Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi
Yıl: 2005 Cilt: 03 Sayı: 10 Sayfa: 1-9
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702051001.pdf

Fungal Tanıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Özlem Abacı[1], Alev Haliki[2]

Giriş

Toprak biomasının çoğunluğunu oluşturan funguslar, organik materyalin parçalanması, bitkilere besin sağlanması ve ekosistemin dengesi için indikatör olup insan yaşamında ve ekosistemde kompleks ve farklı roller oynarlar. Ziraatte funguslar, tahıl ürünlerini harap edebilmelerinin yanı sıra, zararlı otların ve diğer bazı fungusların kontrolünde de biyoteknolojik olarak kullanılabilirler. Yine insanlarda sedef (psoriasis) hastalığından menenjite kadar birçok hastalığa neden olabilirler, ama tedavi edici ajan olarak da kullanılabilirler. Örneğin; *Saccharomyces boulardii*, *Clostridium dificile* toksisitesini ve antibiyotik kullanımı nedeni ile oluşan diğer bağırsak rahatsızlıklarını önleyebilir. Biyoteknoloji alanında funguslar değerli agrokimyasalların ve farmakolojik özelliklere sahip sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılabilirler (1).

Funguslar hakkında pek çok bilgi birikimi olmasına rağmen, halen bu organizmaların çoğu karakterize edilememiştir. Dünya üzerinde 1,5 milyon fungus olduğu tahmin edilmesine rağmen ancak 70.000 tür tarif edilebilmiştir, bu da halen yaşayan türlerin %95' inin tanımlanamadığını göstermektedir. Bunun nedenleri habitatlarının yeterli araştırılmaması, kültürlerinin zor olması veya yapılamaması ve kataloglanmış örneklerin tanılanmalarının doğru olmamasından kaynaklanmaktadır (1). Filamentli funguslar yıllardan beri morfolojik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ekolojik türler çoğu zaman özel bir nişe uyumuna göre veya bitki patolojisinde bazı türler konak hastalık semptomlarına göre ve konak ile bağlantılı olarak tanılanmıştır. Morfolojik, ekolojik ve patolojik türler fonksiyonel ve yapısal yetenekleri ile ilgili fenotipik karakteristiklerine göre tanılanmıştır. Tüm bu sorunların düzeltilme stratejilerinde rRNA genlerinin karşılaştırılmalı dizi analizlerinin yapılmasının gerekliliği ortadadır (1).

PCR moleküler biyolojide geniş uygulama alanı ile güçlü bir yöntemdir. Bu enzimatik reaksiyon invitro'da karışık DNA örneklerinden spesifik DNA dizilerinin amplifikasyonunu (çoğaltılmasını) sağlamış ve hedef DNA' nın μg miktarlarını oluşturmuştur. PCR ile her bir DNA dizisi klonlanabilir, analiz edilebilir veya modifiye edilebilir ve hatta nadir diziler bile saptanabilir. 1985 yılında bu teknolojinin bulunuşundan beri spesifikliği, hassasiyeti ve hızı sayesinde çoğu biyolojik araştırma alanı için ve tüm organizma sınıfları için birçok metodun gelişmesine yol açmıştır. PCR'ın fungal genetik, sistematik, ekoloji ve toprak mikrobiyolojisi, bitki patolojisi, medikal mikoloji, fungal biyoteknoloji vb. gibi mikolojinin birçok alanında geniş uygulamaları yapılmaktadır (2). PCR amplifikasyonu DNA dizisine dayalı bilgi sağlamaktadır ve bu sayede de bugüne kadar fenotipik olarak tanımlanmış türlerin doğrulanmasını sağlamaktadır (3).

[1] Araş.Gör.; [2] Yrd.Doç. Dr., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AbD, İzmir, Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: ozlemabaci@yahoo.com

Bağışıklık sistemi zayıf bireylerde giderek artan invaziv fungal enfeksiyonlar nedeniyle hastalık ölüme neden olmaktadır. Kültür temelli analiz yöntemleri düşük hassasiyet ve zayıf spesifiklik gösterdiğinden, fungal patojenlerin DNA amplifikasyonu için PCR temelli yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle örnekten mikrobiyal patojenin kültürünün yapılması çok uzun zaman aldığından PCR'ın tanıdaki önemi daha da artmaktadır. PCR' ın spesifikliği ve hassasiyeti hedef gene, primer dizisine, PCR tekniğine, DNA izolasyon prosedürüne ve PCR ürünlerinin belirlenmesi metoduna bağlıdır (4).

