

## İmmün sistemi baskılı hastaların klinik örneklerinden soyutlanan *Candida* türlerinin PCR ile belirlenmesi ve antifungal direnç genlerinin RFLP ve sekans analizi ile saptanması

*The identification of Candida species isolated from clinical specimens of immunocompromised patients with PCR and determination of antifungal resistance genes with RFLP and sequencing analysis*

Serdar Susever, Yıldız Yeğenoğlu

İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 12.04.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 10.05.2012

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı immün sistemi baskılı hastalardan elde edilen klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinde PCR tekniğinin ve RFLP ve sekans analizi ile antifungal direnç genlerinin araştırılmasıdır.

**Gereç ve yöntem:** Çalışmada immün sistemi baskılı 200 hastadan alınan klinik örnekler (96 bronkoalveoler lavaj, 56 biyopsi-apse, 8 kan, 15 periton diyaliz sıvısı, 15 plevra sıvısı, 5 beyin omurilik ve 5 perikard sıvısı) geleneksel ve moleküler yöntemler ile incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Örneklerden mantar DNA'sı saptandıktan sonra elde edilen ürünün, multiplex PCR yardımı ile tür düzeyinde tanısı yapılmış, antifungal direnci E-test, direnç genleri ise RFLP analizi ile saptanmıştır.

**Bulgular:** İkiyüz örneğin 30'unda (%15) kültür yöntemleri ile pozitif sonuç alınmış [20 *Candida albicans* (%67), beş *Candida parapsilosis* (%17), beş *Candida tropicalis* (%17)], 170 (%85) örnekte üreme olmamıştır. Genel primerler ile yapılan PCR testi sonucunda kültürleri olumlu bulunan 30 örneğin tümünün mantar DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. İzole edilen suşların biri E-test yöntemiyle flukanazole dirençli, ikisi flukanazole doza bağlı duyarlı olarak saptanırken 27'si duyarlı olarak bulunmuştur. Seçilen uygun primerler ile BamHI ve Sall enzimleri kullanılarak RFLP uygulanmış, yapılan analizler sonucunda dirençli bir *C. albicans* suşunda 600 bp'lik bant görülmüştür. *Candida dubliniensis* (950 bp) ve *Candida krusei* (360 bp) ile yapılan multiplex PCR optimizasyonunda başarı sağlanmıştır. Suşların ERG genine uygun primer çiftleri ile PCR'ları yapıldıktan sonra yapılan sekans analizi sonucunda dirençli *C. albicans* suşu referans gen ile karşılaştırıldığında D132E, E216D mutasyonları belirlenmiştir.

**Sonuç:** Moleküler test yöntemleri özellikle immün sistemi baskılanmış hasta popülasyonunun kısa sürede doğru tedavisine olanak sağladıkları için yaşamsal açıdan önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** antifungal direnç, *Candida*, E-test, Erg11 proteini, kesilmiş parçaların uzunluk farklılığı (RFLP), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), sekans analizi

### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study is to investigate PCR technique and antifungal resistance genes with RFLP and sequencing analysis in *Candida* species isolated from clinical specimens of immune-compromised patients.

**Materials and methods:** Clinical samples (96 bronchoalveolar lavages, 56 biopsy-abscess, 8 blood specimens, 15 peritoneal fluid specimens, 15 pleural fluid, 5 cerebrospinal fluid and 5 pericard fluid specimens) from 200 immunosuppressed patients were studied by conventional and molecular methods. Antifungal susceptibility testing was performed by the E-test method. Firstly, fungal DNA was isolated from specimens, and then the resultant products are defined with multiplex PCR. Antifungal resistance and resistance genes were established by E-test and RFLP analysis.

**Results:** Thirty of 200 samples (15%) were culture positive [20 *Candida albicans* (67%), five *Candida parapsilosis* (17%), five *Candida tropicalis* (17%)], and 170 of samples were found culture negative (85%). PCR with the universal primers detected fungal DNA in all 30 culture positive samples. One strain was determined as resistant; 2 strains were dose dependent susceptible and 27 strains were sensitive to fluconazole by E-test. The resistance gene (ERG11) was detected by BamHI and Sall enzymes revealed fluconazole resistance in one of *C. albicans* strains. The identification was successful in *Candida dubliniensis* (950 bp) and *Candida krusei* (360 bp) with multiplex PCR. D132E and E216D mutations were detected in sequencing of ERG 11 gene of this isolate and compared with reference gene in GenBank by clustal analysis.

**Conclusion:** The molecular test methods supplies correct therapy rather early in immunosuppressive patients therefore it is important for the survival.

**Keywords:** Antifungal resistance, *Candida*, E-test, Erg11 protein, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), sequencing analysis

**Yazışma Adresi /Correspondence:** Dr. Serdar Susever

İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye Email: ssusever2@yahoo.com  
Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2012, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

## GİRİŞ

Günümüzde giderek artış gösteren immün sistemi baskılı hasta (İSBH) sayısı, beraberinde fırsatçı mantar infeksiyonlarının da artışına olanak sağlamıştır. Başta Candida ve bunu izleyerek Aspergillus cinsinden olmak üzere tüm fırsatçı mantarların son yıllarda, özellikle terminal dönemlerinde olup farklı tanı almış immün baskılı hasta gruplarından sıklıkla saptandığı görülmektedir. Öncelikli etken olan *Candida albicans*'ın hastane infeksiyonlarında bakterilerden sonra ikinci sırada; mantarların kendi içlerindeki sınıflandırmalarda ise ilk sırada yer aldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Candida'lara bağlı kan infeksiyonları (kandidemi) oranı 1980'lerde %2 iken, aynı yılın sonlarında %4'e, 1990'larda %8'e yükselmiş, 1999'da yapılan bir çalışmada ise bu oran %12 olarak bildirilmiştir. Kandidemilerden kaynaklanan mortalitenin %50'lerde bulunması, konunun ne denli önemli olduğunu çarpıcı bir şekilde vurgulamaktadır.<sup>1,2</sup>

