

## Servikal Sürüntü Örneklerinden ID32 C Kiti ile Saptanmış *Candida Albicans* Türlerini Tanımlamada PCR Yönteminin Etkinliği

Dr. Gülendamar BOZDAYI<sup>1</sup>, Dr. Ayşe KALKANCI<sup>1</sup>, Dr. Aydan BİRİ<sup>2</sup>,  
Dr. Semra KUŞTİMUR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
ANKARA

<sup>2</sup> TCDD Ankara Hastanesi, Kadın Doğum Kliniği, ANKARA

✓ Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine çeşitli şikayetler ile başvuran 70 hastanın *Candida albicans* enfeksiyonu yönünden değerlendirmek amacı ile farklı iki mikrobiyolojik yöntem kullanarak etken patojenleri belirlemeyi ve ID32 C kiti ile tanımlanmış olan *Candida albicans* türlerini tanımlamada PCR yöntemini etkinliğini saptamayı amaçladık. Bu çalışmaya yaş ortalaması 35 olan 70 hasta dahil edilmiştir. Hastaların %10'unda her hangibir şikayet yokken, %9'u kronik akıntı, %45'i tekrar eden vulvovajinal kandidoz, %36'sı akut enfeksiyon tanısı almıştır. Hastalardan eküvyon ile alınan örnekler, Sabouraud dekstroz agar'da 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Maya mantarı olduğu belirlenen örneklerin hem ID32 C kiti ile tiplendirilmeleri hem de *Candida albicans*'a özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 70 hastanın %31.4'ünde maya mantarı üremiştir. Maya kolonilerinin ID32 C kiti ile %20'si *C. albicans*, %5.7'si *C. krusei*, %4.3 ü *C. glabrata*, %1.4'ü *C. inconspicua* olarak tiplendirilmiştir. *C. albicans*'a özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda ise hastaların %17.5'i pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada PCR yönteminin etkinliğinin, istatistiksel bir anlam taşımaya da, ID32 C kitine yakın olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Candida albicans*, tiplendirme, ID32 C, PCR

### ✓ Efficacy of PCR Assay in Diagnosis of *Candida Albicans* Strains Typed by ID32 C in Servical Smear Preperation

In this study, we aimed to evaluate two different assays used for the confirmation of *Candida albicans* infections and determine the efficacy of PCR assay in *Candida albicans* diagnosed by ID32 C kit in servical smear preperation of the patients followed in Gynecology and Obstetric out-patient clinic. Seventy patients (mean age 35) were enrolled in this study. While 10% of the patients have no complaint, chronic flow in 9% of the patients, recurrent vulvovajinal candidosis in 45% of the patients and acute infection in 36% of the patients were found. Samples collected with swab were incubated in SDA at 37°C for 24-48 hours. Yeast colonisations were identified by ID32 C kit and confirmed by a PCR assay using primers sets specific to *Candida albicans*. Yeast colonisations were observed in 31.4% of 70 patients. Identification of yeast colonisation by ID32 C kit showed *C. albicans* in 20%, *C. krusei* in 5.7%, *C. glabrata* in 4.3% and *C. inconspicua* in 1.4% of all patients. The PCR test results were found to be positive in 17.5% of the patients. In our study, we found that sensivity of ID32 C kit was better than PCR assay, although this difference was not statistically significant.

As a result we found that efficacy of PCR assay was proximate to ID32 C kit although this difference was not statistically significant.

**Key words:** *Candida albicans*, typing, ID32 C, PCR

**GİRİŞ**

Vulvovajinal kandidoz (VVK), bir maya mantarı olan *Candida*'nın kadın dış genital organlarında yaptığı bir enfeksiyondur. VVK sık görülen bir hastalık olup tüm vulvovajinitlerin %30'unu oluşturur. Erişkin kadınların %75'i hayatlarının herhangi bir döneminde en az bir kez VVK ile karşılaşmaya kalmaktadır. Çoğu kez gebelik, antibiyotik kullanımı gibi geçici durumlarda ortaya çıkan bu tablo tedaviye kısa sürede cevap vermektedir. Mantar vajinitlerinde en sık karşılaşılan tür olan *Candida albicans* (*C. albicans*) normal kadınların %10-20'sinde, gebelerin %40'ında ve VVK'lu kadınların ise %80'inde saptanmaktadır<sup>(1,2)</sup>.

