

İMMUNSUPRESE HASTALARDA MANTAR İNFEKSİYONLARI TANI TESTLERİNDE LÖKOSİT/NÖTROFİL SAYISININ ÖNEMİ

Nilgün IŞIK*, Rosemary BARNES**

ÖZET

Mantar infeksiyonları özellikle hematolojik maligniteli hastalar ve transplantasyon hastaları gibi immunsuprese hastalarda yaygın olarak görülmektedir. İnfeksiyonun ileri evrelerinde akciğer, bronşlar ve kalp dahil birçok organ hızla tutularak, hastaların kısa sürede kaybedilmeleri söz konusudur.

Bu çalışma İngiltere'de Wales Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünde yapılmıştır. İmmunsuprese hastalarda öncelikli olarak düşük lökosit sayısı, nötropeni tablosu ve kalıcı >38°C ateşli olan olgularda mantar infeksiyonlarından şüphe edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda mantar infeksiyonlarının, lökosit ve nötrofil sayısı ile ilişkisini; hem nötropenik olmayan ve lökosit sayısı yüksek olan hastalarda bu infeksiyonun tesbit edilip edilemeyeceği, hem de lökosit sayısı azlığının yanlış negatifliğe yol açıp açmadığı araştırılmıştır. Bu nedenle, değişik oranlarda lökosit sayısına sahip kan örnekleri incelenmiştir. 30°C'de 72 saat inkübe ederek ürettiğimiz *Aspergillus fumigatus* suşu kullanılarak, kan örnekleri içine mililitrede 104 CFU (Colony Forming Unit) olacak şekilde mantar süspansiyon serileri hazırlanmış; hazırlanan bu kan örneklerinden DNA izolasyonu Qiagen kitiyle yapılmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen PCR'ı takiben mantar DNA'ları içerdiği belirlenen örneklerin sekans analizleri yapılarak *A.fumigatus*'a ait genetik materyal içerip içermedikleri araştırılmış ayrıca Real-time PCR ile DNA miktar tayinleri yapılmıştır. Nötropenik olmayan, >38°C ateşli ve mantar infeksiyonları açısından risk grubunda bulunan 50 kişilik hasta grubuna yapılan PCR sonucunda dört hastada, *Aspergillus* ve *Candida* infeksiyonları saptanmıştır. PCR sonuçları sekanslama yapılarak analiz edildiğinde, *Aspergillus* ve *Candida* infeksiyonları ayrımı yapılabilmektedir. Aynı hasta örneklerine yapılan mikolojik kültür sonuçları negatif bulunmuştur.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, agaroz jelde klasik PCR ve Real-time PCR ürünleri bantları arasında bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca kantitatif Real-time PCR sonuçlarında, her örneğin testte kullanılan standartlardan olan 10⁴ CFU/ml'lik değerlere yakın düzeylerde sonuç verdiği bulunmuştur. Böylece yüksek ve düşük lökosit/nötrofil sayısına sahip kan örneklerinin tamamı, yaptığımız testlerde pozitif olarak bulunmuştur. Bu durum testlerin güvenilir sonuçlar verdiğini ve lökosit/nötrofil sayısının test sonuçlarını etkilemediğini göstermektedir. Moleküler biyolojik yöntemler uygulanarak nötropenik olmayan hastalarda belirlenen *Aspergillus* ve *Candida* infeksiyonları göz önüne alındığında; immunsuprese hastalar için, mantar infeksiyonu varlığını düşündürecek klinik bulgulardan biri olan, nötropeni durumu oluşmadan, hasta örneklerinin güvenilir yöntemlerle test edilmesi gerektiği saptanmıştır. Ayrıca mantar infeksiyonları erken tanısında klasik PCR gibi Real-time PCR'ında güvenilir erken tanı testi olarak kullanılabilmesi anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Mantar infeksiyonları, PCR, lökosit/nötrofil sayısı

SUMMARY

Importance of the leukocyte/neutrophil count in diagnostic tests for fungal infection in immunosuppressed patients. Fungal infections are commonly seen in immunosuppressed patients such as patients with hematological malignancies and transplantation patients. In further stages of infection most of the organs are involved such as lung, bronchi and heart and patients may die in a short period.

