

FEBRİL NÖTROPENİLİ HASTALARDA KANDİDAYA ÖZGÜL TAQ-MAN PZR'İN İNVAZİV FUNGAL İNFEKSİYON TANISINDAKİ DEĞERİ*,**

Fatma BUDAK*, Sema KEÇELİ ÖZCAN*, Birsen MUTLU**, Haluk VAHABOĞLU**

*Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe, KOCAELİ
**Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Umuttepe, KOCAELİ

ÖZET

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izlenen, 3 gün antibakteriyel tedaviye yanıt vermeyen, European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) kriterlerine göre olası ve yüksek olasılıklı fungal infeksiyonu düşünülen febril nötropenik hastalarda, Taq-Man Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (Taq-Man PZR) ile *Candida* türlerinin varlığı araştırılmıştır. 2002-2004 yılları arasında 33 hastadan, 8'i pediyatrik olmak üzere 34 serum örneği alınmıştır. Tüm mantar türlerinde ortak olan 5.8S ve 28S rDNA'ya yönelik primerler ve tüm *Candida* türlerini saptamaya yönelik probe (All-CAN-TET) kullanılmıştır. Serum örnekleri, primer ve SYBR Green I boyası kullanılarak gerçek zamanlı PZR metodu ile tekrar edilmiştir.

Bu yöntem ile sadece bir (% 2.9) rabdomiyosarkomlu çocuk hastada *Candida* DNA'sı saptanmıştır. Hiç bir hastanın kan kültüründe üreme olmamıştır.

İnvaziv kandidozun tanısında kültür ve serolojik testler ile birlikte hastalığın erken döneminde yapılan *Candida* özgün PZR testi prognoz ve tedavide yol gösterici olacaktır.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*, febril nötropeni, polimeraz zincir reaksiyonu, Taq-Man PZR

SUMMARY

The Value of *Candida* Specific Taq-Man PCR in Diagnosis of Invasive Fungal Infections of Febrile Neutropenic Patients

In the febrile neutropenic patients who were not responsive to antibiotic therapy for three days and suspicious of probable and high risk fungal infection were investigated for the presence of *Candida* spp. by Polymerase Chain Reaction (PCR) according to European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG). Totally 34 serum samples (8 pediatric) from 33 febrile neutropenic patients followed in the University Hospital of Kocaeli University were collected from 2002 to 2004. *Candida* DNA was investigated by Taq-Man PCR using common fungal primers that detect 5.8S and 28S rDNA and a probe (ALL CAN-TET) that detects all *Candida* spp. All serum samples were also studied by real-time PCR using primer and SYBR Green I dye. *Candida* DNA was positive only in one (2.9 %) pediatric patient with rhabdomyosarcoma. There was no growth in blood cultures of patients. In the diagnosis of invasive candidiasis, *Candida* specific PCR tests which were carried out at early stages with culture and serologic tests will be helpful in prognosis and treatment.

Keywords: *Candida albicans*, febrile neutropenia, polymerase chain reaction, Taq-Man PCR

Yazışma adresi: Fatma Budak, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe Kampüsü, KOCAELİ
Tel.: (0262) 303 75 42, GSM: (0505) 593 97 85
e-posta: fatma.budak@isbank.net.tr
Alındığı tarih: 21.12.2006, revizyon kabulü: 31.01.2007

*Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Merkezi (Proje no.2003/41) tarafından desteklenmiştir.

**XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları (KLİMİK 2005) Kongresi'nde sunulmuştur (16-20 Kasım 2005, Antalya)

GİRİŞ

İnvaziv mantar infeksiyonları, özellikle transplant ve hematolojik kanser hastaları olmak üzere önemli morbidite ve mortalite nedenidir. İnvaziv mantar infeksiyonu etkeni olarak nötropenik hastalarda en sık *Candida* türleri gözlenmektedir^(8,13). İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının tanısı kan kültürü, serolojik olarak *Candida* mannan antijenin gösterilmesi, histopatolojik preparatlarda *Candida*'ya ait hif, psödohif veya blastokonidiumların görülmesi, radyolojik olarak özgül görüntülerin saptanması ve klinik bulguların varlığı ile konmaktadır. *Candida* türleri kan kültürlerinin % 8-15'inden izole edilmektedir. Son yıllarda, kültürde üretilemeyen mantar infeksiyonu etkenlerinin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi önemli avantajlar getirmiştir.