*C. albicans*'ın laboratuvar tanısında ayırıcıda güçlük çekilen *Candida dubliniensis*, kan infeksiyonlarından etken olarak sık saptanan *Candida parapsilosis*, flukonazole doğal dirençli *Candida krusei*, flukonazole giderek daha çok dirençliliği saptanan *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis*'in tür düzeyindeki çabuk tanıların, tedavi ve dolayısı ile yaşamsal açıdan ne denli önemli olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir.<sup>3,4,5</sup> Geleneksel yöntemler ile izolasyon ve idantifikasyonun ortalama bir haftayı kapsamasına karşın, moleküler tanı ile tüm bu uygulamalar için bir buçuk günlük bir süre yeterli olmakta, antifungallere dirençlilik durumları da aynı zamanda belirlenebilmektedir.

Antifungallere direnç konusu da günümüzde başlıbaşına önemli bir sorunu teşkil etmektedir. Önceleri sınırlı sayıda olan antifungal çeşitliliği son yıllarda artış göstermiş, aynı zamanda birçok nedene bağlı olan antifungal dirençliliği de gündeme gelmiştir.<sup>6,7</sup> Günümüzde özellikle daha sık tercih edilen ve yan etkileri daha az bir azol bileşiği olan flukonazole direnç konusu üzerinde önemle durulmakta ve konu ile ilgili olarak çok sayıda çalışma sürdürülmektedir.<sup>7,8</sup> Candida suşlarında antifungal direncin moleküler mekanizmasının tanımlanmasında, genomik çalışmalardan yararlanılmıştır. Çalışmalarda çoğunlukla ATP bağlayıcı kaset ve esas kolaylaştırıcı super ailesi efluks pompa genleri ile ERG11 gibi hedef enzimleri kodlayan genlerdeki

mutasyonların gösterilmesi amaçlanmıştır. Grp2p, Ifd1p, Ifd4p, Ifd5p, ERG10 genlerinin azol direnci ile ilişkisi bulunduğu ve ERG10p'nin ergosterol sentezinin ilk basamağında rol alan enzim olduğu bildirilmiştir.<sup>9</sup>

Bu çalışmada polimeraz zincir reaksiyonunun ilk basamağında genel primer çiftleri ile 550bp'de klinik örnekteki mantar varlığının saptanması, daha sonra türe özgü primerlerin kullanılması ile tür düzeyinde tanısının yapılması amaçlanmıştır, bir diğer aşamada ise bu mantarların antifungallere karşı direnç özellikleri ERG genlerine özgü primerler kullanılarak kesilmiş parçaların uzunluk farklılığı (RFLP) analiz yöntemiyle araştırılmıştır. Direnç özelliği saptanan suşlarla, rastgele seçilen duyarlı suşların PCR ürünleri purifiye edilip, sekans analizi yapılmış ve çalışma sonunda RFLP yöntemi ile sekans sonuçları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı'na, immün sistemi baskılı hastalardan alınarak gönderilen, 96 bronkoalveoler lavaj, 56 biyopsi-abses, sekiz kan, 15 periton diyaliz ve plevra sıvısı, beş beyin-omurilik ve perikard sıvısı örneği geleneksel (kültür-mikroskopi) ve moleküler yöntemler ile incelenerek değerlendirilmiştir. İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma ve Kültür Koleksiyonları Merkezi (KÜKENS)'nden sağlanan, *C. albicans* ATCC 10231 ve CBS 6431, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 15126, *C. tropicalis* KÜEN 1025, *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. dubliniensis* CBS 7987 referans suşlar olarak kullanılmıştır.

Geleneksel yöntemler: Sistemik mikoz kuşkulu örnekler üzerine %10-15'lik KOH+kalkoflor beyazı eklenerek hazırlanan preparasyon, floresan mikroskopta incelenmiş ve mantar elemanları aranmıştır. Hasta örnekleri glikozlu Sabouraud (pH: 5.5-6) ve beyin kalp infüzyon agar besiyerlerine ekim yapılarak 25-30°C'de 30 gün süre ile inkübe edilmiş; *C. albicans*'ın tanımlanması için tween 80'li mısır unlu agara çizgi ekim yapılarak klamidospore oluşumu araştırılmıştır. *C. albicans* dışındaki mayaların tür düzeyindeki tanıları karbonhidratları asimile etme özelliğine dayanarak API 20 C Aux kiti ile (Biomeriux-Fransa) yapılmıştır.<sup>1</sup>

