

## İnvaziv Fungal Enfeksiyonların Tanısında In-House Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Değerlendirilmesi

<sup>1</sup>Müge Aslan, <sup>1</sup>Yasemin Öz, <sup>1</sup>Filiz Akşit, <sup>2</sup>Meltem Olga Akay

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

<sup>2</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir

\*email: [mduzceker@ogu.edu.tr](mailto:mduzceker@ogu.edu.tr)

**ÖZET:** Son yıllarda invaziv fungal enfeksiyonların sıklığı bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak artmakta, önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Hastaların prognozunda erken tedavinin etkisi bilinmekle birlikte, mikroskopik inceleme ve kültür gibi yöntemlerin tanıdaki yetersizlikleri nedeniyle, genellikle mümkün olamamaktadır. Bu nedenle invaziv fungal enfeksiyonların erken tanısına yönelik kültür dışı yöntemleri içeren çalışmalar gündeme gelmiştir. Çalışmamızda febril nötropenik hematolojik maligniteli hastalarda invaziv fungal enfeksiyonların (İFE) tanısında in-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında hematolojik malignite nedeniyle hastanemiz Hematoloji Servisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde takip edilen İFE açısından riskli hastalar EORTC/MSG kriterlerine göre proven, probable ve possible İFE olarak sınıflandırıldı. Hastaların serum örneklerinden ticari ekstraksiyon kiti (Qiamp DNA minikit) ile DNA izolasyonu sonrasında panfungal primerler kullanılarak amplifikasyon uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Toplam 99 hastanın 161 febril nötropenik epizodundan 358 hasta serumu elde edildi, bunların 12'sinde (%3.35) fungal DNA saptanmış olup proven ve probable İFE olarak tanımlanan 18 epizodun 3 (%16.66)'ünde, düşük olasılıklı İFE grubunda 60 epizodun 4'ünde (%6.6) 500-550 baz çiftlik bölgede bant görülmüş olup pozitif değerlendirilmiştir. Çalışmamızda düşük duyarlılık oranları saptanmış olup amplifikasyon şartları ve PCR reaksiyon miksine değişiklikler yapılarak yöntem tekrarlandığında da beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Bununla birlikte, moleküler testlerde standardizasyonun sağlanması, çevre şartlarından daha az etkilenen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek standardize ticari kitlerin geliştirilmesi İFE tanısına önemli katkı sağlayacağından, benzer araştırmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Febril nötropeni invaziv fungal enfeksiyon, in-house PCR, tanı.

### EVALUATION OF IN-HOUSE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSIS OF INVASIVE FUNGAL INFECTION

**ABSTRACT:** The incidence of invasive fungal infection (IFI) has increased over the last years, especially in immunocompromised patients with high mortality and morbidity rates. Although, early diagnosis such as conventional approaches, including direct microscopic examination and cultivation, diagnosis is difficult because these methods low sensitivity rates of diagnosis of IFI. In recent years, molecular diagnostic techniques have been developed, including polymerase chain reaction (PCR). Between January 2011 and January 2012; febrile neutropenic patients with haematologic malignancies followed in haematology and bone marrow transplantation units were included in the present study. Patients were classified by the European Organization for the Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group criteria as proven, probable and possible IFI. DNA extraction from serum samples was performed using the commercial extraction kit (Qiamp DNA minikit), after isolation of DNA amplification performed with panfungal primers. PCR products visualized using agarose gel electrophoresis. This study was conducted with 358 serum samples obtained from 99 patients 161 febrile neutropenic episodes. Of the samples 12 (3.35%) were found positive by PCR. In the results, 500-550 base-paired (bp) bands obtained with

universal primers were evaluated as fungal DNA positivity. Episodes with proven and probable IFI 16.66%, possible IFI 6.6% positive results detected. In presented study lower sensitivity rate is determined, when the PCR amplification conditions and reaction mix changed and method repeated but expected results are not obtained. However the standardization of molecular tests is required; such as less affected by environmental conditions and high sensitivity and specificity rates, and standardized commercial kit will contribute significantly for diagnosis IFI. We think that, similar large scale evaluations required in future.

**KEYWORDS:** Diagnosis, febrile neutropenia, invasive fungal infection, in-house PCR.

## 1. Giriş

Son yıllarda invaziv fungal enfeksiyon (İFE) sıklığı bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak artmakta ve özellikle bu hasta grubunda önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Hematolojik maligniteli hastalara uygulanan yoğun kemoterapi rejimleri ve kök hücre transplantasyonunu takiben uygulanan immünsüpresif tedaviler bu hasta grubunu invaziv fungal enfeksiyonlar için riskli hale getirmektedir ve en yüksek risk taşıyan grup yoğun kemoterapi sonrası uzun süreli nötropenisi olan hastalardır. Bu hastalarda, başta *Aspergillus* türleri olmak üzere, özellikle küf mantarlarına bağlı invaziv enfeksiyonların görülme sıklığı artmaktadır (1,2).