This study was done in University of Wales College of Medicine Department of Microbiology in England. Fungal infections are suspected in immunosuppressed patients who have low leukocyte count, neutropenia and persistent fever over 38°C. For this reason in our study relationship between fungal infections and leukocyte and neutrophil count was investigated. In patients who are not neutropenic and whose of leukocyte count is elevated, the determination of this infection and whether low leukocyte count may cause false negativity or not are investigated. For this reason blood samples of different leukocyte counts are examined. By using *A.fumigatus* species produced by incubation for 72 hours at 30°C fungus suspension series of 10⁴

CFU/ml were prepared in to blood samples. DNA isolation from these blood samples was done by Qiagen kit. Sequence analysis of the positive samples (fungal DNA) was done following PCR. They were investigated whether they contained genetic material from *A.fumigatus* or not and DNA quantitation by Real-Time PCR was done. As a result of PCR performed on a group of 50 patients who are not neutropenic and have fever over 38°C and at risk of fungal infections, *Aspergillus* and *Candida* infections was observed in four patients. PCR results were analyzed by sequencing for discriminating *Aspergillus* and *Candida* infections. All sample results were found negative by mycological culture.

When the results were interpreted there was no difference between classical PCR and Real-Time PCR product bands in agarose gel. In quantitative Real-Time PCR results, every sample gave results similar to standards of 10⁴ CFU/ml values, which was used in the test. All of the blood samples, which have high and low leukocyte/neutrophil count, were found positive in our tests. This condition shows that the tests gave reliable results and leukocyte/neutrophil count did not affect test results.

Considering *Aspergillus* and *Candida* infection positivities that we have found in non-neutropenic patients by using molecular biological methods; for immunosuppressed patients, before neutropenic condition is established, blood samples of the patients should be tested by reliable methods. As a result, in early diagnosis of fungal infections, like classical PCR, Real-Time PCR was found to be valuable as a reliable early diagnostic test.

Key words: Fungal infections, PCR, leukocyte/neutrophil count

GİRİŞ

Mantarlar doğada ve çevremizde (toprak, toz, hava, bitki ve besinler) yaygın olarak bulunan organizmalardır. Dolayısıyla mantar infeksiyonları solunum yoluyla; akciğer, bronşlar ve kalp dahil birçok organa hızla yayılarak hastaların kısa sürede kaybedilmelerine sebep olabilmektedir. İmmüsuprese hastalarda, özellikle kalıcı yüksek ateşli ve nötropenik olgularda mantar infeksiyonları, morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Bu hastalarda erken tanı ve uygun tedavinin erken dönemde uygulanması çok önemlidir. Son yıllarda mantar infeksiyonları tanısında, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan ve kısa sürede sonuç veren moleküler biyoloji yöntemleri kullanıma girmiştir. PCR'a dayalı bu tekniklerin en önemli özelliği incelenen örnekteki genetik materyalin çoğaltılmasıdır. İncelenen örnekteki hedef genetik materyalin miktarının bilinmesi bu hastaların tedavilerinin düzenlenmesinde gerekli olan bir bulgudur. Bu amaçla geliştirilen kantitatif PCR sistemleri içinde en yeni ve en çok tercih edilen sistem Real-time PCR'dir. Real-time PCR'da test sırasında fluoresansı izleyebilen optik bir düzenek ve sadece çift zincirli DNA'ya bağlanan ve bu sırada fluore-

sans veren Sybr-Green I gibi fluoresan boyalar kullanılmaktadır (1,4,6,8,11).