Bu çalışmada, hastanemizde yatan invaziv mantar infeksiyonu şüphesi olan febril nötropenili hastalarda bir gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi olan Taq-Man PZR ile *Candida* DNA'sının gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular: Vücut ısısı oral veya aksiller tek sefer 38.3°C ve üstü veya bir saat süreyle 38°-38.2°C arası olarak ölçülen ve nötrofil düzeyi 500/mm³ altında olan hastalar febril nötropenik olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group (EORTC/MSG) rehberine göre sınıflandırılmıştır⁽²⁾. Buna göre; en azından bir konak kriteri ve infeksiyon ile ilişkili bir klinik kriteri (mikrobiyolojik kriter yok) olan hastalar olası veya düşük olasılıklı invaziv fungal infeksiyon (İFİ) olarak değerlendirilmiştir. Bunlardan toplam 34 serum örneği alınmıştır. Kocaeli Üniversitesi Etik Kurul Onayı alınmıştır.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji-Onkoloji Servisi'nde 2002-2004 yılları arasında izlenen, febril nötropenik atak geçiren ve antibiyotik tedavisine ya-

nıt vermeyen 7 hastadan, birinden iki olmak üzere, 8 kan örneği alınmıştır. Yedi hastamızın 3'ünde akut lenfoblastik lösemi (ALL), 2'sinde rabdomiyosarkom, birinde akut miyeloblastik lösemi (AML), birinde non-Hodgkin lenfoma tanısı konmuştur. Hastaların atakları sırasında sefepim, karbapenem ve seftazidim, gerektiğinde glikopeptid ve antifungal kombinasyonları uygulanmıştır.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Servisinde 2002-2004 yılları arasında izlenen febril nötropenik atak geçiren 26 hastadan kan örneği alınmıştır. Hastaların 20'sine hematolojik malignensi, 6'sına AML tanısı konmuştur. Yirmialtı hastaya febril nötropeni atağı sırasında piperasilin/tazobaktam+amikasin, gerektiğinde glikopeptid ve antifungal kombinasyonları uygulanmıştır.

Kan kültürü: Üç gün antibiyotik tedavisi sonunda, ateşi halen düşmeyen hastalardan antifungal tedaviye başlamadan kan örneği alınarak BACTEC (9050 B-D, Maryland, ABD) kan kültür şişelerine ekim yapılmıştır. Alınan kanın 5 ml'si 15000 g'de 10 dak. santrifüj edilerek serumu ayrılıp çalışma yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Hemolizli serum örnekleri çalışma dışı bırakılmıştır.

DNA izolasyonu: Serumlardan ve pozitif kontrollerden fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır⁽¹⁴⁾. Serum miktarına eşit hacimde lizis tampon [6 M guanidyum siyanat 50 mM Tris-HCl (pH:8), % 20 sarkosil, 5 M sodyum asetat] konularak 10 dak. kaynar su banyosunda tutulmuştur. Üzerine fenol kloroform/izoamil alkol konmuş ve 10 dak. 14000 g'de santrifüje edilmiştir. Daha sonra süpernatant alınmış ve üzerine izopropanolol eklenerek 15 dak. oda ısısında beklenmiştir. Tekrar 10 dak. 14000 g'de santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine % 70 alkolden 1 ml konularak 5 dak. 14000 g'de santrifüje edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelet oda ısısında 5 dak. kurutularak 30 µl TE tamponu ile çözülmüştür .

Taq-Man PZR yöntemi: Tüm mantar türlerinde ortak olan 5.8S ve 28S rDNA'ya yönelik primerler ITS3 (5'GCATCGATGAAGAACG-

CAGC-3') ve ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(18) ve tüm *Candida* türlerini saptamaya yönelik prob All-CAN-TET (5'TET-AGG-GCATGCCTGTTTGAGCGTC3'-P-TAMRA)(15) kullanılarak Taq-Man PZR (Techne, Quantica) yöntemi ile *Candida* DNA'sı araştırılmıştır. Her kuyucuğa 5 µl örnek DNA'sı, 25 µl Taq-Man PZR karışımı konmuştur. Her reaksiyonda *C.albicans* ATCC 90028, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.papillaris* ATCC 22019 suşları 10⁶ hücre/ml'den, 10¹ hücre/ml'e kadar seri sulandırılmış ve bu sulandırmalardan izole edilen DNA'lar standart olarak kullanılmıştır. Sağlıklı kişilerin serumuna, kontrol suşlarının dilüsyonları direkt olarak konmuştur. Her reaksiyonda negatif kontrol eklenmiştir. Tüm örnekler, primer ve SYBR-Green I boyası kullanılarak gerçek zamanlı PZR metodu ile tekrar çalışılmıştır. PZR sonuçları kan kültür sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamıza alınan hastaların 34'ü EORTC/MSG rehberine göre olası İFİ olarak değerlendirilmiştir. Rabdomiyosarkomlu bir çocuk hastada Taq-Man PZR ve SYBR-Green ile gerçek zamanlı PZR yöntemiyle *Candida* DNA'sı saptanmıştır (% 2.9). Bu hastada mutlak nötrofil sayısı 10/mm³ olarak bulunmuş, akciğer mayenesinde raller duyulmuş ve *Streptococcus pneumoniae* bakteriyemisi saptanmıştır. Hasta teikoplantin ve lipozomal amfoterisin-B tedavisi görek şifa ile taburcu edilmiştir. Taq-Man PZR ile kontrol suşlarının dilüsyonları direkt konduğunda 10³ hücre/ml'ye kadar pozitiflik gözlenirken, DNA izolasyonu sonrası 10⁴ hücre/ml'e düşmüştür.