Klinik örneklerin ve referans suşların PCR ve multipleks PCR yöntemleriyle tanımlanması: İlk olarak, DNA ekstraksiyon kiti [Modifiye Roche Kit Protokolü (Roche, 11796828001)] yardımıyla referans suşlardan ve hasta örneklerinden mantar DNA'sı saptanmış ve elde edilen ürünlerin türe özgü primerler kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile tür düzeyinde tanısı yapılmıştır. Primerlerin isimleri, dizilimleri, nükleotid sayıları (mer) ve çoğalttığı uzunluklar Tablo-1'de gösterilmiştir. Türe özgü multipleks PCR protokolünde; altı tür için iki multipleks PCR paneli test edilmiştir. T-P panelindeki primerler *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*'i (0.4 µl CTR 1 ve CTR2, 0.6 µl CPA1 ve CPA2), A-T panelindekiler ise *C.albicans* ve *C.tropicalis*'i (0.5µl CALB1, CALB2, CTR 1 ve CTR2) tanımlar (Tablo 1). Ana karışımı sağlamak için 2 µl (~1 ng) dilüe genomik DNA, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (herbiri için 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve primerler karıştırılarak toplam hacim 20 µl oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir. PCR döngüsü 96°C'de 5 dakika (1 döngü), 94°C'de 30 sn, 58°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn (40 döngü) ve 72°C'de 15 dakika (1 döngü) olarak modifiye edilmiştir. Elde edilen ürünler için % 1.5'lük agaroz jel hazırlanıp, soğumadan önce 0.5 µg etidyum bromür eklenmiş, PCR ürünlerinden 10 µl alınıp 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Jel üzerindeki kuyucuklara konan bu karışım, içerisinde 1 x Tris-asetat EDTA tamponu bulunan elektroforezde 50 volt altında 1-2 saat yürütülmüş, DNA bantları UV altında incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.<sup>4,5</sup>

Antifungal duyarlılık: Klinik örneklerden izole edilen mayaların azol dirençliliğinin belirlenmesinde E-test yöntemi (AB Biodisk, 1993) kullanılmıştır. 24 saatlik Candida suşu 5 ml steril 0.145 M NaCl (8.5 g/L NaCl) içerisinde süspanse edilmiş ve 15 saniye vortekslendikten sonra inokulum konsantrasyonu 0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre 0.5x10<sup>3</sup>-2.5x10<sup>3</sup> cfu/ml hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 0.5 ml alınarak bir eküviyon yardımı ile %2 glukoz içeren RPMI 1640 (%1.5) besiyerine yayılmış, 15 dakika kuruma süresi sonunda besiyeri üzerine flukonazol strip-leri yerleştirilmiştir. Petri kutuları 24-48 saat süre ile 35°C'de inkübe edilmiş, oluşan elips biçimindeki zonlar CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir (Flukonazol için MİK aralığı: 0.125-64 µg/ml).<sup>10</sup>

RFLP: Antifungal direnç genlerinin belirlenmesinde RFLP yönteminden yararlanılmıştır. Saflaştırma için elde edilen PCR ürününden 20 µl alınıp üzerine, 2 ml 3 M NaCl ve 50 µl etil alkol (%96) ilave edilmiş ve 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler on dakika 13,000 rpm'de santrifüj edilmiş, pelet üzerine 500 µl % 70'lik etil alkol eklenerek, 13,000 rpm'de tekrar 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Üst sıvısı atılan tüplere 30 dakika kurutulduktan sonra, 18 µl distile su eklenip karıştırılmış, içerisine 10 U BamHI ve Sal I enzim-leri eklenerek uygun bölgenin kesilmesi için (ER-G11F: CGCTCGAGCGCAATATGGCTATTGT TGAAACTGTC BamHI 600 bp, ERG11R: GCT-CTAGAGCTTAAAACATACAAGTTTC TCTTTT SalI 600 bp), 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüp içerikleri, % 3'lük agarozdaki kuyucuklara konarak içerisinde 1 x Tris-borate-EDTA solüsyonu bulunan elektroforezde 50 volt altında 2 saat yürütülmüş, oluşan bantlar UV altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.<sup>11</sup>

Sekans analizi: Direnç özelliği belirlenen suşlarla, rastgele seçilen duyarlı suşların PCR ürünleri saflaştırılıp, gen düzeyinde farklılıklarının saptanması için sekans analizi yapılmıştır (Sekans analizi Refgen firması tarafından hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir).

## BULGULAR

Çalışma içeriğinde yer alan 200 immün sistemi baskılı hasta örneğinin 30'unda (%15) kültür yöntemleri ile olumlu sonuç alınmış [20 *C.albicans* (%67), beş *C.parapsilosis* (%17), beş *C.tropicalis* (%17)], 170 (%85) örnekte üreme olmamıştır.

İzole edilen Candida suşlarının, E-test yöntemiyle direnç özellikleri araştırılmış; *C.albicans* suşlarından birinin flukonazole dirençli, ikisinin doza bağlı duyarlı olduğu saptanmıştır. 27 Candida suşunun flukonazole duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Genel primerler ile yapılan PCR testi sonucunda kültürleri olumlu bulunan 30 (%15) örneğin tümünün mantar DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. Mikroskopi, kültür ve PCR olumlu on (%5); mikroskopi olumsuz kültür ve PCR olumlu 20 (%10) örnek saptanmıştır. PCR olumlu kültür olumsuz örnek saptanmamıştır. Çalışmada Kappa istatistiksel analiz testi yardımı ile kültür ve PCR uyumu 1.0 (p<0.001)

olarak saptanmıştır. Uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

Referans *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.dubliniensis*, *C.tropicalis*, *C.krusei*'nin genel primer çiftleri ile yapılan PCR sonuçları Resim 1'de görülmektedir.

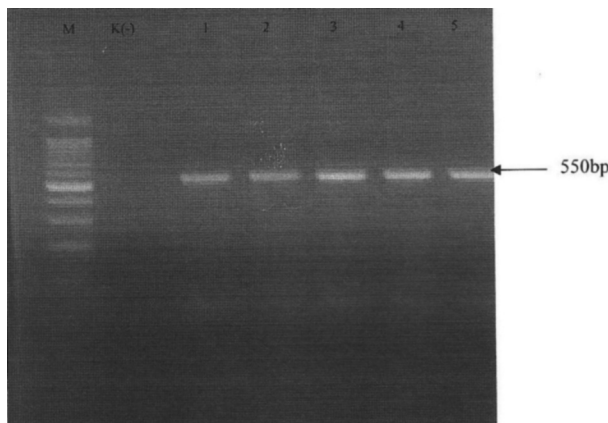
Çalışmamızda *C.dubliniensis* ve *C.krusei* ile yapılan PCR optimizasyonunda başarı sağlanmıştır. Referans *C.albicans* ve *C.dubliniensis*'in türe özgü primerleri ile yapılan testler sonucunda *C.albicans*'ın iki ayrı referans suşunun (ATCC 10231 ve CBS 6431), sırasıyla 273 ve 1050 bp'de, *C.dubliniensis*'in (CBS 7987) 950 bp'de (Resim 2), *C.krusei*'nin de 360 bp'de (ATCC 6258) bant oluşturduğu saptanmıştır (Resim 3).