Bu çalışmada, immüsuprese hastalarda mantar infeksiyonları tanı testlerinde kullanılan örneklerin lökosit ve nötrofil sayılarının, DNA izolasyonu ve PCR sonuçlarını etkileyip etkilemediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada mantar elemanlarını içerdiği bilinen, düşük ve yüksek lökosit/nötrofil sayılı kan örneklerinden yapılan DNA izolasyonunu takiben polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanmış ve sekans analizlerinin yanısıra Real-time PCR ile DNA miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuçta duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olan bu moleküler biyoloji yöntemleri uygulanarak hem lökosit ve nötrofil sayısının test sonuçlarını etkileyip etkilemediği hem de bu hücrelerin sayısı yüksek olan olgularda mantar infeksiyonlarının belirlenebilirliği araştırılmıştır. Aynı zamanda mantar infeksiyonları açısından risk grubunda olan ve nötropenik olmayan fakat >38°C ateşli 50 hastada PCR ile *Aspergillus* infeksiyonu araştırılmıştır.

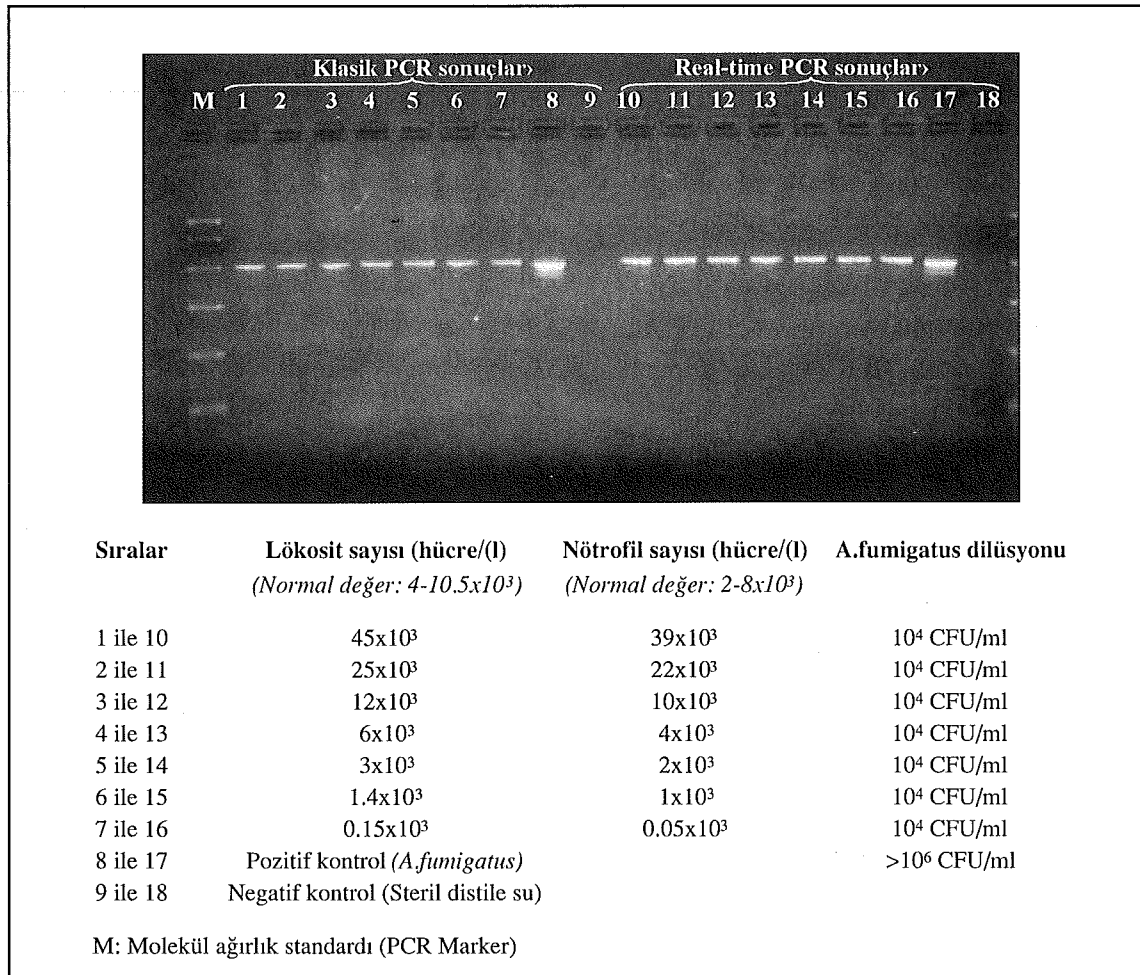
Mantar Kültürü. Wales Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan *Aspergillus fumigatus* suşu Sabouraud Dextroz Agar (SDA)'da 30°C 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra steril tuzlu su ile 10^6 ile 10^1 CFU/ml arasındaki dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan mantar DNA izolasyonu yapılarak, Real-time PCR'da standart olarak kullanılmıştır (7,10).

