

ID32 C Kiti ile *Candida Albicans* Olarak Saptanan İzolatların PCR ve Klasik Yöntemler ile Yeniden Adlandırılması

USE OF PCR AND CLASSICAL METHODS IN CONFIRMING THE IDENTITY OF CANDIDA ALBICANS ISOLATES IDENTIFIED BY ID32 C

Gülendam BOZDAYI*, Ayşe KALKANCI*, Aydan BİRİ***, Semra KUŞTİMUR***

* Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,

** Prof.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,

***Doç.Dr., TCDD Ankara Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, ANKARA

Özet

Amaç: Değişik kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen ve ID32 C kiti ile *Candida albicans* olarak adlandırılan mayaların PCR ve klasik yöntemler kullanarak doğrulamasını yapmayı amaçladık.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı.

Materyal ve Metod: Çalışmamıza, laboratuvarımıza gönderilen örneklerden maya izole edilen 16 kan, 14 vajen, 2 idrar, 1 kist sıvısı, 1 intraabdominal sıvı örneği dahil edilmiştir. ID32 C, kitin özel skalası doğrultusunda çalışılmıştır. PCR ise *Candida albicans*'ın EO3 geninden seçilen 125 baz çifti içeren bir diziyi hedef alan primerler kullanılarak yapılmıştır. PCR ile negatif bulunan mayalar sukroz özümleme, trehaloz özümleme ve 42°C'de üreme özelliklerine göre tekrar değerlendirilmiştir.

Bulgular: ID32 C ile pozitif olan 34 mayanın 26 (%77)'sında PCR ile pozitif bulunmuştur. Yapılan klasik testlerin sonucuna göre PCR negatif olan 8 mayanın 4'ü *C. stellatoidea*, 4'ü *C.albicans* olarak tesbit edilmiştir. Kullanılan primerler sadece *C.albicans* suşlarını amplifiye edebildiğinden sonuçta pozitiflik oranının %86'ya yükseldiği görülmüştür.

Sonuç: Sonuçlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ID32 C ile *C.albicans* olarak tanımlanan mayaların bir kısmının *C.stellatoidea* olarak tesbit edilmiş olması nedeniyle PCR yönteminin tanımlamada daha spesifik olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: ID32 C, PCR, Klasik yöntemler, *C.albicans*

T Klin Mikrobiyoloji-Enfeksiyon 2003, 2:1-5

Summary

Purpose: The aim of this study was to evaluate the PCR and classical methods in confirming the identity of *Candida albicans* isolates identified by ID32 C kit.

Institution: University of Gazi, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology and Department of Gynecology and Obstetrics.

Material and Method: Isolated yeasts from 16 blood, 14 vaginal, 2 urine, 1 cyst fluid and 1 intraabdominal fluid samples were included in this study. ID32 C, was studied according to kits special scala. We used a pair of primers, amplifying 125 base pairs of EO3 gene of *Candida albicans* for PCR. Sverose and trehalose assimilation, and growth characteristic at 42°C were reevaluated for PCR negative isolates.

Results: The PCR test results were found to be positive in 26 (%77) of 34 yeast isolates identified as *C.albicans* by ID32 C. Four of 8 PCR negative *C.albicans* isolates were identified as *C.stellatoidea* and 4 were as *C.albicans* by using classical methods. Since our primers can only amplify *C.albicans*, the positivity of PCR in this study was 86%.

Conclusion: Since some of the yeasts which have been identified as *C.albicans* by ID32 C, were found to be *C.stellatoidea* later, PCR technique may be more specific for identification, although the difference between results were not statistically significant.

Key Words: ID32 C, PCR, Classical methods, *C.albicans*

T Klin J Microbiol-Infec 2003, 2:1-5

Candida'lar deri, ağız ve vajen mukozası ile bağırsak lümeninin düzenli flora elamanı olan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır. Tüm öteki fırsatçı patojenler gibi belirli hazırlayıcı faktörlerin yardımı ile hafiften en ağır sistemik enfeksiyonlara

kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler (1). Sistemik kandidoz, morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek yaygın bir nosokomial enfeksiyon tablosudur (2). Vulvovajinal kandidoz (VVK), bir maya mantarı olan *Candida*'nın kadın dış genital organla-

rında yaptığı enfeksiyondur ve tüm vulvovajinitlerin %30'unu oluşturur (3).