Bu çalışmada, kronik akıntı, kaşıntı, yanma, tekrarlayan VVK ve akut enfeksiyon şikayeti ile TCDD Ankara Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran hastaların vajinal sürüntü örneklerinde mayaların izolasyon sıklığının araştırılması, üreyen türlerin ID32 C (bioMerieux, Fransa) kiti ile tiplendirilmesi ve tiplendirilen örneklerin Polimerase Chain Reaction (PCR) yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM**

Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran yaş ortalaması 35 olan 70 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastaların %10'unda herhangi bir şikayet yokken, %9'u kronik akıntı, % 45'i tekrar eden VVK, %36'sı akut enfeksiyon tanısı almıştır. Örnekler eküvyon kullanılarak vajen'den alınmış ve 30 dakika içerisinde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Laboratuvarımıza gelen örnekler Sabouraud-dextroz-agar (SDA) besiyerine ekilerek 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyeri yüzeyinde en az 10 maya kolonisi üreyen örnekler değerlendirmeye alınmış ve tiplendirme amacıyla ID32 C kiti kullanılmış, *C.albicans* izole edilen örnekler doğrulama amacıyla PCR yöntemi ile tekrar incelenmiştir.

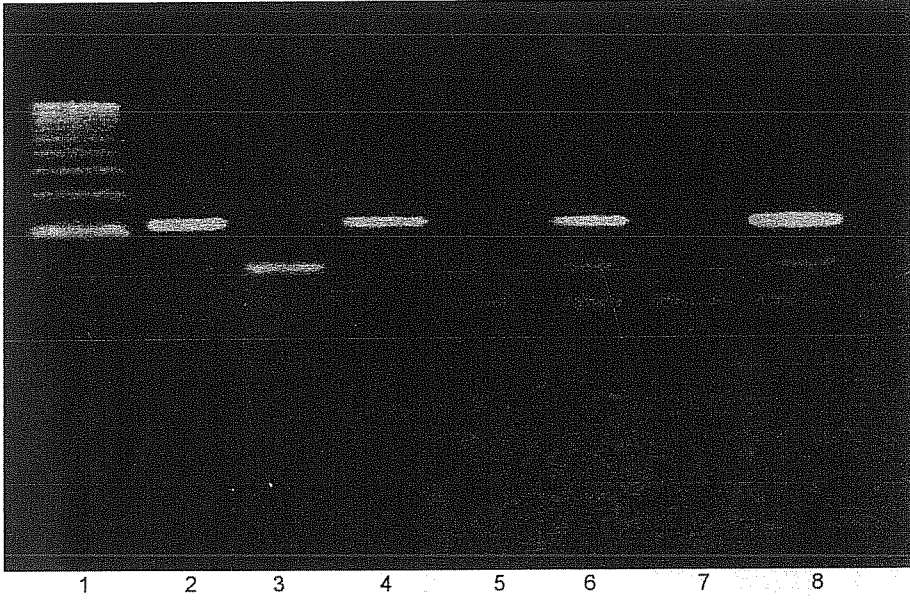
**ID32 C:**

Kültürlerde gelişen ve mikroskopik olarak maya hücresi görülen koloniler kitin özel solüsyonu içerisinde Mc Farland 1'e göre sulandırıldıktan sonra kuyucuklara 100'er µl konulmuş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda kitin özel skalası doğrultusunda değerlendirilmiştir.

**PCR:**

**Primerler:** Miyakawa ve ark.'nın<sup>(3)</sup> *C. albicans*'ın çoklu kopyalar gösteren EO3 geninden seçtikleri 125 baz çifti içeren bir diziyi hedef alan primer'ler (CAL 1: 5' CAC CAA CTC GAC CAG TAG GC 3', CAL 2: 5' CGG GTG GTC TAT ATT GAG AT 3') kullanılmıştır.

**DNA ekstraksiyonu:** Besiyerinde üreyen mayalar distile su içerisinde Mc Farland 1 (10\*\*16) olacak şekilde hazırlanmış ve her bir süspansiyondan 300 µL alınarak üzerine 900 µl lizis buffer-1 (10mM Tris[pH 7.6], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl) eklenerek horizontal çalkalayıcıda oda ısısında 10 dakika inkübe edilip 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Çökeltinin üzerine 1000 µL lizis buffer-2 (10mM Tris [pH 7.6], 10mM EDTA [pH 8], 50mM NaCl, %0.2 SDS, 200 (g/ml proteinaz K) eklenmiş ve 65°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen çökeltinin üzerine 2U/100 (l litikaz ve lizis buffer-3 (50mM Tris [pH 7.6], 1mM EDTA, 2-merkaptotanol) eklenerek 37°C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmiş, vortekslenmiş ve 65°C'de 20 dakika, 95°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Üzerine 5M potasyum asetat ilave edilerek buz üzerinde 25 dakika bırakılmıştır. 13000 rpm'de 10 dakika vortekslenen örneklerin süpernatantı ayrı bir tüpe alındıktan sonra üzerine 600 µl izopropilalkol eklenip, vortekslenmiş ve -20°C'de 30 dakika bekletilip ve tekrar +4°C'de 12000 rpm'de 30 santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökeltinin



**Şekil .** *C. albicans*'a spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının görüntülenmesi. 1 numara, 100bp büyüklüğünde size marker, 2 numara pozitif kontrol, 3 numara negatif kontrol, 4,6 ve 8 numaralar *C. albicans* pozitif bantlar, 5 ve 7 numaralar ise *C. albicans* negatif örnekler.

önemli fırsatçı patojenler hastalardan izole edilmektedir<sup>(6)</sup>.

Blecker ve ark. Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniklerine başvuran kadınlarda maya mantarı prevalansını %24, Reed ve ark. %25, Sobel ve ark. %20 olarak saptamışlardır<sup>(7-9)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise %20 ile 30 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir<sup>(10)</sup>. Çalışmamızda Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvuran 70 kadın hastada *Candida* prevalansını %31.4 olarak belirledik.

Yurtdışında yapılan çalışmalarda vajinadan elde edilen maya mantarlarının türleri, Sobel ve ark. tarafından sırasıyla *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* olarak, O'connor ve ark. tarafından ise *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* olarak belirtilmiştir<sup>(11,12)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Cengiz ve ark. sırasıyla *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. kefyr*, Katircioğlu ve ark. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, Tünger ve ark. ise *C. albicans*, *C. glab-*

*rata*, *C. tropicalis* olarak bulmuşlardır<sup>(10,13,14)</sup>. Bizim yaptığımız çalışmada, ID32 C tiplendirme kiti ile sırayla; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. inconspicua* olarak bulunmuştur.

Maya mantarlarının tanısında öncelikle, SDA besiyerinde en az 24-48 saat olmak üzere 37°C'de inkübe edilerek kültür yöntemi kullanılmaktadır. Çabuk ve basit tiplendirme yöntemlerinden germ-tüp yöntemi de *C. albicans*'ı diğer *Candida* türlerinden ayırmada kullanılmaktadır<sup>(15)</sup>. Klasik tiplendirme yöntemi olarak kullanılan karbonhidrat fermentasyon testleri 7-10 güne kadar uzayan inkübasyon süreleri gerektiren ve kullanılan besiyerinin hazırlanması oldukça zahmetli olan yöntemlerdir. Ayrıca fermentasyonların okunması sırasında yoruma açık sonuçlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle biyokimyasal reaksiyon temeline dayanan bir çok hazır maya tiplendirme kiti piyasada bulunmaktadır. Bunlardan en fazla şeker içererek çok sayıda türü birbirinden

- akıntıdan izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı. Mikrobiyol Bült 1989; 23: 275.
14. Katırcıoğlu İ, Tosun İ, Uyanık E ve ark. Vajinal akıntı örneklerinde saptanan mayaların tiplendirilmesi. İnfek Derg 1994; 8: 135.
  15. Tümbay E. Pratik Tıp Mikolojisi: Maya ve Maya Benzeri Mantarlar için Özümleme Besiyerleri. 1. Baskı. İzmir: Bilgehan Basımevi, 1983; 28.
  16. Buchaille L, Frediere AM, Guinet R et al. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 479-488.
  17. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R et al. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol 1999; 37: 1967-1970.
  18. Yeğenoğlu Y, Uzun M, Çekmeceli P. *Candida albicans*'ın hızlı tanısında selektif ve kromojenik yeni besiyerleri: Alcicans ID, Candichrom albicans-ön çalışma. İnfeks Derg 1998; 12: 223-228.
  19. Karaaslan A, Cengiz L, Boyacıoğlu İ ve ark. Vulvovajinal kandidiazisli olgulardan izole edilen maya türlerinin dağılımı ve antifungallere duyarlılıklarının saptanması. Mikrobiyol Bült 1999; 33: 319-325.
  20. Newton JR, Graham A. What is PCR?, p.8-9. in Billington D (ed), PCR. 1997, 2th ed. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.