DNA izolasyonu

PCR' da ilk basamak kalıp DNA' nın hazırlanmasıdır. Funguslarda nükleik asit izolasyonu ile ilgili birçok protokol bulunmuştur. Bunların bir çoğu moleküler uygulamalarda kullanılabilecek μg miktarlarında saf genomik DNA'nın izolasyonunu sağlayabilmektedir. Tek kopyalı genlerin amplifikasyonu için 1μg DNA kullanılabilir, çok kopyalı genleri amplifikasyonu için ise daha az miktar DNA yeterli olmaktadır. Yapılan bir çalışmada rDNA dizilerinin amplifikasyonu için *Neurospora tetrasperma*'nın tek bir sporunun yeterli olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada adli tıp örneklerinden PCR için DNA izolasyon yöntemi belirtilmiştir. Bu yöntem hızlı ve basit olup, organik solvent ve çok sayıda tüp kullanımını gerektirmemektedir. Araştırıcılar bu yöntemi obligat parazit olan külleme funguslarından DNA izolasyonunda da kullanmışlardır (5).

PCR amplifikasyonu için çok az miktar DNA gerektiği için; DNA toprak, bitki ve klinik örnekler gibi kompleks materyallerden de izole edilebilir. Bu nedenle spesifik primerler kullanılarak karışık DNA örneklerinden fungal DNA'nın direkt amplifikasyonu sağlanabilmektedir. Bu teknikler fungusların kültüre edilmeden farklı örneklerden belirlenmesi ve özel ekolojik çalışmalar için kullanışlıdır (1).

Hassas, spesifik ve güvenilir PCR temelli tanı testleri uygulamak için PCR inhibitörlerini içermeyen saf DNA izolasyonunu sağlayacak, hızlı ve uygulanması kolay DNA izolasyon protokolleri gereklidir. Fungal hücrelerden DNA izolasyon protokolleri; hem zaman alıcı, hem de insan hücreleri veya virüslerden DNA izolasyonu ile kıyaslandığında daha az oranda DNA elde edilebilmektedir. Diğer bazı protokoller; mekanik işlemler, sonifikasyon, fenol-kloroform veya guanidin-tiyosiyanat gibi toksik kimyasalların kullanımı gibi ilave basamaklara ihtiyaç duymaktadır. Hücreleri sferoplast haline getirmede kullanılan Zimolaz (β-1,3 glukan laminaripenta hydrolaz), *Candida*, *Torulopsis* ve *Saccharomyces* için kullanılabilir. *Aspergillus niger* gibi filamentli funguslardan DNA izolasyonu için cam boncuklar ile mekanik parçalama, likit nitrojen ile dondurma-eritme veya sıcak alkali ile muamele gibi başka lizis basamakları gereklidir ve bu DNA izolasyon metodları başarı ile uygulanmaktadır(6).

Klinik örnekler hemoglobin gibi PCR inhibitörlerine sahiptirler. Bu inhibitörler *taq* polimeraza bağlanıp onun aktivitesini inhibe ederler. Klinik örneklerde mikroorganizma yoğunluğu az olduğu zaman hedef DNA'nın izolasyonu büyük önem taşımaktadır (4). Klinik çalışmalar için mevcut DNA izolasyon yöntemleri hızlandırılmıştır. Löffler ve ark. 1997' de yaptıkları bir çalışmada bu amaç için 5 farklı DNA izolasyon kiti ve klasik DNA izolasyon metodunu hassasiyetleri, güvenilirlikleri, maliyeti ile *C. albicans* gibi en çok rastlanılan maya DNA'sının ve *A. niger* gibi kompleks hücre duvarına sahip küf DNA'sının serbest kalması gibi kriterleri karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre tüm ticari kitler DNA izolasyon süresini kısaltmışlar,ancak hassasiyet 1-1000 fungal hücre/ml ve maliyet $0,10-2,30 arasında değişmiştir. QIAmp Tissue kiti, klasik yöntem ile aynı hassasiyet ve saflıkta sonuç

vermiş olmasına rağmen en pahalı kittir. Bu 2 izolasyon protokolü ile izole edilen DNA'lar ile yapılan PCR sonuçları da %99 uygunluk göstermiştir (6).

Hedef Gen

Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında White ve ark. tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA' nın direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. rRNA dizileri yaşayan tüm hücrelerde bulunduğundan ve aynı görevi üstlendiğinden taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır Bu dizilerin evolüsyonunun tüm genomun evolüsyonunu yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgeler de içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayırımlarında kullanılmaktadır. Funguslarda nuklear rDNA arka arkaya tekrar eden rDNA alt birimleri olarak organize olmuşlardır. Birinci alt birim küçük nuklear 18S rRNA, 5,8S rRNA ve büyük nüklear 28S rRNA genlerini içermektedir Birinci alt birimde genler ITS1 (internal transcribed spacer) ve ITS2 ile ayrılmıştır ve iki alt birim IGS (intergenic spacer) ile ayrılmıştır. Son rRNA geni (5S) fungal taksona bağlı olarak, tekrarlanmış alt birimler ile birlikte olabilir veya olmayabilir. 18S rDNA nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir genustaki fungal türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA' nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir (2). Tanısal PCR'ın spesifikliğinde amplifikasyon için uygun hedef dizinin belirlenmesi gerekmektedir. Spesifiklik, farklı genuslar veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir. Örneğin, enfeksiyonun bakteriyel veya fungal kökenli olup olmadığını anlamak için tüm funguslarda genel olarak bulunan yüksek oranda korunmuş bir gen bölgesi uygun hedef dizi olacaktır (7).