Candida'ların tür seviyesinde tanımlanmaları için uygulanan klasik yöntemler zaman alıcı, zahmetli ve bazen de uygulayan kişinin yorumuna bağlı olarak değişik sonuçlar verebilen testlerdir. Hızlı tanımlama yöntemleri bu nedenler ile gündeme gelmiştir ve kısa süre içerisinde rutin kullanıma girmeye başlamıştır. Ancak bu yöntemlerde de, primer seçimi, DNA eldesi, DNA'nın çoğaltılması gibi aşamalarda problemler halen yaşanabilmektedir. Bunların sonucunda yalancı negatiflik ve yalancı pozitiflik gibi sorunlar çıkmaktadır. Fakat primer seçiminin, DNA'nın elde edilmesi ve çoğaltılması işlemlerinin doğru yapılması durumunda güvenilirlik oranı %100'lere kadar çıkmaktadır (4).

Biz bu çalışmada değişik kliniklerden gelen ve ID32 C kiti ile *Candida albicans* olduğu tesbit edilen maya izolatlarının PCR ve klasik yöntemler kullanılarak yeniden adlandırılmasını yapmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya laboratuvarımıza gönderilen örneklerden maya izole edilen 14 vajen, 16 kan, 2 idrar, 1 kist sıvısı ve 1 intraabdominal sıvı dahil edilmiştir. Elde edilen mayalar çalışma zamanına kadar saklanmak amacıyla SDA'a pasajlanıp +4°C'de saklanmışlardır.

ID32 C

Çalışma için stokta bekletilen maya izolatları yeniden SDA besiyerine pasajlandıktan sonra 24 saatlik koloniler, kitin özel solüsyonu içerisinde Mc Farland 1'e göre sulandırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100µl konulmuş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda kitin özel skalası doğrultusunda değerlendirilmişlerdir.

PCR

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

DNA Ekstraksiyonu: Van burik ve ark. (6)'nın, Einsele ve ark. (7)'dan modifiye ettikleri yöntem üzerinde bazı değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. SDA besiyerinde üreyen mayalar distile su içerisinde Mc Farland 1 (10^{16}) olacak şekilde hazırlanmış ve her bir süspansiyondan 300µl alınarak üzerine 900µl lizis buffer-1 (10mM Tris[pH 7.6], 5mM MgCl₂, 10mM NaCl) eklenerek elde edilen süpernatant atılmıştır. Çökeltinin üzerine 100µl lizis buffer-2 (10mM Tris[pH 7.6], 10mM EDTA [pH 8], 50mM NaCl, %0.2 SDS, 200 µg/ml proteinaz K) ve daha sonra lizis buffer-3 (50mM Tris[pH 7.6], 1mM EDTA, 2-merkaptotanol, 2U/100µl litikaz) eklenerek sferoblastlar oluşturulmuştur. %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenen sferoblastların üzerine 5M potasyum asetat ilave edilerek buz üzerinde 25 dakika bırakılmıştır. Proteinler çöktürülmüş üst sıvı alınarak üzerine eklenen izopropilalkol ve etil alkol ile DNA'lar çöktürülmüştür.

Çoğaltma (amplifikasyon): PCR reaksiyon karışımı, PCR tampon 10X, MgCl₂, Taq polimeraz (5U), dNTP (4mM), primer CAL 1 ve primer CAL2 ve volümü tamamlamak amacıyla distile su eklenerek hazırlanmıştır. Yukarıda elde ettiğimiz DNA'dan 5 µl PCR reaksiyon karışımına eklenerek Thermal cycler cihazına yerleştirilerek program çalıştırılmıştır. Thermal cycler, 94°C'de 4 dakika bir siklus, 94°C'de 30 saniye, 56°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika olmak üzere 35 siklus, 72°C'de 5 dakika 1 siklus olacak şekilde programlanmıştır (8).

Görüntüleme: 10µl PCR ürünü %2 agaroz jel içinde elektroforez cihazında 100V da 40 dakika 1XTBE (Tris-borate-EDTA) tamponda yürütülüp, etidyum bromür ile boyanmıştır. Daha sonra UV transluminatörde bantlar görüntülenmiştir.

Sukroz Özümleme Deneyi

Wickerham karbonhidrat besiyerine (Bromkrezol moru [%1.16], 1/10 N NaOH ve agar), %1'lik sukroz çözeltisi eklenerek hazırlanmış olan tüplere, kolonilerden ekim yapılarak 10 gün 26° C'de inkübe edilmiştir (9).

Trehaloz Özümleme Deneyi

Wickerham'ın özümleme besiyerine (Yeast nitrogen base agar) maya süspansiyonu yayıldıktan sonra hazırlanan trehaloz diskleri yerleştirilerek yapılmış ve 7 güne kadar 26°C'de inkübe edilmiştir (9).

42 °C'de Üreme:

SDA plaklarına maya kolonileri ekilerek 42°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir (10).