Hastaların prognozunda erken tanı ve tedavinin direkt etkili olduğu bilinmekle birlikte, mikroskopik inceleme ve kültür gibi geleneksel yöntemlerin tanıdaki yetersizlikleri nedeniyle, genellikle mümkün olamamaktadır. İnvaziv fungal enfeksiyonların kesin tanısında altın standart yöntem steril vücut sıvıları ya da doku örneklerinde mikroskopik olarak mantar elemanlarının gösterilmesi ve aynı örneklerde etkenin üretilmesidir. Ancak bu hasta grubunda sıklıkla ortaya çıkan trombositopeni ve genel durum bozukluğu gibi nedenlerle invaziv tanı yöntemlerinin genellikle uygulanamaması ve kültür sonuçları alınana kadar geçen süre tedavide önemli aksaklıklara yol açmaktadır. Kan kültürleri ve bronkoalveolar lavaj kültürleri hastalığın ilerlemiş aşamalarında pozitifleşmektedir. Doku örneklerinin zor elde edilmesi, balgam, lavaj, kan gibi diğer klinik örneklerin duyarlılık ve özgüllüklerinin yetersizliği, yeni tanı yöntemleri arayışına yol açmıştır. Yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografi (YRBT) gibi radyolojik yöntemlerle tanıyı destekleyen bulgular (halo, nodül, kavitasyon gibi) sağlansa da, bunlar invaziv fungal enfeksiyona özgül değildir. Bu

nedenle özellikle bu grup hastalarda invaziv fungal enfeksiyonların erken tanısına yönelik invaziv prosedürler içermeyen, hızlı, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek tanı yöntemleri tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (3).

Son yıllarda İFE' nun erken tanısı amacıyla kültür dışı tanı testleri gündeme gelmiş ve moleküler yöntemlerle mantar DNA'sının saptanmasına yönelik çalışmalarda önemli gelişmeler gözlenmiştir. Nükleik asit tespitine dayalı moleküler yöntemlerin klinik kullanımları, yüksek maliyetleri ve deneyimli personel ihtiyacı nedeni ile sınırlı olmakla beraber, bu yöntemler giderek önem kazanmaktadır (4,5). Bu nedenle çalışmamızda hematolojik maligniteli febril nötropenik hastalarda İFE'un erken tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntemler

Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında hematolojik malignite nedeniyle hastanemiz Hematoloji Servisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde takip edilen, İFE açısından riskli febril nötropenik hastalar bu çalışmaya dahil edildi. Hastalar, Avrupa Kanser Araştırma Merkezi ve Mantar Çalışma Grubu (EORTC/MSG) kriterlerine göre proven (kanıtlanmış), probable (yüksek olasılıklı) ve possible (düşük olasılıklı) İFE olmak üzere üç gruba ayrıldı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan febril nötropenik epizodları boyunca haftada iki kez olmak üzere kan örnekleri toplandı, serumlarına ayrıştırılarak PCR uygulanmak üzere -70°C'de saklandı. Aynı örneklerden eş zamanlı olarak galaktomannan antijen testi de çalışıldı. Serum örneklerinden DNA izolasyonu, ticari bir ekstraksiyon kiti (Qiamp DNA minikit) ile kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Panfungal universal primerler

(5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG ve 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG) kullanılarak thermal cycler (Veriti, Applied biosystems) cihazında amplifikasyon uygulandı. PCR karışımı, toplam hacim 25 µl olacak şekilde; 1 µl (~1 ng) DNA, 20 mM tris-HCl (pH: 8.4), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (her biri için 0.25 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 µmol primer ve 0.5 U Taq polimeraz ile hazırlandı. PCR döngüsü 95°C'de 2 dakika (1 döngü), 95°C'de 60 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 90 saniye (40 döngü) ve 72°C'de 5 dakika (1 döngü) olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforetik olarak 100 volt altında yaklaşık 30 dakika yürütüldü ve bantlar 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe görüntülendi.