PCR, hassasiyeti ve spesifikliği nedeni ile fungusların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Medikal ve bitki patolojisinde fungusların ayırımı için PCR temelli analiz yöntemleri zaten kullanılmaktadır. PCR temelli analiz yöntemleri için spesifik primerlerin dizayn edilmesi gerekmektedir. Bunun için en azından hedef DNA bölgesinin bir kısmının dizisinin bilinmesi gerekmektedir (2). Hedef genin seçimi ve oligonükleotid primerlerin dizaynı PCR'ın hassasiyeti için önemli faktörlerdir. Aynı gen hedef gen olarak seçilse bile farklı primerler ile PCR 100-1000 kat farklı hassasiyet göstermektedir. Bu nedenle PCR'ın hassasiyeti ve spesifikliği için primerlerin dizisi önemlidir. PCR'ın hassasiyeti aynı zamanda seçilen hedef genin kopya sayısına da bağlıdır (4). ITS gibi DNA dizileri diğer tüm türler içerisinden tek bir türün saptanması için uygundur. Örnek olarak; ITS dizilerindeki farklılık fungusun izolasyonuna gerek kalmadan konak bitkideki çoğu fitopatolojik fungal türün saptanmasını sağlamıştır. rDNA'nın diğer dizileri örneğin 18S rDNA, 28S rDNA ve mitokondriyel rDNA dizileri de spesifik primerler geliştirmek için kullanılmaktadır (2).

PCR için farklı birkaç dizi olmasına rağmen, rRNA genleri tüm DNA'ları çoğaltabilen yüksek oranda korunmuş bölgeleri ve tür düzeyinde tanımlamayı sağlayan oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için en uygun hedef bölgelerdir. Diğer bir avantajı rRNA genlerinin PCR'ın hassasiyetini artıran yüksek kopya sayısının olmasıdır (7). *C. albicans*' da bu genin 50-100 kopyası bulunmaktadır (8). Bu nedenle PCR işleminde tek kopyalı genlere göre çok kopyalı genlerin kullanımı daha hassastır. Tek kopyalı genler de türe spesifik olabilir fakat nested-PCR uygulanmasını gerektirir. Bu PCR işlemi ise çapraz kontaminasyon riski taşımaktadır (9). Bunlara ilaveten ITS bölgesi oldukça korunmuş bir rRNA alt birimidir ve

tür düzeyinde identifikayonu kolaylaştırmaktadır (8). Bu nedenle bu bölge hedef alınarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR denemesinin duyarlılığı da artmaktadır. Hedef organizma için spesifik olan diziler de primer dizaynı için kullanılabilmektedir. Spesifik primerler klonlanmış genomik DNA dizileri veya PCR ile çoğaltılmış spesifik diziler sayesinde dizayn edilmektedir. Takson spesifik primerler RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) veya PCR fingerprinting ile elde edilen fragmentlerin klonlanması ve dizi analizlerinin yapılması ile dizayn edilmiştir. Örneğin *Fusarium* türlerinin saptanması için kullanılan primerler RAPD bantlarının dizilerinin karakterize edilmesi ile geliştirilmiştir (2).

Spesifik fungal primerler ile PCR metodu sadece tanıda değil, su, toprak, bitki veya klinik örnekler gibi doğal çevrelerde fungusların saptanmasını içeren ekolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Bundan dolayı, zorunlu parazit ve simbiyontlar üzerindeki çalışmalar da kolaylaşmıştır. Örnek olarak; mikorizal fungal DNA'nın amplifikasyonu bitki köklerinden yapılabilmiştir(2). Manian ve ark. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada endo ve ekzomikorizal funguslardan PCR için basit ve hızlı DNA izolasyon yöntemi geliştirmişlerdir ve izole edilen DNA' yı hem düşük kopyalı hem de yüksek kopyalı genlerin amplifikasyonunu sağlayan PCR denemelerinde başarılı bir şekilde kullanmışlardır (10).

