alıcı olduğundan, hastaya erken dönemde uygun antifungal ilaç başlanması gecikebilmektedir^{27,28}. Gerçek zamanlı PCR, *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılmasına karşın, bu protokollerin rutin kullanıma girebilmesi için geliştirilmesine ihtiyaç

duyulmaktadır^{24,25,27,28}. Sunulan bu çalışmada, Loeffler ve arkadaşlarının^{23,24} tanımladığı primer ve prob kullanılmış; Taq polimeraz içeren bir ticari kit [LightCycler Fast Start DNA Master Probe (Roche Diagnostics, Almanya)] ve LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazı ile daha doğru, güvenilir ve standardize sonuçlar elde edilmiş ve test sonuçlarının doğruluğu altın standart yöntem olan dizi analizi ile de doğrulanmıştır. Fricke ve arkadaşları²⁸ da çalışmalarında, Loeffler ve arkadaşları^{23,24} tarafından geliştirilen primer ve prob dizilerini kullanmışlardır. Ancak bu araştırmacıların çalışması bizim çalışmamızda geliştirilen testle kıyaslandığında; *C.krusei*'yi tanımlayamadıkları, sonuçlarını altın standart yöntem olan dizi analizi ile doğrulayamadıkları ve hasta örnekleri kullanmaksızın sadece standart suşlarla çalışmış oldukları görülmektedir²⁸.

Geliştirdiğimiz Rt-PCR testinin saptama, tanımlama ve kantitasyon açısından güvenilirliği ve doğruluğunu belirlemek için, standart suşların yanı sıra 50 adet *Candida* spp. üremesi nedeniyle pozitif sinyal veren BACTEC şişesi çalışmaya dahil edilmiştir. Rt-PCR testi ile elde edilen tanımlama sonuçlarının, dizi analizi ve geleneksel tanımlama yöntemleri ile elde edilen sonuçlarla tam olarak uyumlu olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen bu testin diğer yöntemlere göre en büyük avantajı, örnek içerisindeki *Candida* spp. DNA'sının miktarını tayin edebilmesidir. Ayrıca bu test, kantitasyon yapabilme özelliği sayesinde sadece dizi analizi ve geleneksel tanımlama yöntemlerine üstün olmakla kalmayıp, günümüzde giderek yaygın bir kullanım alanı bulan MALDI-TOF MS yöntemine oranla da üstündür²⁹.

Çalışmamızda geliştirilen testin hedefi, mayalarda iyi korunmuş bir bölge olan 18S rRNA gen bölgesi olup, bu bölge *Candida* PCR testlerinde sık kullanılan bir hedeftir³⁰. Bu çalışmada, bu gen bölgesinin saptama, tanımlama ve FRET (floresans rezonans enerji transfer teknolojisi) ile erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen testin özgüllüğü, primer ve prob bölgesinin iyi korunmuş bölge olması nedeniyle %100 olarak bulunmuştur. Çalışmada testin duyarlılığı da %100 olarak bulunmuş; ancak bu yüksek oranın, düşük miktarda DNA içeren örneklerle çalışılmamış olması ve çalışılan hasta örneği sayısının az (n= 50) olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla kesin bir duyarlılık değeri elde edebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yazbek ve arkadaşları³¹, ticari bir Rt-PCR yöntemi ile geleneksel yöntemleri karşılaştırmışlar; elde ettikleri uyumsuz sonuçların ticari kitin düşük duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle ortaya çıktığını ifade etmişlerdir. Geliştirdiğimiz Rt-PCR ile elde edilen sonuçlar, Yazbek ve arkadaşları³¹ tarafından kullanılan ticari teste oranla özgüllük açısından daha başarılı bulunmuştur.

Birçok mikrobiyoloji laboratuvarı, BACTEC şişelerinde üreme sinyali alınması halinde geleneksel yöntemleri kullanmakta ve önce bu şişelerden pasaj yaparak besiyerinde kolonilerin oluşmasını beklemekte ve ardından germ tüp testi ve mısır unu Tween 80 agar üzerindeki kolonilerin mikroskopik incelemesiyle tanı koymaya çalışmaktadır. Ancak bu yöntemlerle tanımlama yapılabilmesi için en az 48 saate ihtiyaç duyulmakta ve bazen bu süre daha da uzayabilmektedir. Geliştirilen Rt-PCR testinin en önemli avantajı dört saat içerisinde örnek içerisindeki *Candida* türünü saptayabilmesi, tanımlayabilmesi ve kantite edebilmesidir. Tanımlama için geçen zamanın kısa olması, hastaların erken dönemde doğru ve etkin antifungal ilaç ile tedavi edilmesine olanak sağlayarak, mortalite ve morbiditenin azaltılmasına önemli katkıda bulunacaktır^{27,28}.

Bu çalışmada, bir çift primer ve prob kullanımı ile altı farklı *Candida* türünün tanımlanabilmesi, çok sayıda primer ve prob kullanarak tanımlama yapan çalışmalara oranla öncelikle maliyet avantajı sağlamaktadır. Ayrıca çok sayıda primer ve prob kullanımı durumunda, birden fazla PCR testinin uygulanması gerekmekte, süre uzayabilmekte, genellikle kantitasyon yapılamamakta ve sonuçların yorumlanması oldukça güç olmaktadır²⁵. Bizim çalışmamızda, 50 ardışık üreme sinyali alınan ve Gram boyalı mikroskopide maya görülen BACTEC şişesinde, en sık *C.parapsilosis* (26/50; %52) saptanmış, bunu *C.glabrata* (15/50; %30), *C.albicans* (6/50; %12) ve *C.tropicalis* (3/50; %6) izlemiştir.