Kontroller. Testte oluşabilecek kontaminasyonu tesbit için steril distile su veya sağlıklı gönüllülerden alınan kandan izole edilen DNA negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak *A.fumigatus* suşu ($>10^6$ CFU/ml) kullanılarak izole edilen DNA kullanılmıştır (7,10).

Nötropenik olmayan hastalar. Nötropeni tablosu oluşmamış fakat $>38^\circ\text{C}$ ateşi olan 50 kişilik hasta grubundan alınan 2 ml EDTA'lı kan kullanılarak, mantar infeksiyonları PCR ve Real-time PCR uygulanarak değerlendirilmiştir (6,7,10).

Örneklerin hazırlanışı. Deneylerde 45×10^3 , 25×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , 1.4×10^3 ve 0.15×10^3 hücre/ μl oranlarda lökosit içeren kan örnekleri ile çalışılmıştır. Aynı örneklerin nötrofil sayıları sırasıyla; 39×10^3 , 22×10^3 , 10×10^3 , 4×10^3 , 2×10^3 , 1×10^3 , 0.05×10^3 hücre/ μl 'dir. Lökosit sayısı normal değeri $4-10.5 \times 10^3$ hücre/ μl ve nötrofil sayısı normal değeri $2-8 \times 10^3$ hücre/ μl 'dir. *A.fumigatus* kültürü dilüe edilerek, hazırlanan kan örneklerine 10^4 CFU/ml olacak şekilde ilave

Resim 1. Klasik PCR ve Real-time PCR sonuçları



edilmiştir. Daha sonra bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır.

DNA izolasyonu. Kan örneklerinin, negatif kontrolün, pozitif kontrolün ve Real-time PCR'da kullanılacak standartların DNA izolasyonu Qiagen kitiyle (Qiagen, Germany) de, kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. DNA izolasyonu için önce eritrositlerin lizisi (10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl solüsyonuyla), sonra lökositlerin lizisi (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl ve 200 µg proteinaz K solüsyonuyla) yapılmıştır. Örnekler 300 µg/ml'lik lyticase enzimi ile inkübasyondan sonra Qiagen kit kolonlarından süzümüştür. DNA'lar ependorf tüplerine toplanarak PCR ve Real-time PCR'ları yapılmıştır (6,7,10).

PCR. PCR için mantar türlerine özgü 18S rRNA genine spesifik primerler seçilmiştir. PCR miksi içine en son örneklerin ilavesinden sonra termal cyclerde 35 döngülük (30 sn 94°C, 1 dk 62°C, 2 dk 72°C) PCR yapılmıştır. Agaroz jelde mantar ürünlerine ait 500 bp'lik band veren PCR ürünlerinin varlığı pozitif sonucu göstermiştir (11).