Fungal tanıda kullanılan hedef gen bölgelerini şu şekilde sınıflayabiliriz:

-Universal Fungal Genler: rDNA genleri; 18S, ITS1 ve 2, 5,8S, 28S, 5S, IGS

-Tek Kopyalı Genler: Aktin genleri, Alkalin-proteaz (ALP), Citin Sentaz, GP43, Lanosterol-α-demetilaz (L1A1), URA5, SAP, β glukan sentaz (FKS), Histon.

-Cins veya Türe Özgü Primerler: 18S, ITS1 ve 2, 28S rDNA, mitokondriyal DNA, Histon genleri (11).

Fungal Tanıda Kullanılan PCR protokolleri

Örnekte çok az miktarda mikroorganizma olduğu zaman PCR' ın hassasiyetini artırmak için uygulanabilecek bir çok yöntem mevcuttur. Nested-PCR bu yöntemlerden birisidir. İki aşamalı olan bu testte, birinci periyotta çoğaltma tek primer çifti ile 15-30 kez tekrarlanmaktadır. Oluşan ve sayısal olarak artan ürünler, yeni bir reaksiyon tüpüne transfer edilerek ve burada internal dizilere spesifik sekonder primer çiftleri kullanılarak ikinci bir çoğaltmaya tabi tutulur. Bu ikinci defa da 15-30 kez tekrarlanır ve oluşan ürünler jel elektroforezle ortaya konulurlar (12,13).

Jaeger ve ark. 2000 yılında okülar sıvılardan *C. albicans, A. fumigatus* ve *Fusarium solanii* analizi yapmak amacıyla nested-PCR geliştirmiştir. 3 fungal türün 18S rRNA dizilerine spesifik 2 panfungal primer dizayn etmişlerdir. Bu primerler ile yapılan panfungal PCR'ın ardından 3 türe spesifik primerlerin kullanımı ile yapılan nested-PCR takip edilmiştir. Bu PCR ile 50-100 fg *C. albicans* DNA'sını saptayabilmişlerdir. Aynı zamanda hızlı ve güvenilir DNA izolasyon protokolü de geliştirmişlerdir. Jaeger ve ark. 2000' de geliştirdikleri bu yöntem ile izolasyon sırasında oluşabilecek DNA kaybını minimuma indirmişler, camsı ve sulu sıvılardan DNA izolasyonu yapmışlar ve bu sıvıların PCR üzerinde inhibitör etkisinin olmadığını da göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlar hastaların kültür sonuçları ve semptomları ile uyum göstermiştir. Fakat tek bir hastada PCR sonucu pozitif iken, kültür sonucu negatif çıkmıştır. Bu sonuçta bu protokolün klasik kültür yöntemlerine göre hassasiyetinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bu yöntem fungal endofitalmit şüphesi olan hastalarda güvenilir bir şekilde kullanılabilecek ilave bir protokol olarak belirtilmiştir (14).

Rappelli ve ark. 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada serebrospinal sıvılarda *C. neoformans* 'ın saptanması için bir Nested-PCR protokolü geliştirmişler ve bu tekniği 40 serebrospinal sıvı örneğinde denemişlerdir. Sonuçta daha önce klasik kültür yöntemleri ile Cryptococcal menenjit tanısı konmuş 21 hastada pozitif sonuç alınmış ve 19 kontrol hastasında da negatif sonuç elde edilmiştir. Bu yöntem diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak *Cryptococ* tanısı için kullanılabilmektedir (15).

Kawamura ve ark. 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada pulmonar aspergillosis tanısı için serolojik testin ve PCR' ın kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Pulmonar aspergillosis olan 44 hastaya ait serum örnekleri bu çalışmada kullanılmıştır. 39 hastanın serum örneklerinde *Aspergillus* DNA'sının PCR ile saptanması başarılı olmuştur. Galaktomannan antijenleri ELISA ile 25 hastada ve lateks aglutinasyon ile 13 hastada saptanmıştır. Nested PCR ile *Aspergillus* DNA'sının serum örneklerinden saptanması, bu 3 yöntem arasında en hassas yöntem olarak bildirilmiştir (16)

DNA amplifikasyonunun hassasiyeti ve spesifikliği, Nested PCR ile Standart PCR' a göre 1000 kez artmaktadır. Polanco ve ark. 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada Yeni Zelanda tavşanlarında akut dissemine *C. albicans* enfeksiyon modeli geliştirmiş ve lizis-santrifugasyon kan kültürü yöntemi ile de PCR'ı karşılaştırmışlardır. Çoğaltım için, funguslarda oldukça korunmuş küçük alt birim rRNA genlere spesifik olarak dizayn edilen primerleri kullanmışlardır. Tavşan kan örneklerinde PCR'ın duyarlılığı *C.albicans* için 10-50 maya hücresi/100μl olarak saptanmıştır. Nested-PCR ile de alt saptama limiti 10 kat artırılmıştır. Lizis santrifugasyon yöntemiyle elde edilen duyarlılık (%37,5), PCR ile elde edilenden (%25) daha yüksek fakat nested PCR'dan (%52,5) daha düşük bulunmuştur. İki tekniğin kombinasyonu ile (lizis santrifugasyon ve nested PCR) duyarlılık oranı %62,5'e yükselmiştir. Bu sonuçlara göre nested PCR'ın hem tek primerin kullanıldığı PCR'dan hem de lizis santrifugasyon kültür yönteminden daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır (17).