Hiçbir hastanın kan kültüründe üreme saptanmamıştır.

TARTIŞMA

İnvaziv mantar infeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Bu nedenle, bu hasta grubunda mantar infeksiyonlarının erken tanı

ve tedavisi hayat kurtarıcı olmaktadır. İnvaziv mantar infeksiyonlarının etkeni olan mantarlar, sıklık sırasına göre *Candida* ve *Aspergillus* ve dimorfik mantar türleridir. İnvaziv mantar infeksiyonlarının tanısında geleneksel yöntemler olan mikroskopik inceleme, kan kültürü, antijen veya antikor tayini gibi yöntemler kullanılmaktadır(4,12). Ayrıca, bütün infeksiyon hastalıklarının tanısında olduğu gibi mantar infeksiyonlarında da moleküler yöntemler kullanılarak önemli gelişmeler kaydedileceği vurgulanmıştır(1). Bununla birlikte, moleküler yöntemler geleneksel yöntemleri tamamlayıcı teknikler olarak kabul edilmektedir. *Candida* PZR yöntemi tanı amaçlı olarak az sayıda bazı üniversite hastanelerimizde kullanılmaktadır.

1990'ların başından itibaren, immünsüprese hastalarda *Candida* infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemler araştırma laboratuvarların deneyimi olarak sunulmaya başlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, pozitif kan kültür şişelerinde uygulanan PZR-EIA (Enzim Immün Assay) yöntemi ile *Candida* pozitifliği % 42.4 oranında bulunmuştur(15). Hematolojik maligniteli hastaların febril nötropenik atakları sırasında alınan serum örneklerinde restriksiyon enzim analizine dayanan PZR yöntemi ile % 43 oranında *Candida* pozitifliği bulunmuştur(13). Bu yöntemin yüksek negatif prediktif değeri bulunmuştur (% 97.5). Başka bir çalışmada ise invaziv mantar infeksiyonu olan 36 hastanın 214 serum örneğinde % 14.9 oranında *Candida* gerçek zamanlı PZR pozitifliği (duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 97) bulunmuştur(17). Einsele ve ark.(5) *Candida* ile kolonize olan hastalarda, 28S rRNA'ya yönelik moleküler prob kullanılarak PZR ile % 1.5 oranında pozitiflik saptamışlardır. Bu yöntemin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 98 olarak belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemleri kısa sürede sonuç vermesi ve fungal yükün saptanması ile tedavinin izlenmesi açısından önemlidir(10). Ayrıca gerçek zamanlı PZR ile yapılan bir çalışmada *Candida* spp. için amplifikasyonun % 100 spesifik olduğu belirtilmiştir(9). Ülkemizde yapılan bir çalışmada gerçek zamanlı PZR ile bağışıklık sistemi baskılanmış 50 hasta serumunun % 26'sında fungal patojen pozitifliği saptanmıştır(6). Işık ve ark.(7)

gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanarak SYBR-Green I boyası ile hastaların % 25'inde DNA miktarının arttığını gözlemişlerdir.

Çalışmamızda *Candida*'ya özgün prob ve mantarlara yönelik primerler ile Taq-Man PZR yöntemi çalışıldıktan sonra primerlerle SYBR-Green I boyası kullanılarak örnekler tekrar çalışılmıştır. Her iki yöntemle de rabdomiyosarkom tanılı febril nötropenili bir (% 2.9) pediatrik hastada pozitiflik bulunmuştur. Çalışmamızdaki bu düşük pozitiflik oranı, belki hasta sayımızın az oluşu; hastalarımızdan doğru zamanda örnek alınmaması veya antifungal tedaviye erken başlanması veya kültür pozitifliğinin olmaması nedeniyle olabilir. Ayrıca hasta sayısını arttırmak özellikle yüksek olasılıklı İFİ hasta grubunu çalışmaya almak bize yol gösterici olacaktır. Düşük pozitifliğin bir başka nedeni de, örnek olarak serumun tercih edilmesi olabilir. Yapılan bir çalışmada, kandidemi tanısında kullanılacak klinik örneğin serum veya kan mı olacağı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır⁽³⁾. Buna göre, yapılan bazı çalışmalarda; tam kan örneğinde, hücre içeren pelet hazırlanarak mantar DNA'sının araştırılmasının daha duyarlı olduğu gösterilmiştir⁽¹⁶⁾. Bunun dışında hastamızda örnek alınması sırasında deriden kontaminasyon, laboratuvarında çalışılan ortamda kullanılan laboratuvar malzemelerinden dolayı yalancı pozitiflik de söz konusu olabilir. Morace ve ark.⁽¹³⁾'ün çalışmasında bu oran % 25 olarak bulunmuştur. Bunun için negatif kontrol sayısını arttırmak ve malzemeleri ultraviyoleye tutmak gereklidir.