Real-time PCR. Sistemde ısıyı çabuk ileten cam kapiller tüpler kullanılmıştır. Amplifikasyonun her döngüsü bilgisayarda görüntülenmektedir. Ayrıca alette fluoresansı ölçebilen optik bir düzenek bulunmaktadır. Testte Sybr-Green I boyası kullanılmıştır ve reaksiyon hacmi 10 µl'dir. 35 döngülük amplifikasyon programını takiben sonuçlar 30 dk'da alınabilmektedir. PCR sonrası ürünler agaroz jelde görüntülenmiştir (6).

BULGULAR

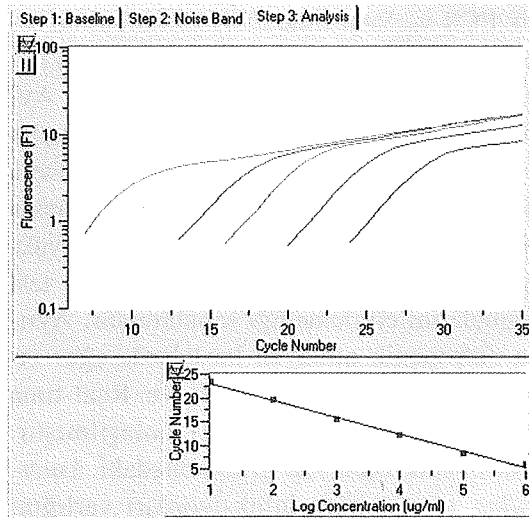
Çalışmamızda değişik oranlarda lökosit içeren kan örnekleriyle *A.fumigatus* suşu kullanılarak yapılan 10⁴ CFU/ml'lik mantar süspansiyon serilerinden, DNA izole edilmiştir. Daha sonra yapılan PCR'ı takiben tüm örnekler agaroz jelde görüntülenmiştir. Jelde tüm örneklerin pozitif band olarak kabul edilen, mantar türlerine özgü amplifikasyon

ürünlerine ait 500 bp'lik bandı verdikleri saptanmıştır. Örneklerin Real-time PCR sonuçları ise testte kullanılan standartlarla karşılaştırıldığında, tüm örneklerin beklenildiği üzere 10⁴ CFU/ml'lik standarda yakın düzeyde sonuç verdiği saptanmıştır. Ayrıca nötropenik olmayan 50 kişilik grupta ise 4 hastada mantar infeksiyonu saptanmıştır. Bunların 3'ünde *A.fumigatus* 1'inde ise *C.albicans* infeksiyonu tespit edilmiştir. Real-time PCR ve klasik PCR sonuçları resim 1'de gösterilmiştir. Ayrıca şekil 1'de Real-time PCR standart eğrisi ve grafiği, şekil 2'de ise tüm örnek sonuçları standart grafiği üzerinde gösterilmiştir. Tüm örnek sonuçları şekil 2'de görüldüğü gibi 10⁴ CFU/ml'lik standarda yakın sonuçlar vermiştir.

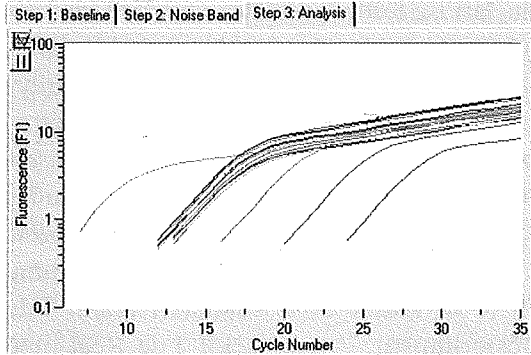
TARTIŞMA

Günümüzde mantar infeksiyonlarının, özellikle yoğun ilaç tedavileri uygulanan, kemik iliği nakli yapılmış hastalar, kanserli hastalar ve immun sistemi baskılanmış hastalarda daha sık görüldüğü bilinmektedir. İmmunsuprese hastalarda, özellikle nötropenik ve kalıcı ateşi olan vakalarda mantar infeksiyonlarından şüphe edilmektedir. Bu hastalarda morbidite ve mortaliteyi arttıran mantar infeksiyonlarının erken tanısı ve böylelikle er-