Bulgular

Hızlı tanı kitlerinden biri olan ID32 C (bioMerieux, Fransa) ile *Candida albicans* olarak tanımlanan suşların tümüne *Candida albicans*'a spesifik primerler kullanılarak yapılan in-house

PCR sonucunda 34 mayanın 26 (%77)'si pozitif olarak bulunmuştur. PCR sonuçlarını gösteren jel fotoğrafı Şekil 1'de gösterilmiştir. PCR'ı negatif bulunan 8 örneğe *C.albicans* ve *C.stellatoidea* ayırımı için sukroz özümleme deneyi, *C.albicans*, *C.dublinskiensis* ayırımı için trehaloz özümleme deneyi ve 42°C ısı toleransı deneyi yapılmıştır. Sukroz özümleme deneyi sonucunda vajen kaynaklı mayanın her 2'si (%100) kan kaynaklı 6 mayanın 2'si %33 *C.stellatoidea* olarak tanımlanmıştır. Bu şekilde isimlendirilemeyen kan kaynaklı 4 mayanın trehaloz özümleme deneyi ve 42°C ısı tolerans deneyine göre *C.dublinskiensis* olmadıkları tesbit edilmiştir. ID32 C ile isimlendirilmiş mayaların, diğer testler ile elde edilen sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tartışma

Farklı hasta gruplarında etken patojen olan *Candida* türleri özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış konakçıda hızlı şekilde tanımlanmalıdır (11). Klinik örnekten ilk izolasyon 24-48 saatlik inkübasyonu gerektirir. Ayrıca tür seviyesinde tanımlama için ikinci bir 24-48 saatlik inkübasyona ihtiyaç duyulmaktadır (12). Bu çalışmada kullanılan ID32 C, piyasada bulunan hızlı tanı kitleri içerisinde en fazla şeker parametresi içeren, farklı mayaları tanımlayabilir niteliktedir (13). Bu kitlerin doğruluğunu test eden az sayıda çalışma vardır (14-17). Bu eksikliğin giderilmesi için son yıllarda moleküler yöntemler, özellikle de PCR konusunda yoğun çalışmalar bulunmaktadır (18).

Bulgularda bildirildiği gibi 34 *C.albicans* örneğinin 8 tanesi PCR ile negatif sonuç vermiştir.

Şekil 1. *C.albicans*'a spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının görüntülenmesi. Fotoğrafta görüntülenen 1 numara, moleküler belirleyici (100 ba merdiven), 2 numara pozitif kontrol, 3 numara negatif kontrol, 4,6 ve 8 numaralar *C.albicans* pozitif bantlar, 5 ve 7 numaralar ise *C.albicans* negatif örnekler.

Tablo 1. ID32 C ile *C.albicans* olarak tiplendirilmiş örneklerin diğer testler ile tekrar tiplendirilmeleri.

Örnekler	PCR		Sukroz Deneyi		Trehaloz Testi		42°C'de üreme	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Vajen (n:14)	12	2		2				
Kan (n:16)	10	6	4	2	4		4	
İdrar (n:2)	2							
İntraabdominal sıvı (n:1)	1							
Kist sıvısı (n:1)	1							
Toplam	26	8	4	4	4		4	

Bu 8 örnek tekrar DNA eldesi aşamasından itibaren çalışılmış ve PCR sonucu ikinci çalışmada da negatif olarak bulunmuştur. Bu aşamada PCR'ın duyarlılığı %77 olarak bulunmuştur. Klasik yöntemler ile yapılan doğrulama çalışmalarında 8 örneğin 4 tanesinin *C.stellatoidea* olarak tanımlanması nedeniyle, ID32 C kitinin *C.albicans* ve *C.stellatoidea* ayırımını yapmakta yetersiz kaldığı düşünülmektedir, Çünkü, *C.albicans* serotip B ve *C.stellatoidea*'nın aynı olduğu kabul edilmektedir (19). *C.stellatoidea* enfeksiyonunun *C.albicans*'a özgül primer ile gösterilemeyeceği bu çalışma ile anlaşılmıştır. Aynı doğrulama çalışmalarında örneklerimiz arasında *C.dublinsiensis* suşuna rastlanmamıştır. ID32 C kiti içerisinde sukroz ve trehaloz bulunmasına rağmen, *C.albicans* ve *C.stellatoidea* ayırımını yapma yetersizliğinin sebebi, sonuçları okurken tüm şekerlerin toplu olarak değerlendirilmesi olarak yorumlanmıştır. Sukroz, trehaloz özümleme testleri ile tekrar incelendiğinde ID32 C kitinin duyarlılığı %88 olarak bulunmuştur. PCR duyarlılığı klasik testlerin sonucuna göre, geriye yönelik tekrar incelendiğinde, 34 örneğin sadece 4'ünde yalancı negatifliğe rastlanmıştır. Böylece ID32 C ile pozitif olan örneklerin PCR sonuçlarındaki %77 (26/34) olan pozitiflik oranı son veriler ile %86 (26/30) oranına yükselmiştir. Yalancı negatiflik oranı ise %33'den %14'e düşmüştür. ID32 C'nin duyarlılığı ise %88 olarak (30-34) olarak bulunmuştur. Yalancı negatifliğin nedeni olarak, uyguladığımız tek çift primer kullanımı ve etidyum bromür ile boyanan jel elektroforez yönteminin yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında nested-PCR gibi yöntemlerden daha düşük bir duyarlılığa sahip olması düşünülmektedir (8). Polanco ve ark'nın 1999 yılında yapmış olduğu yöntem karşılaştırma çalışmasında sonuçlar nested PCR'ın, tek bir çift primerin kullanıldığı PCR'dan daha duyarlı olduğunu göstermiştir (4). Yalancı negatifliğin bir diğer nedeni olarak da seri pasaj sırasında *C.albicans*'ların mutasyona uğramış olabilecekleri ihtimalidir. Ancak bu konuyla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, ID32 C kiti ile PCR sonuçları arasında istatistiksel anlam taşıyacak bir fark bulunmamıştır. Ancak Nested PCR yönteminin klinik