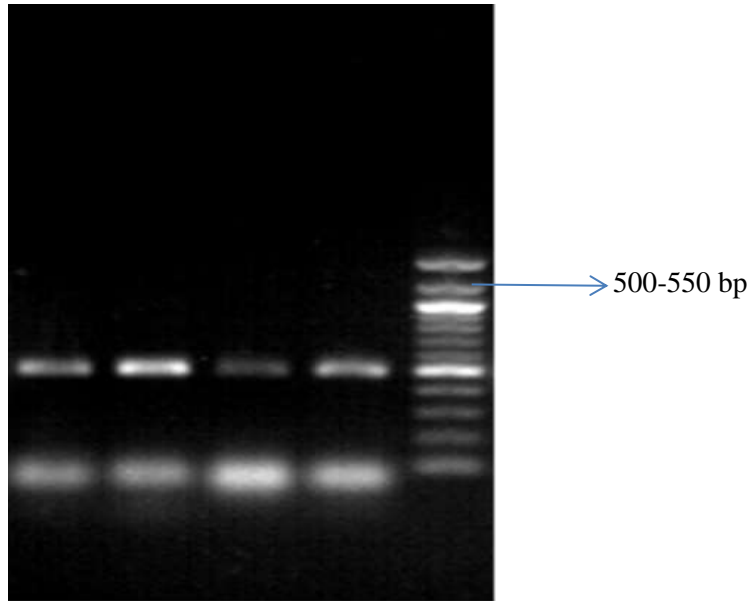
### 3. Bulgular

Ocak 2011- Ocak 2012 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji servisi ve Kemik iliği transplantasyon ünitesinde takip edilen ve İFE açısından riskli toplam 99 hastanın 161 febril nötropenik epizodu izlenmiş ve toplam 358 serum örneği elde edilmiştir. EORTC/MSG kriterlerine göre İFE açısından bu epizodlar

sınıflandırılmıştır; 1 epizod kanıtlanmış İFE, 17 epizod yüksek olasılıklı İFE, 60 epizod düşük olasılıklı İFE ve 83 epizod İFE olmayan (kontrol) olarak sınıflandırılmıştır.

Antifungal tedavi (ampirik/preemptif); 106 (%65.8) febril nötropenik atakta mevcut antibakteriyel tedaviye sonradan eklendi. Yedi atakta kaspofungin, 13 atakta lipozomal amfoterisin B kullanılırken 3 atakta amfoterisin B deoksikolat, 22 atakta vorikonazol tedavisi başlandı.

Tüm hasta örneklerinin 12'sinde (%3.35) fungal DNA (tek örnekte) saptanmış olup, kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı İFE olarak sınıflandırılan 18 epizodun 3 (%16.66)'ünde, düşük olasılıklı İFE epizodlarının 4'ünde (%6.6) fungal DNA saptanmıştır. Fungal DNA saptanan 5 epizod ise İFE olmayan grupta yer almaktaydı. Buna göre duyarlılık % 8.97, özgüllük % 93.97, PPD % 58.33, NPD % 52.34 ve doğruluk % 52.79 olarak saptanmıştır. Şekil 1'de 4 farklı hastanın 4 epizodundan elde edilen serum örneklerinin jel elektroforez işlemi sonrası oluşan bantlar görülmektedir. Örneklerle ait jel görüntüsünde yaklaşık 500-550 baz çift (bp)'lik bölgede bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Jel elektroforez görüntüsü M, 100bp DNA marker; 1, Düşük olasılıklı İFE; 2, Kanıtlanmış İFE; 3 ve 4, Yüksek olasılıklı İFE.

#### 4. Tartışma

Mantarlar, immün düşkün konakta gelişen invaziv enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, yüksek riskli hematolojik maligniteli hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Bu hastalarda erken tanı hayati önem taşır ve tanıda klinik bulgular, histopatolojik inceleme, görüntüleme yöntemleri ile mikrobiyolojik testler birlikte değerlendirilmelidir.

Klinik ve radyolojik bulguların özgül olmaması, kültür ve mikroskopi gibi geleneksel yöntemlerin duyarlılığının düşük olması yüksek mortalite ile seyreden İFE'nun erken tanısında yaşanan önemli sorunlardır. Bu nedenle örnek almak için invaziv prosedür gerektirmeyen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hastalığı erken dönemde saptayabilecek hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu amaçla son yıllarda mantar antijenlerinin, metabolik ürünlerinin ya da DNA'sının saptanmasına yönelik serolojik ve moleküler tanı yöntemlerine olan ilgi artmıştır (6,7).