Günümüzde moleküler yöntemlerin kullanımında bazı standardizasyon sorunları yaşanmaktadır. Bunların ilki uygulanan yöntemin doğrudan kendisinin zayıf yönlerinden, diğeri ise *Candida*'nın genom yapısından kaynaklanır⁽¹¹⁾. Gerçek zamanlı PZR yöntemi, ancak nisal moleküler biyoloji laboratuvarında yapılabilmektedir ve bu konuda eğitim almış elemanlara gereksinim vardır. Ayrıca, ökaryotlarda görülen doğal rekombinasyonlardan dolayı oluşan allelik değişkenlikler sonucu ve *Candida*'ların dimorfik yapıda olmalarından kaynaklanan sorunlar vardır. Bunun yanında gerçek zamanlı PZR yöntemi ile uyumlu olan çeşitli ticari man-

tar DNA izolasyon yöntemleri vardır⁽¹¹⁾.

Erken tanı ve tedavinin prognoza etkisini izlemek invaziv mantar infeksiyonu olan hastalarda hayat kurtarıcıdır. Tanının erken yapılması sonucu toksik yan etkileri olabilen antifungal tedaviye karar vermek daha gerçekçi olacaktır. İnvaziv kandidozun tanısında kültür ve serolojik testler ile birlikte hastalığın erken döneminde yapılan *Candida* özgün PZR testi prognoz ve tedavide yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alexander BD: Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory, *Transplant Infect Dis* 2002;4(Suppl 3):32-7.
2. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B et al and Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases: Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus, *Clin Infect Dis* 2002;34(1):7-14.
3. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J et al: Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR, *J Clin Microbiol* 1999;37(4):925-30.
4. Brandt ME, Warnock DW: Laborator aspects of medical mycology, "Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds): *Clinical Mycology*" kitabında s.1-22, Oxford University Press, New York (2003).
5. Einsele H, Hebart H, Roller G et al: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes, *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1353-60.
6. Işık N, Ağaçıdan A, Ağırbaşı H ve ark: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda real time polimeraz zincir reaksiyonu ile mantar infeksiyonlarının tanı ve takibi, *İnfeksiyon Derg* 2004;18(1):79-84.
7. Işık N, Mills K: Using PCR and Real-Time PCR (Light Cycler) for diagnosis and follow up of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies and transplantation, *Turk J Haematol* 2003;20(2):63-8.
8. Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ et al: PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis infection in neutropenic patients, *J Clin Pathol* 1998;51(9):652-6.
9. Klingspor L, Jalal S: Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real time PCR, *Clin Microbiol Infect* 2006;12(8):745-53.
10. Loeffler J, Hebart H, Henke N, Schmidt K, Einsele H: Quantification and specification of fungal DNA in clinical specimens using the light cycler instrument, "Reischl U, Witter C, Cockerill F (eds): *Rapid Cycle Real-Time PZR. Methods and Applications*" kitabında s.179-86, Springer Verlag,

- New York (2002).
11. Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F: Comparison of different methods of isolation DNA of commonly encountered *Candida* spp. and its quantitation by using a real-time PCR-based assay, *J Clin Microbiol* 2004;42(7):3159-63.
 12. McLintock LA, Jones BL: Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients, *Br J Haematol* 2004;126(3):289-97.
 13. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M et al: PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies, *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1871-5.
 14. Sandhu GS, Kleine BC, Stockman L, Roberts GD: Molecular probes for diagnosis of fungal infections, *J Clin Microbiol* 1995;33(11):2913-9.
 15. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ: Rapid identification of *Candida* species from blood culture using a clinically useful PCR method, *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1454-9.
 16. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V: The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing, *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):126-46.
 17. White PL, Archer AE, Barnes R: Comparison of non-culture based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections, *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2181-7.
 18. White TJ, Burns TD, Lee SB, Taylor JW: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, "Innis MA, Helmand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): *PCR Protocols*" kitabında s.315-22, Academic Press Inc, San Diego (1990).