örnekleri özellikle kan örneklerinin direkt tanısında daha özgül olabileceğini ve epidemiyolojik çalışmalarda tiplendirme için kullanılacak uygun bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Altınışık B, Sivrel Arısoy A, Özcan S, Türel A, Özbakka- loğlu B. Kanseri hastalarda maya kolonizasyonu. İnfeksiyon Dergisi 1999; 13 (4): 565-7.
2. Kan VL. Polimerase Chain Reaction for the Diagnosis of *Candidemia*. J Infect Dis 1993; 168: 779-83.
3. Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşoğlu C, Işıkgöz Taşbakan M. Vulvoaginal kandidoz etkeni mayaların in vitro antifungal duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi 1999; 13 (2): 165-8.
4. Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1993: 26-51.
5. Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31 (12): 3344-7.
6. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 30(5): 1169-75.
7. Einsele H, Hebart H, Roller Get al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1353-60.
8. Mansuroğlu H. *Candida albicans*'ın fare modelinde kan ve çeşitli organlarda PCR (polimerase chain reaction) ile gösterilmesi. Uzmanlık tezi. Tez Danışmanı: Prof.Dr. Semra Kuştımur, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, 2000, ANKARA.
9. Tümbay E, Pratik Tıp Mikolojisi: Maya ve Maya Benzeri Mantarlar için özümleme Besiyerleri. 1. Baskı, İzmir: Bilgehan Basımevi, 1983: 177-8.
10. William GM, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray pr, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999: 1167-8.
11. Musial CE, Cockeril FR, Roberts GD. Fungal Infections in the immunocompromised host: clinical and laboratory aspect. Clin Microbiol Rev 1998; 1: 349-64.
12. Haynes KA, Westerneng TJ. Rapid identification of *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C. Parapsilosis* and *C.krusei* by speciespecific PCR of large subunit ribosomal DNA. Medical Mycology 2996; 44: 390-6.
13. Buchaille L, Frediere AM, Guninet R, Gille Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 479-88.
14. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial system for identification of yeasts commonly isolated in the Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol 1999; 33: 319-25.

15. Yeğenoglu Y, Uzun M, Çekmeceli P. *Candida albicans*'ın hızlı tanısında selektif ve kromojenik yeni besiyerleri: *Albicans ID*, *Candichrom albicans-ön* çalışma. *İnfeksiyon Dergisi* 1998; 12(2): 223-8.
 16. Karaaslan A, Cengiz L, Boyacıoğlu İ, Cengiz AT, Özsan M. Vulvovajinal kandidiyazisli olgularda izole edilen maya türlerinin dağılımı ve antifungalere duyarlılıklarının saptanması. *Mikrobiyol Bül* 1999; 33: 319-25.
 17. Wahyuningsih R, Freisleben H-J, Sonntag H-g, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):3016-21.
 18. Polanco A, Mellado E, Castilla C, Rodriguez-tudela JL. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. *Diag Microbiol Infect Dis* 1999; 34(3): 177-83.
 19. Biswas SK, Yokoyama K, Wang L, Nishimura K, Miyali M. Typing of *C.albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *C.stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1600-3.
-
- Geliş Tarihi:** 26.02.2002
- Yazışma Adresi:** Dr. Gülendam BOZDAYI,
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
ANKARA
gbozdayi@hotmail.com