Referans *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile yapılan PCR analiz sonuçlarında, genel primer ile 550 bp'de, türe özgü primerler ile 320 bp'de (*C.parapsilosis*) ve 357 bp'de (*C.tropicalis*) bant oluşturduğu görülmüştür (Resim 4).

Referans *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*'in multipleks optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bantlar Resim 5'te gösterilmiştir.

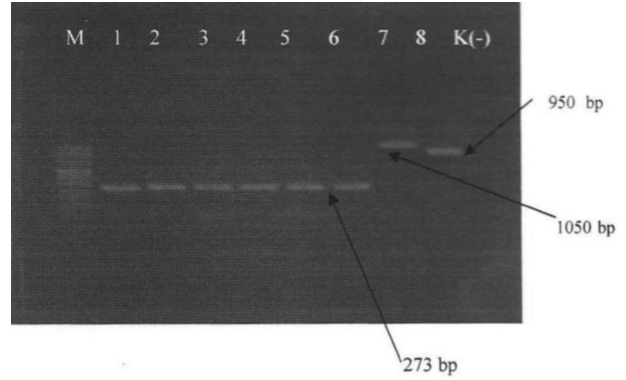
Klinik örneklerden saptanan *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*'in türe özgü primerler ile yapılan multipleks PCR sonuçları Resim 6'da gösterilmiştir.

Seçilen uygun primerler ile BamHI ve Sal I enzimleri kullanılarak *C.albicans*'a RFLP uygulanmış, yapılan analizler sonucunda dirençli suşta 600 bp'lik bant saptanmıştır (Resim 7).

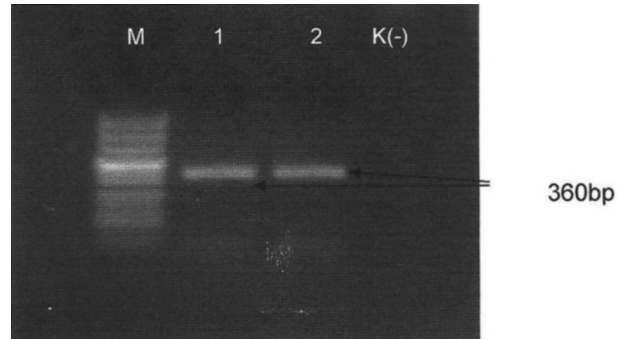


**Resim 1.** Referans Candida suşlarında genel primer çiftleri ile PCR sonuçları. M: Moleküler standart (100 bp), sütun 1, 2, 3, 4, 5: Sırasıyla *C.albicans* ATCC 10231, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.dubliniensis*

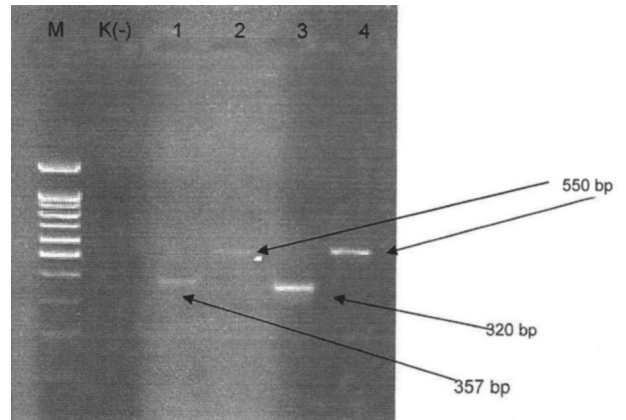
CBS 7987, *C.tropicalis* KÜEN 1025, *C.krusei* ATCC 6258, K(-): Negatif kontrol (H<sub>2</sub>O).



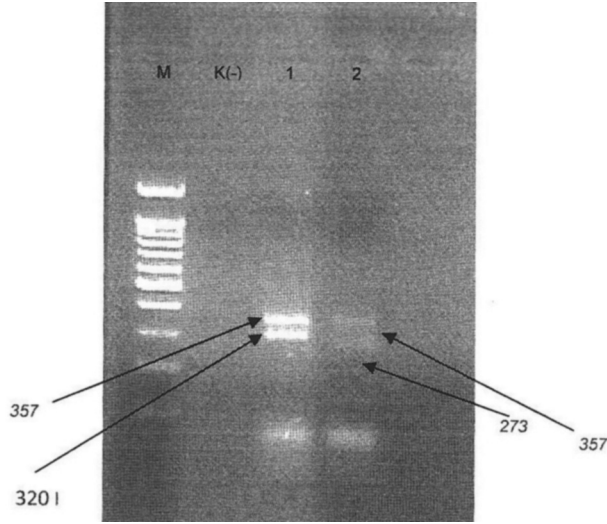
**Resim 2.** Referans *C.albicans* ve *C.dubliniensis*'in türe özgü primerler ile PCR sonuçları. M: Moleküler standart (100 bp), sütun 1, 2, 3, 4, 5, 6: *C.albicans* (ATCC 10231), sütun 7: Referans *C.albicans* CBS 6431, sütun 8: Referans *C.dubliniensis* CBS 7987, K(-): Negatif kontrol (H<sub>2</sub>O).