Enfeksiyon tanısında kullanılmak üzere çeşitli moleküler yöntemler bulunmakla birlikte, amplifikasyona dayanan PCR temelli teknikler, klinik örneklerde bulunabilecek az miktardaki (1-10 fentogram / 1-5 cfu/ml) mantar DNA'sını bile saptayabildiklerinden İFE tanısında daha fazla ilgi çekmektedirler. Duyarlılığın yüksek olması ve kısa sürede sonuç vermesi açısından PCR'in çeşitli formatları bu amaçla kullanılmıştır. Moleküler yöntemlerin en önemli avantajlarından biri de, yaklaşık 4-6 saat içinde sonuç verebilmeleridir (6). PCR'nin kullanımını değerlendiren çalışmalarda örnek tipi (serum, BAL, tam kan), ekstraksiyon protokolü (enzimatik, mekanik, otomatize, ticari kit vb), amplifikasyon sistemi (nested, in-house), protokol (gerçek zamanlı, kantitatif ve in house), hedeflenen gen bölgesi (18S rRNA, 28S rRNA vb) ya da primer seçimi (türe özgül, genusa özgül ya da panfungal) gibi çok sayıda faktörde büyük çeşitlilik gözlenmektedir (6,8). Sonuç olarak, fungal nükleik asitlerin saptanmasına yönelik testler, şimdilerde en fazla ilgi çeken ve neredeyse en hızlı ilerleme kaydeden fungal tanılal alanı oluşturmakla birlikte, bu alanda hala belirli sınırlamalara sahiptir ve henüz hiçbir moleküler test,

EORTC/MSG invaziv fungal enfeksiyon tanı kriterleri arasında yer alamamıştır.

Khot ve Fredricks (9) 1999-2009 yılları arasındaki 10 yıllık dönemde fungal enfeksiyonların tanısı için yapılmış PCR'a dayalı çalışmaları değerlendirdikleri yazılarında duyarlılık ve özgüllük aralıklarını invaziv aspergilloz için %55-100 ve %63.5-100 ve invaziv fungal enfeksiyonlar için %75-100 ve %70-98 bildirmişlerdir. Ülkemizde Kalkancı ve arkadaşları (10) ise nötropeni olan 49 hastanın kan örneklerinde PCR ile mantar DNA'sı araştırmışlar, 7 (%14.2)'sinde panfungal primerlerle ve 5 (%10.2)'inde Candida primerleriyle olumlu sonuç bildirmişlerdir. Susever ve arkadaşlarının çalışmasında panfungal primerler ile yapılan PCR sonucunda, örneklerin %54'ünde mantar DNA'sı saptanmıştır (11). Babouee ve ark. 23 hastadan elde edilen 34 klinik biyopsi örneğini değerlendirdikleri çalışmada ise panfungal PCR'ın duyarlılığını %69 özgüllüğünü %62.5 olarak bildirilmişlerdir (12). Klinik örneklerde mantarların moleküler tanısı ile ilgili yapılan birçok çalışmada da, PCR temelli yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük oranları ile ilgili bildirilen farklı sonuçlara rağmen, geleneksel yöntemlere göre daha yüksek olduğu konusunda görüş birliği vardır (13-15).

Çalışmamızda ise amplifikasyon aşamasında ilk uygulamalarda termal siklus şartlarının oluşturulmasıyla ilgili sorunlar yaşanmış olup farklı denemelerle optimizasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Amplifikasyon şartları ve PCR reaksiyon karışımı içeriğinde değişiklikler yapılarak yöntem tekrarlanmış olmakla birlikte beklenen sonuçlar elde edilememiş, saptanan düşük duyarlılık ve özgüllük oranları nedeniyle İFE'un hızlı tanısında bu şartlarda kullanıma uygun olmayabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte çalışmamız, kanıtlanmış ve yüksek olasılıklı epizodların sınırlı sayıda olması ve tür ya da genus spesifik primerlerin kullanılmamış olması gibi sınırlamalara sahiptir. Panfungal primerlerin kullanımı herhangi bir fungal enfeksiyonun saptanabilmesi açısından yeterli performansa sahip olmakla birlikte, spesifik bir etkenin saptanması açısından yetersizdir. İnvaziv kandidoz tanısında PCR'ın kullanımının

değerlendirildiği bir analizde, kandideminin kanıt düzeyine göre duyarlılık ve özgüllük oranlarının değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (16).