İnfekte dokulardan direkt olarak patojenik fungusun saptanması birçok önemli çalışmada belirtilmiştir. Aynı zamanda PCR, mikorizal simbiyontların gözlenmesi ve topraktan patojenin direkt saptanması için de kullanılmaktadır. Nested multipleks PCR uygulamaları çam köklerinde çürümeye sebep olan *Cylindrocarpon destructans* ve *C. floridum*' u saptamak için kullanılmıştır. Çoğu rDNA dizilerine dayanan bu PCR yöntemleri ile ölmüş miselyum ile infekteli doku pozitif test sonucu verebilir, çünkü DNA halen amplifiye edilebilir durumdadır. Çoğu zaman ölü ve canlı hücreleri ayırt etmek için tercih edilmekte; sadece canlı hücreleri belirleyebilmek için Revers-Transkriptaz PCR test uygulamaları geliştirilmiştir. Bu PCR uygulaması, kalıp DNA'dan RNA polimeraz ile genetik bilgilerin sentezlenen yeni tek iplikçik mRNA'ya transferidir ve kaynak olarak RNA kullanılmaktadır. Total RNA, revers transkriptaz enzimi ile ilk önce cDNA'ya çevrilir. cDNA türe özgü primerler ile çoğaltılır (12,13). Fakat rRNA hedef olarak kullanıldığı zaman rRNA' nın çoğaltılması her zaman canlı biyokütle ile paralel olmayabilir. Kitin sentaz ve ergosterol biyosentez genleri gibi dizilerin RT-PCR ile amplifikasyonu canlı hücreler ile daha çok paraleldir. Bu gen dizilerini temel alan RT-PCR uygulaması rRNA ile karşılaştırıldığı zaman hassasiyeti daha azdır (18). Mikoloji alanında revers-transkriptaz PCR mikotoksijenik fungusların araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR her zaman ilgilenilen strainin mikotoksin üretmediği anlamına gelmez. Örnek olarak primerlerin bağlanma bölgesinde meydana gelen mutasyon proteinin ekspresyonunu etkilemeyebilir, bu durumda PCR negatif sonuç verebilir. Ayrıca beklenen PCR ürünlerinin oluşumu da analiz edilen strainin mikotoksin oluşturduğunu göstermez, çünkü PCR ürünü ilgilenilen genin ekspresyon yapıp yapmadığını göstermez. Bu durumda mRNA'nın varlığı veya yokluğu strainin mikotoksin oluşturup oluşturmadığını anlamamızı sağlamaktadır. RT-PCR ile *A. parasiticus*' un

aflatoksin, *Fusarium culmorum*' un trichotesen üretip üretmediğinin analizinde kullanılmıştır. Ayrıca multipleks RT-PCR ile birden fazla mikotoksin için araştırma yapılabilmektedir (19) .

PCR' ın Tıpta Kullanımının Önemi

Son 10-20 yıl veya daha fazla süredir tıbbi olarak önemli funguslar üzerinde yapılan çalışmalar, yakın zamanlarda ise özellikle funguslar üzerinde genetik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bunun en önemli nedeni, sanayileşmiş ülkelerde fungal infeksiyonlar ile birçok insanın ölmesidir. *Candida* türleri Amerika'da hastanelerde kan örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar arasında 4. sırada yer almaktadır. Avrupa'da eğitim hastanelerinde her 25 hastadan birisi invaziv aspergillosis nedeni ile ölmektedir. Gelişmiş ülkelerde fungal infeksiyonlar nedeni ile meydana gelen ölümlerin sayısı parazit infeksiyonları ile oluşan ölümlerin sayısına oranla artış göstermiştir. İkinci bir neden, antifungal ajanlar farmakolojik şirketler için karlı hale gelmiştir. Karmaşık ilaç terapileri ilaçlara dirençliliğin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda örnek olarak *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin neden olduğu infeksiyonların artmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, *C. albicans, C. glabrata, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus neoformans* gibi insan patojenlerinin genom dizi analizleri tamamlanmıştır. *Coccidioides, Pneumocystis*, *Histoplazma, Paracoccidioides, Trichophyton* genom çalışmaları devam etmektedir (20).