Konvansiyonel yöntemlerle yapılan tanımlamanın maliyeti yaklaşık 25 TL iken, geliştirdiğimiz Rt-PCR testinin birim maliyeti yaklaşık 48 TL olarak hesaplanmıştır. Bu testin maliyeti konvansiyonel yöntemlere göre yüksek olsa da, klinisyene verilen hızlı sonuç ve hastanın daha kısa zamanda doğru olarak tedavi edilmesi, morbidite ve mortaliteyi azaltacak ve bu sayede hastanın toplam maliyeti üzerine olumlu etki edecektir.

Geliştirilmiş olan Rt-PCR testi ile kantitasyonun yapılabilmesi, klinik olarak kan dolaşımı enfeksiyonlarında *Candida* türlerinden şüphelenilmesi halinde, hastadan alınan plazma/serum örneklerinde enfeksiyonun varlığı ve şiddeti ile ilgili fikir verme potansiyeline sahiptir. Bu test sadece kan kültürü pozitifliğinde değil, aynı zamanda besiyerinde üreyen *Candida* kolonilerinin hızlı tanımlanmasında da kullanım potansiyeline sahiptir. Ayrıca otomatik idrar analizöründe maya görülmesi durumunda, idrar örneğinde *Candida* türlerinin tanımlanabilmesi ve kantitasyonunun yapılabilmesi, bu testin bir diğer potansiyel kullanım alanı olup, bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, geliştirdiğimiz Rt-PCR testinin standardize, tekrarlanabilir, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test olarak, sık görülen *Candida* suşlarının saptanması, tanımlanması ve kantitasyonu amacıyla kullanılabilecek hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Samonis G, Kofteridis DP, Saloustros E, et al. *Candida albicans* versus non-albicans bloodstream infections in patients in a tertiary hospital: an analysis of microbiological data. Scand J Infect Dis 2008; 40(5): 414-19.
2. Kuderer NM, Dale DC, Crawford J, Cosler LE, Lyman GH. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. Cancer 2006; 106(10): 2258-66.
3. Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with haematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica 2006; 91(8): 1068-75.
4. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. Blood 2003; 102(3): 827-33.
5. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 515-48.
6. Cone LA, Byrd RG, Potts BE, Wuesthoff M. Diagnosis and treatment of *Candida* vertebral osteomyelitis: clinical experience with a short course therapy of amphotericin B lipid complex. Surg Neurol 2004; 62(3): 234-37.
7. Rubin ZA, Somani J. New options for the treatment of invasive fungal infections. Semin Oncol 2004; 31(2 Suppl 4): 91-8.
8. Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. Clin Infect Dis 1995; 20(6): 1531-4.
9. Playford EG, Nimmo GR, Tilse M, Sorrel TC. Increasing incidence of candidaemia: long term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. J Hosp Infect 2010; 76(1): 46-51.

10. Castagnola E, Faraci M, Moroni C, et al. Invasive mycoses in children receiving hemopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(Suppl 2): S107-11.
11. Takakura S, Fujihara N, Saito T, et al; Japan Invasive Mycosis Surveillance Study Group. Clinical factors associated with fluconazole resistance and short-term survival in patients with *Candida* bloodstream infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(5): 380-8.
12. Tomee JF, van der Werf TS. Pulmonary aspergillosis. *Neth J Med* 2001; 59(5): 244-58.
13. Blinzler L, Fischer K, Just HM, Heuser D. Importance of mycoses in intra-abdominal infections. *Langenbecks Arch Chir* 1997; 382(4 Suppl 1): S5-8.
14. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(10): 2645-9.
15. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 2176-9.
16. Masia CM, Gutierrez RF. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(9): 550-63.
17. Brun S, Berges T, Poupard P, et al. Mechanism of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5): 1788-96.
18. Verweij PE, van der Lee HAL, Rijs AJMM. The role of conventional diagnostic tools, pp: 19-40. In: Maertens JA, Marr KA (eds), *Diagnosis of Fungal Infections*. 2007, Informa Healthcare, New York.
19. Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, Ruhnke M, Heusel CP, Kibbler C. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47(8): 1030-45.
20. Ağca H, Ener B, Yılmaz E, et al. Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients. *Mycoses* 2014; 57(3): 169-75.
21. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus group. *Clin Infect Dis* 2008; 46(12): 1813-21.
22. Casalta JP, Goulet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in rapid etiologic diagnosis of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(6): 569-73.
23. Loeffler J, Hagmeyer L, Hebart H, et al. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin Chem* 2000; 46(5): 631-5.
24. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 586-90.
25. Donyach C, Bertout S, Phelipau C, Draulovski P, Reynes J, Mallie M. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(3): 263-71.
26. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
27. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003; 52(12): 1071-6.
28. Fricke S, Fricke C, Schimmelpfening C, et al. A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J Appl Microbiol* 2010; 109(4): 1150-8.
29. Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI-TOF MS method for the identification of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(1): 65-7.
30. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, et al. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5676-82.
31. Yazbek S, Barada G, Basma R, Mahfouz J, Khalaf RA. Significant discrepancy between real-time PCR identification and hospital identification of *C. albicans* from Lebanese patients. *Med Sci Monit* 2007; 13(5): MT7-12.