İFE tanısı ile ilgili çalışmaların birçoğu kanıtlanmış ya da yüksek olasılıklı İFE hastalarını kapsadığından, bizim sonuçlarımızdaki düşük performans sonuçlarının kanıt düzeyi düşük hastalarımızın sayıca fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca in-house PCR testlerinde, mantar DNA'sının kısa yarı ömrü, DNA'nın geçici olarak kanda bulunması, antifungal profilaksi nedeni ile fungal yükün azalması, ekstraksiyonun etkinliği, kullanılan amplifikasyon yönteminde başarısızlık gibi nedenlerle yalancı negatiflikler gözlemlenmekte, testlerin uygulanması ve sonuçların yorumlanması da deneyim gerektirmektedir (17). İn house PCR'in real-time PCR'a göre daha ucuz olması, cihaz ve kit bağımlılığı gerektirmemesi gibi avantajları yanında kontaminasyon riskinin yüksekliği, emek yoğun olması, daha uzun zamanda sonuçlanması, sağlıklı kantitasyon yapılamaması, analitik özgüllüğünün düşüklüğü ve çok sayıda hasta örneğinin aynı anda çalışılmaması önemli dezavantajlarıdır. Bunun yanında, real-time PCR testlerinin kullanıldığı çalışmalarda belirgin olarak çok daha yüksek performans oranları bildirilmektedir (18). Bu yönden değerlendirildiğinde standardize edilmiş bir real-time PCR testinin rutin laboratuvar uygulamalarında tanı amaçlı kullanım için

daha uygun olacağı düşüncesindeyiz. Bu konuda en önemli gayreti Avrupalı araştırmacılar göstermişlerdir; Aspergillus-PCR testlerinin standardizasyonuna yönelik ISHAM bünyesinde 2006 yılında "European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI)" çalışma grubu oluşturulmuş ve son yıllarda testlerin standardizasyonuna yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Antifungal tedavi ekstraksiyon üzerinde etki yapmasa da, fungal yükü azaltarak yalancı negatif PCR sonucuna yol açabileceği, etkili bir ekstraksiyon yöntemi ve örnek miktarının artırılması ile antifungalın test üzerine etkisinin azaltılabileceği bildirilmiştir (17). Çalışmamızda antifungal kullanımı olmayan 6 epizodda in-house PCR pozitifliği saptanmaz iken, tek antifungal kullanımı olan 40 epizodun 3'ünde, iki ve üzeri antifungal kullanımı olan 32 epizodun 4'ünde PCR pozitif olarak belirlenmiştir. Antifungal kullanımı ile PCR pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p=0.634$ ).

Moleküler testlerin rutin kullanıma girebilmesi için bu testlerin standardizasyonunun sağlanması, duyarlılıklarının artırılması ve iyi belirlenmiş hasta grupları ile daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Çevre şartlarından daha az etkilenen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek moleküler yöntemlerin geliştirilmesi İFE'nin tanısına önemli katkılar sağlayacağından, benzer araştırmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Washinton Winn Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, United States of America: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Murray RP, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry LM.(2009). *Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Atlas Kitapçılık.
3. Stevens David A. (2002). Diagnosis of fungal infectious: current status. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49(1): 11-19.
4. Richardson MD, Kokki M. (2003). *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone.
5. Patterson TF. (2010). *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7. Ed). Philadelphia: Churchill Livingstone.
6. Zeichner Ostrosky L. (2012). Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. *The American Journal of Medicine*,125, 14-24.
7. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhaegen J, Boogaerts M, Van Eldere J. (2005). Galactomannan and computed tomography based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1242-1250.
8. Bretagne S. (2011). Primary diagnostic approaches of invasive aspergillosis molecular testing. *Medical Mycology*, 49(1), 48-53.
9. Khot PD, Fredricks DN. (2009). PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7(10), 1201-1221.

10. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (Eds), (2002). *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda invazif mantar enfeksiyonlarının tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması, Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar*. Eskişehir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No: 43. OGÜ Basımevi.
11. Susever S, Yeğenoğlu Y. (2011) İnvazif Mantar Enfeksiyonlarının Tanımlanmasında Moleküler Yöntemlerin Öneminin Konvansiyonel Yöntemler ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 45(2), 325-335
12. Babouee B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D, Sadowski-Cron C, Bubendorf L, Savic Prince S, Battegay M, Frei R, Weisser M. (2013). Prospective study of a panfungal PCR assay followed by sequencing, for the detection of fungal DNA in normally sterile specimens in a clinical setting: a complementary tool in the diagnosis of invasive fungal disease? *Clinical Microbiol Infect*, 19, 354-357
13. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol*, 39(10), 3617-3622.
14. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. (2001). Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol*, 39(10), 3466-3471.
15. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F. (2003). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol*, 41(7), 3293-3298.
16. Avni T, Leibovici L, Paul M. (2011). PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 49, 665-670.
17. White PL, Barton R, Guiver M, Linton JC, Wilson S, Smith M, Gomez BL, Carr MJ
18. Cruciani M, Mengoli C, Loeffler J, Donnelly P, Barnes R, Jones BL, Klingspor L, Morton O, Maertens J. (2015). Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev*. Sep 7;9:CD009551. [Epub ahead of print]