Bağışıklık sistemi zayıf bireylerin sayısının artması ile fırsatçı fungal infeksiyonların da sayısında giderek artma görülmektedir. Kozmopolit çevresel funguslar hayatı tehdit eden hastalıkların etkeni olarak ortaya çıkmaktadırlar. Çoğu patojenik fungus antifungal ilaçlara dirençli hale gelmişlerdir. Bazı patojenik fungusların doku örneklerinde saptanmaları mümkün olmamaktadır. Klasik identifikasyon yöntemleri yavaş ve yorucu olup, hassasiyeti ve spesifikliği düşüktür. Fenotipik karakteristikler çevresel koşullara göre değişim gösterebilmektedir. Genotipik karakteristiklere dayalı tanı daha doğru, tekrarlanabilir, basit ve hızlıdır. DNA temelli protokoller ile organizmanın kandan, vücut sıvılarından, dokulardan analizi mümkün olmaktadır. Bu sayede fungal ajanın tanımlanması, fungal yükün miktarı ve antifungal tedavinin gözlenmesi mümkün olmaktadır (11).

PCR çok duyarlı olabilen, primer seçimine bağlı olarak çok özgül olabilen ve tanı zamanını saatler düzeyine düşürebilen bir yöntemdir. PCR'ın diğer bir avantajı da az miktar klinik örnekten fungal infeksiyonun başlangıcında tanısı, antifungal ajanlarla yüksek dozda tedavi esnasında ölü veya canlı mevcut fungusun hızlı tanısının yapılabilmesidir (17).

PCR Ürünlerinin Saptanması ve Analizi

PCR ürünlerinin saptanması veya gösterilmesi için kullanılan yöntem hem hassasiyet hem de özgüllüğü artırabilir. En basit yöntem etidium bromid ile işaretli PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforez ile ayırımıdır. Bu yöntem çoğaltılmış ürün başına ortalama 20 ng saptama limitine sahiptir, ayrıca PCR ürünlerinin boyutu hakkında marker kullanımı ile bilgi edinilebilmektedir. Bu yöntemin yanında PCR ürünlerinin saptanması için bir çok yöntem bildirilmiştir. Bunlardan birincisi radyoizotop veya radyoizotop olmayan markerler ile işaretli spesifik problar ile PCR ürünlerinin amplifikasyonuna dayanan Southern Blot Hibridizasyon tekniği olup PCR spesifiklik çalışmalarını kolaylaştırmıştır. Bu analiz protokolü etidium bromid analiz yöntemine göre daha yüksek hassasiyete sahip olmasına rağmen ekstra blotlama ve hibridizasyon basamaklarına ihtiyaç hissetmektedir. İkinci bir yöntem; digoksigenin (DIG)-PCR ELISA ticari olarak hazır olan mikrotitrasyon plateleri ile PCR

ürünlerinin analizini kolaylaştırmaktadır. Bu metot, streptovidin ile kaplı ELISA pleytlerinin yüzeyine immobilize olmuş DIG ile işaretlenmiş problar ile ürünlerin hibridizasyonuna dayanmaktadır. Hibridizasyon anti DIG peroksidaz konjugant ve kolorimetrik substrat ile saptanır. ELISA sistemi klasik elektroforez yöntemine göre 10-100 kez hassastır (4,12,13)

Van Deventer ve ark. 1995 yılında çoklu kopyası olan küçük alt birim rRNA bölgesini hedef alan primer çifti kullanarak yaptıkları PCR ile 180 bç'lik bir bant elde etmişlerdir. *C. albicans* spesifik problar ile Southern blot analizleri yapıldığında 100 μl kanda 10-15 *C. albicans* hücresi ayırt edilebilmiştir. PCR ve kan kültürü karşılaştırıldığında, PCR kullanımı ile pozitif örnek sayısında kan kültürüne nazaran büyük bir artış görülmüştür (PCR %89-100, kültür %44-100). Bu yöntem ile *C. albicans* araştırılmış olmasına rağmen araştırmacılar, değişik problar kullanarak bu yöntemin diğer türlerin saptanmasında da kullanılabileceğini belirtmişlerdir (21).

Patojenik *Candida* türleri arasında korunmuş aktin geni, Virginia L. Kan tarafından 1993 yılında hedef olarak kullanılmıştır. Aktin geninin 158 bç (baz çifti)'ni çoğaltan PCR tanımlanmıştır. Bu 158'lik fragment ^{32}P-işaretli oligonükleotid prob kullanarak analiz edilmiştir. En düşük 25 fg saf *C. albicans* DNA'sını ayıt edebilmiştir. Ayrıca kan kültürleri *Candida* türleri için pozitif bulunmuş olan 14 hastadan alınmış serum örneklerinden 11 tanesi (%79) PCR ile pozitif bulunmuştur (22).