**Resim 3.** Referans *C.krusei*'nin türe özgü primerler ile yapılan PCR sonuçları. M: Moleküler standart (100 bp), sütun 1, 2: *C.krusei*, K(-): Negatif kontrol (H<sub>2</sub>O).



**Resim 4.** Referans *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları. M: Moleküler standart (100 bp), sütun 1: türe özgü primer *C.tropicalis*, sütun 2 ve 4: Mantar DNA'sı, sütun 3: *C.parapsilosis*, K(-): Negatif kontrol (H<sub>2</sub>O).

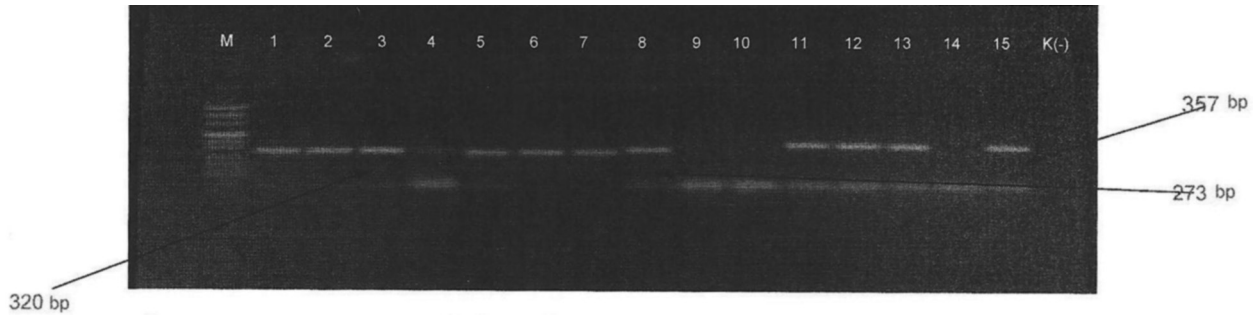


**Resim 5.** M: Moleküler standart (100 bp), K (-): Negatif kontrol ( $H_2O$ ), sütun 1: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, sütun 2: *C. tropicalis*, *C. albicans*.

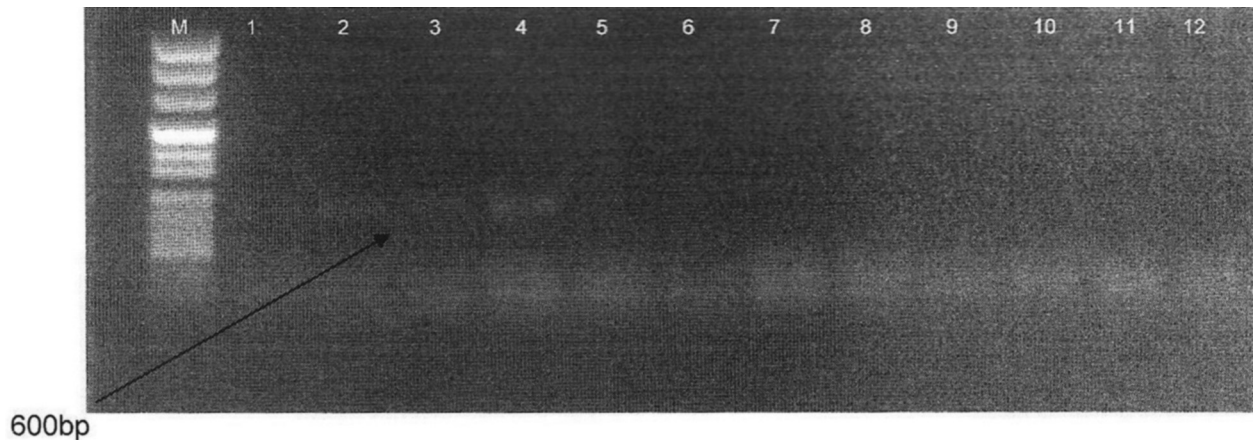
Elde edilen PCR ürünleri saflaştırılmış, gen düzeyinde farklılıklarının belirlenmesi için sekans analizi uygulanmıştır. Azollere dirençli olarak sap-

tanan *C. albicans*'ın CAF1-CAR3 primerleri ile yapılan DNA dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde; dirençli X13296 no'lu referans geni ile AF153845 no'lu duyarlı genin nükleotidlerinin karşılaştırılması sonucunda farklı nükleotitlerin saptandığı görülmüştür. Bu temele dayanarak RFLP ve E-test yöntemlerine göre dirençli olarak belirlenen 102 nolu örneğin referans genlerden X13296 geni ile uyumlu olduğu görülmüştür. 153 ve 266 no'lu aminoasitlerde mutasyon olduğu saptanmıştır. Referans AF153845 no'lu suşa ait duyarlı olarak bildirilen 153 no'lu amino asitte E D ve 266'nci amino asitte ise D E mutasyonu görülmüştür. Dirençlilik saptanan 102 nolu *C. albicans*'ın, dizisi yapılan ERG11 geninin 1528bp'lik tüm gen kısmı, NCBI gen bankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yayınlanmıştır (gen bankası no: GQ175788.1).

İstatiksel analiz: Çalışmada Kappa istatistiksel analiz testi yardımı ile kültür ve PCR uyumu 1.0 ( $p < 0.001$ ) olarak saptanmıştır. Uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.<sup>12</sup>



**Resim 6.** Klinik örneklerden saptanan *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*'in türe özgü primerler ile multipleks PCR sonuçları. M: Moleküler standart (100 bp), K(-): Negatif kontrol ( $H_2O$ ), sütun 1-4, 8: *C. parapsilosis*, sütun 10,14: Negatif örnek, sütun 5-7: *C. albicans*, hat 11-13, 15: *C. tropicalis*.