Şekil 1. Real-time PCR standart eğrisi ve grafiği (10⁶-10¹ CFU/ml)



Şekil 2. Real-time PCR standart grafiği üzerinde tüm örnek sonuçları



ken tedavi çok önemlidir. Son yıllarda mantar infeksiyonlarının tanısında da duyarlık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilen moleküler biyolojik teknikler kullanılmaktadır (2,3,12). Kawamura ve arkadaşlarının (5) yaptıkları bir çalışmada, *Aspergillus* infeksiyonlarının tanısında ELISA ve galaktomannan testleri ile PCR karşılaştırıldığında, PCR'in erken tanı için daha etkili yöntem olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, yine PCR'in diğer klasik kültür tekniklerinden çok daha duyarlı ve özgül olduğu bildirilmektedir (9). Biz de çalışmamızda mantar infeksiyonları tanısı amacıyla klasik PCR ve Real-time PCR tekniklerini kullandık. Testlerin güvenilir sonuçlar verdiğini görmek amacıyla *Aspergillus* içerdiği bilinen örnekler (10^4 CFU/ml) test edilmiştir ve tüm sonuçlar pozitif bulunmuştur. Bu bulgular klasik PCR ve Real-time PCR tekniklerinin erken tanıda kullanılabileceğini ve yalancı negatif sonuç vermediğini göstermektedir. Ayrıca lökosit ve nötrofil sayısının test sonuçları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla değişik oranlarda lökosit ve nötrofil sayısına sahip kan örnekleri test edilmiş sonuçta yüksek ve düşük lökosit/nötrofil sayısının test sonuçlarını etkilemediği saptanmıştır. Ayrıca nötropenik olmayan hastalarda eğer infeksiyon varsa bunun PCR ve Real-time PCR'la tespit edilebileceği anlaşılmıştır. Nötropenik olmayan grubumuzdaki *Aspergillus* ve *Candida* infeksiyonları varlığını

da gözönüne aldığımızda, mantar infeksiyonu riski taşıyan hastalarda hastanede kalış süreleri içinde, nötropeni durumu oluşmasa da eğer yüksek ateşli iseler, mantar infeksiyonları erken tanısı ve buna bağlı olarak da erken tedavi protokollerinin düzenlenmesi amacıyla bu hastalara belirli aralıklarla testlerin yapılması ve bu tür çalışmaların sayılarının artırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aronoff SC: *Aspergillus*. "Nelson Textbook of Pediatrics, editörler: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, 16th edition, Philadelphia, WB Saunders Company (2000), sayfa: 937.
2. Bodey GP, Bueltmann WD, Gibbs D, et al: Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:99(1992).
3. Bretagne S, Costa JM, Marmarat-Khuang A, Poran F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J: Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 33:1164 (1995).
4. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35:1353 (1997).
5. Kawamura S, Maesaki S, Omagari K, Hashiguchi K, Tomono K, Tashiro T, Kohro S: Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed early by polymerase chain reaction assay. *Intern Med* 38:744 (1999).
6. Loeffler J, Hanke N, Hebart H, et al: Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* 38:586 (2000).
7. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H: Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 35:3311 (1997).
8. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 40:358 (1994).
9. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Specific detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species from respiratory specimens by polymerase chain reaction. *Jpn J Med Sci Biol* 47:141 (1994).
10. Sklandiy H, Buchheldt D, Baust C, et al: Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 37:3865 (1999).
11. Spreadbury C, Holden D, Aufaure-Brown A, Bainbridge B, Cohen J: Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:615 (1993).
12. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bauden RA: Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 36:1169 (1998).