Loeffler ve ark. 2000 yılında fungal 18S rRNA genlerinin hayli korunmuş bölgelerine bağlanabilen primerler kullanarak PCR geliştirmişlerdir. Araştırıcılar nadir rastlanılan *Candida* türlerinin tanısı üzerine çalışmışlardır. PCR ürünlerinin dizi analizleri *C. humicola, C. keyfr, C. solani, C. inconspicua, C. utilis, C. norvegensis* ve *Malassezia furfur*'un 18S rRNA gen bölgesi için spesifik problar dizayn etmişlerdir. Genel *Candida* probu 15 maya türünün DNA'sını ayırdedebilmiştir. *Aspergillus niger, A. fumigatus, Fusarium* spp., *Cytomegalovirus* ve insan fibroblast DNA'sında slot blot sinyal elde edilmemiştir. 10^5-10^0 kob/mL seyreltilmiş *Candida* hücreleri denenmiş ve hassasiyet en azından 10^1 kob/mL (100 fg fungal DNA) olarak bulunmuştur. Funguslara özgü genel bir primer çifti ve spesifik problar kullanarak geniş oranda fungus tanımlanması mümkün olmuştur (23).

Elie ve ark. 1998 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada genel fungal primerleri ve türe spesifik probları kullanarak 5 *Candida* türünün rRNA geninin ITS2 bölgesini analiz eden PCR-Enzim Immuno Assay'i (PCR-EIA) geliştirmişlerdir. Ayrıca C*. guillermondi, C. keyfr, C .lambica*, *C. lusitaniae, C. pelliculosa, C .rugosa ve C. zeylanoides* için ve API 20C kitleri ile tanımlanamayan *C. haemulonii, C. norvegica, C. norvegensis, C. utilis*, *C. viswanathii* ve yeni tarif edilen *C. dubliniensis* türleri içinde problar dizayn etmişlerdir. Bu sayede 7 saat gibi kısa bir sürede PCR-EIA ile tür düzeyinde tanı yapılabilmiştir. Konvensiyonel yöntemler ile birbirinden ayırt edilemeyen *C. albicans* ve *C. dubliniensis'* de ayırdedilebilmiştir (24).

Wahyuningsih ve ark., 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada invaziv kandidiasis tanısı için serum örneklerinde *C. albicans*'ın hızlı ve basit analizini PCR ile yapmışlardır. Bu PCR denemesinde fungusların ITS geni için spesifik primerler kullanmışlardır. Bu PCR ürünlerinin DNA enzim immunoassayinde (DEIA) kullanılan biotin ile işaretlenmiş hibridizasyon probları özellikle *C. albicans* DNA'sı ile hibridize olmuştur. Daha sonra bu PCR assayinin serumdaki hassasiyetini belirlemek için *C. albicans* hücrelerinin 10^6-10^0 arasında dilüsyonları ve *C. albicans* genomik DNA'sının 40 ng-4 fg'a kadar dilüsyonları hazırlanarak sağlıklı bireyden elde edilen serumlara eklenmiştir. Serumdan DNA ekstrakte

ediltikten sonra PCR yapılmıştır. PCR'da çoğaltmadan sonra 10 *C. albicans* genomu (400 fg saf genomik DNA'sı) elektroforezde saptanmıştır. PCR ürünleri DEIA'de biotinlenmiş *C. albicans* probu ile hibridize edildiğinde 1 *C. albicans* genomu (40 fg *C. albicans* genomik DNA'sı) ayırt edilebilmiştir. Sağlıklı bireylerden, mukokutanöz infeksiyonu olan hastalar ve sistemik kandidiasis gelişme ihtimali olan hastalardan alınan kan örneklerinden *C. albicans* tanısı için analiz yapılmıştır. Bu denemede 16 kültür negatif kontrol hastasının ve sistemik olmayan kandidial enfeksiyonu olan 11 hastada *C. albicans* saptanamamıştır. Kan kültür sonuçları risk altındaki hastalarda negatif çıkarken, sistemik kandidiasis hastalarında kan kültürü sonuçları pozitif çıkmıştır. Fakat PCR-DEIA ile risk altında olan 9 hastadan 3'ünde ve tüm sistemik infeksiyona sahip hastalardan pozitif sonuç alınmıştır. Bu PCR tekniği kan kültüründen daha hassas bulunmuştur (25).