**Resim 7.** *C. albicans*'ın RFLP sonuçları. M: Moleküler standart (1500 bp), sütun 1-4: RFLP olumlu *C. albicans* (600 bp), sütun 5-12: RFLP olumsuz *C. albicans*.

**Tablo1.** Primer isimleri, dizilimi, nükleotid sayısı (mer) ve çoğalttığı uzunluklar

Primer ismi	Primer dizilimi (5 - 3)	Nükleotid sayısı (mer)	Çoğalttığı uzunluk
Genel primerler			~550 bp
U1	GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA	20	
U2	GAC TCC TTG GTC CGT GTT	18	
<i>C.krusei</i>			360 bp
CAK1	ACT ACA CTG CGT GAG CGG AA	20	
CAK 2	AAA AAG TCT AGT TCG CTC GG	20	
<i>C.albicans</i>			~273 bp
CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	22	
CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	20	
<i>C.glabrata</i>			~423 bp
CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	20	
CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA		
<i>C.parapsilosis</i>			~320 bp
Grup I CPA1	TTG GTA GGC CTT CTA TAT GGG	21	
AllgrupCPA3	GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A	22	
<i>C.tropicalis</i>			~357 bp
CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	22	
CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	22	
<i>C.dubliniensis</i>			~950 bp
CD1	GAA GGG CAT GCC TGT TTG AGA G	22	
CD2	ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T	22	
ERG 11 direnç geni			
CAF1	GAA AGG GAA TTC AAT CG	17	750 bp
CAR3	AAT ATA GTT GAG CAA ATG AAC G	22	
CAF4	GCT TCA AGA TCT TTA TTT GGT G	22	1030 bp
CAR6	AAC AAT CAG AAC ACT GAA TCG	21	
CPF1	ATT GCT AAC TTG TTG ATT GGT GTT	24	600 bp
CPR2	TGT AAT GGC ATG TGT AAT CTG AGG	24	
CTF1	TCT GAC ATG GTG TGT GTG TG	20	500 bp
CTR1	ATT GAT GCC ATC AAT GGC AG	20	

## TARTIŞMA

İnfeksiyon etkeni olan/olabilen gerçek ve fırsatçı patojen mantarların tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür günümüzde halen altın standart yöntemler olma değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle bu yöntemlerin yanı sıra; daha hızlı olan, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemle-

rine gereksinim duyulmuştur. Günümüzde fenotipik tanı yöntemlerinde karşılaşılan sorunlar, moleküler yöntemlerin; mikrobiyolojinin diğer alanlarında olduğu gibi gerektiğinde mikoloji alanında da kullanılmasını zorunlu hale getirmiş, tanı, tedavi izlemi ve epidemiyoloji konusunda giderek başarılı sonuçlar alınmasını sağlamıştır.

Watson-Crick'in 1953'de DNA'nın yapısını tanımlamasından sonra, mantarları ilgilendiren ilk genetik çalışmalar 1960 yılında *Saccharomyces*

cerevisiae'nin genetik haritasının incelenmesiyle başlamıştır.<sup>13,14</sup> Whelan, 1980'de *C.albicans* ile genetik çalışmalara başlamış, Kurtz, 1986 yılında *C.albicans*'a *ade2* geninin transformasyonunu bildirmiştir.<sup>2,7</sup>

1983 yılında Mullis'in PCR'ı mikroorganizmaların moleküler tanımlarında kullanması sonucu mantarlar, bakteriler, virüs veya parazitlerin genetik yapıları, konaktaki transkripsiyonel aktiviteler ve enfeksiyona karşı oluşan yanıtta; testin üstün analitik gücünden dolayı kısa zamanda başarılı sonuçlar alınması, bu alanda yapılan çalışmalara hız ve değer kazandırmıştır.<sup>16</sup>

1992-1994 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 601 kan örneği PCR yöntemi ile incelenmiş; olumlu 109 örneğin 40'ında *C.albicans*, 10'unda *C.tropicalis*, altışar tanesinde *C.parapsilosis* ve *Aspergillus flavus*, 11'inde *C.glabrata*, sekizer tanesinde *C.krusei* ve *Aspergillus fumigatus*, ikisinde *Candida guilliermondii*, üçer tanesinde *Candida kefyr* ve *Aspergillus versicolor*, yedisinde *Aspergillus niger*, beşinde *Aspergillus nidulans* saptanmıştır.<sup>17</sup>

BacT/Alert yöntemi ile incelenen 150 kan örneği kültürünün; 36'sında *C.albicans*, 19'unda *C.glabrata*, yedisinde *C.parapsilosis*, beşinde *C.tropicalis*, üçünde *C.krusei*, ikisinde *C.krusei*+*C.glabrata*, birinde *C.glabrata* +*C.albicans*, aynı sayıda örneğe uygulanan PCR-EIA tekniği ile de; 35'inde *C.albicans*, 18'inde *C.glabrata*, yedisinde *C.parapsilosis*, beşinde *C.tropicalis*, üçer tanesinde *C.krusei* ve *C.glabrata*+*C.albicans*, ikisinde *C.krusei*+ *C.glabrata* birlikte saptanmıştır.<sup>6</sup>

Nötropenik, ve hematolojik malignitesi olan 72 hastanın ateşli dönemlerinde ve antifungal kullanımını sırasında alınan kan örnekleri PCR ve kültürel yöntemler ile incelenmiş, PCR ile 31'i (24 *C.albicans*, ikişer tanesi *C.glabrata* ve *C.tropicalis*, üçü *C.kefyr*) olumlu, 41'i ise olumsuz olarak bulunmuştur. PCR'ı olumlu olarak saptanan hastalardan dördünün (üçü *C.albicans*, biri *C.tropicalis*) kültür sonuçları da olumlu olarak bildirilmiştir.<sup>18</sup>

Kültürü olumlu 234 kan örneğiyle yapılan çalışmada, 237 maya (121 *C.albicans*, 50 *C.tropicalis*, 29 *C.glabrata*, 20 *C.parapsilosis*, altı *Cryptococcus neoformans*, dört *C.krusei*, üç *C.guilliermondii*, bir *Candida lusitaniae*, üç idantifiye edilemeyen maya) izole edilmiş ve 234 kan örneğine 18S rDNA, ITS1,

5.8S rDNA, ITS2, ITS4 ve 26S rDNA gen bölgelerinden çoğaltılan türe özgü ve genel primerler ile uygulanan multipleks PCR test sonucunda; *C.albicans* (402 bp), *C.glabrata* (632 bp), *C.guilliermondii* (185 bp), *C.krusei* (475 bp), *C.lusitaniae* (116 bp), *C.parapsilosis* (126 bp), *C.tropicalis* (149 pb) ve *C.neoformans* (516 bp)'ın tanımlandığı bildirilmiştir. Multipleks PCR'ın duyarlılığı araştırmacılar tarafından %98.7 (234/237) olarak saptanmıştır.<sup>19</sup>

Antifungal tedavi gören dört hastaya ait örnekten kültürel yöntemler ile olumsuz, PCR ile olumlu yanıt alındığı bildirilmiştir.<sup>18</sup>

Kan kültüründen multipleks PCR yöntemi ile yapılan çalışmada, iki çift primer kullanarak *C.glabrata* (482 ve 483 bp), *C.guilliermondii* (248 bp), *C.parapsilosis* (229 bp), *C.albicans* (218 veya 219 ve 110 bp), *C.tropicalis* (218 bp), *C.neoformans* (201 bp) ve *C.krusei* (182 bp) tanımlanmış; duyarlılığın %96.9, özgüllüğün ise %87.5 olduğu bildirilmiştir.<sup>3</sup>

Araştırmacılar tarafından 'multipleks PCR yöntemi ile iki ayrı panel altında primer çifti kullanılarak yapılan bir çalışmada *A.fumigatus* (385 bp), *C.albicans* (273 bp), *C.glabrata* (423 bp), *C.parapsilosis* (320 ve 300 bp), *C.tropicalis* (357 bp) ve *C.neoformans* (136 bp)'de saptanmıştır.<sup>4</sup>

Moleküler yöntemlerin uygulandığı çalışmalardan anlaşıldığı gibi, araştırmacılar mantara ait genetik materyeli saptamak için var olan çeşitli yöntemlerden, kendi koşullarına uygun olanlarını yeğlemişlerdir. Bu çalışmada, DNA'nın saptanması amacı ile ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır.

Genel primerler ile yapılan PCR testi sonucunda kültürleri olumlu bulunan 30 (%15) örneğin tümünün mantar DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. Mikroskopi, kültür ve PCR olumlu on (%5); mikroskopi olumsuz kültür ve PCR olumlu 20 (%10) örnek saptanmıştır. PCR olumlu kültür olumsuz örnek saptanmamıştır.

Çalışmada, ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5,8S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinden çoğaltılan genel ve türe özgü primerlerin kullanılması sonucunda mantarlara özgü genel primer (550 bp) ve türe özgü primerlerin kullanılması ile: *C.albicans* (273 bp), *C.parapsilosis* (320 bp), *C.tropicalis* (357 bp), *C.krusei* (360 bp), *C.dublinsiensis* (950 bp)'de bant saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir.<sup>4,5</sup>

Bu çalışmada saptanmış olan %100 duyarlılık oranının Skladny ve ark.<sup>20</sup> ve Hayette ve ark.<sup>21</sup>'in verileri ile tamamen; >%90 değer bildiren Li ve ark.<sup>19</sup> ve Chang ve ark.<sup>3</sup>'ün sonuçları ile de yüksek oranda benzer olduğu; özgüllük oranının (%100) ise diğer araştırmacılarca bildirilen %96, %89 ve %87.5'dan<sup>19,20,21</sup> daha yüksek olduğu görülmüştür.

Mantar infeksiyonlarının görülme sıklığının artması ve antifungallerin yaygın kullanılması, tedavi sırasında dirençlerin görülmeye başlamasına neden olmuştur. Direnç sorunu nedeni ile direnç mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır. Antifungal direnç çok faktörlü özelliklere bağlıdır. Direnç; in-vitro, moleküler ve klinik olarak üç başlık altında toplanabilir. Antifungal dirençte olası mekanizmaları araştırmak için mantarların tanısı ve identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerin birçoğu kullanılmaktadır. Ayrıca antifungal ilaçlara direnç, duyarlılık ve benzer suşlar arasında farklılığın tanımlanmasında da çeşitli moleküler yöntemlerden (RFLP, karyotiplendirme, RAPD ve çeşitli PCR) yararlanılmaktadır.<sup>22</sup>