Sonuç

Biyoteknolojide ve sağlık alanında giderek önemi daha da anlaşılan fungusların öncelikle tür düzeyinde tanısının en kısa yöntem olan PCR ile hızlı bir şekilde yapılabilmesinin getirdiği yararların yanısıra; gelecekte halen cevaplanamamış sistematik sorular ve biyoçeşitlilik alanlarında da önemli aşamalar kaydedileceği açıktır. Bu derleme çalışmamızda PCR'ın önemi vurgulanarak genel yöntemler açık bir şekilde anlatılmaya çalışılmıştır.

Kaynaklar

1. Borneman, J., Hartin, J.R., Oct-2000, PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples, Applied and Environmental Microbiology, Vol.66, No.10, 4356-4360.

2. Edel, V., 1998, Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.

3. Bridge, P.D., Arora D.K., 1998, Interpretation of PCR methods for Species Definition, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.

4. Yamata, Y., May-2002, PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol.9, No.3, p508-514.

5. Takamatsu, S., 1998, PCR Applications in Fungal Phylogeny, 125-152, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.

6. Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., Einsele, H., Dec-1997, Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood, Journal of Clinical Microbiology, Vol.35, No.12, 3311-3312.

7. Hugnes, T, Rogers, Tr., Haynes, K., 1998, 243-267, PCR diagnostics in medical mycology, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.

8. Ahmad, S., Khan, Z., Mustafa, A.S., Khan, Z.U., July-2002, Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification , Journal of Clinical Microbiology, vol.40, No.7, p.2483-2489.

9. Loeffler, J., Hebart, H., M, S., Schmidt, D., Klingspor, L., Tollemar, J., Schumacher, U., Einsele, H., 2000, Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization, diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Vol.38, p.207-212.

10. Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., 2001, DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi, Letters in Applied Microbiology, Vol.33, p. 307-310.

11. www.mmrl.med.usyd.edu/au/fungalid.html.

12. Arda, M., 1994, Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No:2, Armoni Ltd.Şti, Ankara,

13. Buffery, C., 1993, The Polymerase Chain Reaction, The Royal Society of Chemistry, 51-61, Cambridge CB4 OWF,UK, 428.

14. Jaeger, E.E., Carroll, N.M., Choudhury S., Dunlop, A.A., Towler H.M.A., Matheson M.M., Adamson, P., Okhravi, N., Aug.-2000, Rapid Detection and Identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium Species in Ocular Samples Using Nested PCR, Journal of Clinical Microbiology, Vol.38, No.8, p.2902-2908.

15. Rappelli, P., Are, R., Casu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., Aceti, A., Nov.-1998, Development of a Nested PCR for Detection of Cryptococcus neoformans in Cerebrospinal Fluid, Journal of Clinical Microbiology, Vol.36, No.11, p.3438-3440.

16. Kawamura, S., Maesakı, S., Noda, T., Hırakata, Y., Tomono, K., Tashıro, T., Kohno, S., Jan-1999, Comparison betweeen PCR and Detection of Antigen in Sera for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis, Journal of Clinical Microbiology, Vol.37, No.1, p 218-220.

17. Polanco, A., Mellado, E., Castilla, C., Tudela, J.L.R., 1999, Detection of Candida albicans in Blood PCR in a Rabbit Animal Model of Disseminated Candidiasis, Diagn. Microbiol. Infec. Dis., Vol.34, p.177-183.

18. Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., 1998, 325-345, Future Directions for PCR in Mycology, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.

19. Konietzny, U., Greiner, R., 2003, The Application of PCR ın the Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods, Brazilian Journal of Microbiology, Vol.34, 283-300.

20. Latge, J.P., Calderone, R., 2002, Host-microbe interactions: fungi Invasive human fungal opportunistic infections, Current Opinion in Microbiology, Vol.5, p.355-358.

21. Deventer, A.J.M., Goessens, W.H.F., Belkum, A.,Vliet H.J.A., Etten E.W.M., Verbrugh, H.A., Mar.-1995, Improved Detection of Candida albicans by PCR in Blood of Neutropenic Mice with Systemic Candidiasis, Journal of Clinical Microbiology, Vol.33, No.3, p.625-628.

22. Kan, V.L., 1993, Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Candidemia, The Journal of Infectious Diseases, Vol.168, p.779-783.

23. Loeffler, J., Hebart, H., M, S., Schmidt, D., Klingspor, L., Tollemar, J., Schumacher, U., Einsele, H., 2000, Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization, diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Vol.38, p.207-212.

24. Elie, C.M., Lott, T.J., Reis E., Morrison, C.J., Nov.-1998, Rapid Identification of Candida Species with Species-Specific DNA Probes, Journal of Clinical Microbiology, Vol.36, No.11, p.3260-3265.

25. Wahyuningsih, R., Freisleben, H.J., Sonntag H.G., Aug.-2000, Simple and Rapid Detection of Candida albicans DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis, Journal of Clinical Microbiology, Vol.38, No.8, p.3016-3021.