Azollerin hedefi olan 14 alfa demetilaz enziminin kodlayan gen ERG11'dir. Gelişen direnç mekanizmaları çoğunlukla bu enzimle ilgilidir. Mayalarda ERG11 olarak bilinen lanosterol 14 alfa demetilaz enzimi fungal canlılık için gereklidir. Bu enzim lanosterolün ergosterole dönüşümünde lanosterol ve diğer sterol prekürsörlerinden monooksidasyon tepkimesi ile 14 alfa metil grubunun uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Enzimin flukonazol ile inhibisyonu, 14 alfa metil grubunun hidrosilasyonu için gereken oksijen aktivasyonunu engellemektedir. Bunun sonucunda lanosterol ve 14 alfa metil steroidlerin birikimi ve ergosterol tüketimi ile hücre ölümü gerçekleşir.<sup>23</sup> Ayrıca hedef enzimin alfa heliks veya beta zincir gibi yapılarında oluşan mutasyonlar nedeniyle meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu bağlanmalar etkilenerek afinite azalması ile direnç gelişmektedir. Bir çalışmada, flukonazole direnç gelişiminde etkili olan ERG11 mutasyonlarının oranı %20 olarak bildirilmiştir.<sup>24</sup>

Çalışmamızda seçilen uygun primerler ile BamHI ve Sal I enzimleri kullanılarak RFLP uygulanmış, yapılan analizler sonucunda dirençli bir suşta 600 bp'lik bant saptanırken, 29 suşta bant görülmemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada geleneksel yöntemler ile identifikasyonu 4-5 gün gibi bir süreyle

kapsayan ve flukanazole intrensek direnç gösteren yaşamsal önemi olan *C.krusei*'nin, PCR yöntemi uygulanarak, hızlı tanısı başarıyla gerçekleştirilmiştir. *C.albicans* gibi klamidospore oluşturan; asimilasyon fermentasyon testleri ile kesin tanısı yapılamayan, ancak antifungal dirençliliği *C.albicans*'tan daha fazla olduğu bilinen *C.dubliniensis*'in de PCR optimizasyonu sağlanmış, türe özgü primerler kullanılarak bir tek PCR ile Candida türlerinin identifikasyonunun yapılabileceği gösterilmiştir. RFLP ve E-test yöntemlerine göre dirençli olarak saptanan 102 nolu örneğin referans genlerden X13296 geni ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Farklı görülen nükleotidlerin aminoasitlere çevrildiğinde, 153 ve 266 nolu aminositlerinin farklı olduğu saptanmıştır. Referans AF153845 no'lu suşa ait duyarlı olarak bildirilen 153 no'lu amino asitte E D ve 266'ncı amino asitte ise D E mutasyonu görülmüştür. Saptanan mutasyonlardan, E153D; Marichal,<sup>25</sup> D266E ise Löffler'in<sup>26</sup> yayınları ile uyum göstermektedir. Saptanan E153D mutasyonu birinci bölgede olup substrat veya inhibitör giriş kanalına yakın olduğundan azollerin bağlanma afinitelerini etkilemektedir. Azollerin afinitesinde oluşan etkilenmenin; ya ilacın girişini doğrudan etkileyerek ya da mutasyonlara bağlı helikal yapıda oluşan değişiklikler nedeni ile olduğu bildirilmiştir.<sup>25</sup>

Doza bağlı duyarlı suşların saptanmasında; kullanılan E-testin yanısıra sekans çalışmaları da yapılarak, amino asit mutasyonunun olup olmadığı araştırılmıştır. Ülkemizde bu tip çalışmaların sürdürülmesi ve epidemiyolojik olarak antifungal direnç genlerinin saptanması, antifungal direnç mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacak, özellikle ağır mikoz tablosu gösteren immün sistemi baskılı hasta grubunun daha hızlı ve doğru tedavisinde klinisyene de büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

\*Bu çalışma TÜBİTAK tarafından (Proje No:107S449) desteklenmiş ve 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur, Poster No.166 (Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 7-11 Kasım 2010)

**Teşekkür:** Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesini yapan Doç. Dr. Halim İşsever'e teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Hazen KC, Howell SA. Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of



- Clinical Microbiology, 8th edn.” ASM Press, Washington, 2003:1693-710.
2. Kurtz MB, Cortelyou MW, Kirsch DR. Integrative transformation of *Candida albicans*, using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol Cell Biol* 1986;6(1):142-9.
  3. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3466-71.
  4. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR., *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2860-5.
  5. Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2590-2.
  6. Sanglard D, Bille J. Current understanding of the modes of action and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections, “Calderone RA (ed): *Candida and Candidiasis*, 1th edn” kitabında ASM Press, Washington, 2002:349-83.
  7. Whelan WL, Partridge RM, Magee PT. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* 1980;180(1):107-13.
  8. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1174-83.
  9. Arıkan S. Fungal hastalıklarda genomik ve proteomiklerin yeri ve önemi. *ANKEM Derg* 2009;23(Ek 2): 53-6.
  10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard 3rd edn, CLSI Document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008;28(14).
  11. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(4):798-804.
  12. Alpar R. Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik, 2. Baskı, s.219-55, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul (2001).
  13. Günalp A. Gen ve Moleküler Biyoloji, 1<sup>st</sup> edn, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1965;1:226-63.
  14. Hawthorne DC, Mortimer RK. Chromosome mapping in *Saccharomyces* centromere-linked genes. *Genetics* 1960;45(8):1085-110.
  15. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1454-9.
  16. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd edn, John Wiley&Sons, New York, 1995:642-50.
  17. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.
  18. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3293-8.
  19. Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22(11):693-6.
  20. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR., *J Clin Microbiol* 1999;37(12):3865-71.
  21. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2001;39(6):2338-40.
  22. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(2):382-402 .
  23. Haitao Ji, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y. A three-dimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* 2000;43(13):2493-505.
  24. Favre B, Didmon M, Ryder NS. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 1999;145(10):2715-25.
  25. Marichal P, Koymans S, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC and Vanden Bossche H. Contribution of mutations in the-111 cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg 11p, Cyp 51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 1999;145: 2701-13.
  26. Löffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of cyp 51 from fluconazole resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997;151:263-8.