

Gülhane Mikrobiyoloji Günleri

20 - 22 Nisan 2010

Antimikrobik Kemoterapi
Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler



KANDİDEMİLERİN TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

Nilgün Çerikçioğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

● **Kandolaşımı Enfeksiyonları**

- **%10  Kandidemi**
- **Ölüm hızı : % 50 (YBÜ)**
- **Erken tanı (?), tedavinin önemi**

● Etken: *Candida albicans*

- albicans dışı türler



● Erişkinlerde : *C.krusei* (Fcz Dirençli)

● Çocuklarda : *C.parapsilosis*

● *C.dubliniensis*: Fcz dirençli

● *C.lusitaniae*: Amfoterisin B dirençli

● *C.parapsilosis*

● *C.guilliermondii*



Ekinokandinler için



MİK

KANDİDEMİ TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

- **Antikor saptanması** : (anti-mannan ak.)
- **Antijen saptanması** : (mannan, glukan)
 - % 95 özgüllük
 - % 90 duyarlılık

● **Kan Kültürleri:** Altın Standard

Duyarlılık = % 50

Bac T/ALERT

BACTEC – 9240

Üreme sinyali: 3-5 gün

- Duyarlılık, özgüllük ↑
- Hızlı sonuç
- MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

PCR DIŞI MOLEKÜLER YÖNTEMLER

- İn-situ Hibridizasyon:
- Floresein işaretli oligonükleotid + KAN/DOKU

- Maya (tür düzeyinde) 18SrRNA ile



- HİBRİDİZASYON

- 3 kob/0.5 ml.kan
- 2.5 saat
- Dezavantaj: Her bir tür için ayrı set gereksinimi

Positive
Blood Culture



15 Min.

Gram stain



Yeast

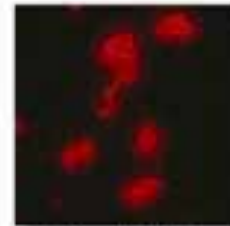
2.5 Hrs.

C. albicans/*C. glabrata* PNA FISH™

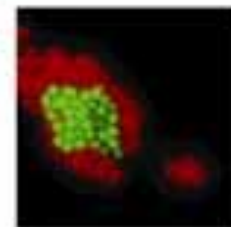


C. albicans

or

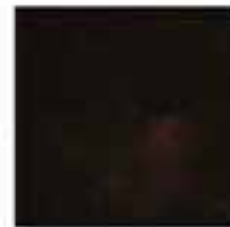


C. glabrata



Mixed

or



Non-*C. albicans*
Non-*C. glabrata*



Call to Physician

NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)

- İzotermal amplifikasyon işlemi
- 1 kob/100 µl. kan
- Termal döngü cihazı Ø

PCR'YE DAYALI YÖNTEMLER

PCR-LPA (Line Probe Assay):

- Kan kültüründen → (maya) DNA'sının izolasyonu
- Türler'e özgü oligonükleotidler
- 8 Candida türü
- 2-10 kob/ml.

Multipleks PCR:

- Kandan mayaya özgül ITS1, ITS2 bölgelerinin amplifikasyonu
- Ürünlerin agaroz jelde farklı göç profillerine göre *tür* belirlenmesi
- 8 saat
- 1 den fazla tür tanımlanması

Nested PCR ve Semಿನested PCR (sn PCR)

- İki aşamalı amplifikasyon yöntemi
 - Hedef: çoklu kopyaları bulunan rRNA dizileri
 - (duyarlılık ↑)
- Sn PCR'de:
- İlk aşamada iki adet dış primer
- (hedef bölgede uzun bir kısmın amplifikasyonu)
- İkinci aşamada bir dış-bir iç primer ile amplifikasyon
- 1 kob/ml.

PCR-EIA (PCR-Enzyme Immuno Assay)

- Kandan (maya) DNA sının izolasyonu
- ITS1,3,4 evrensel primerler ile



- Enzim işaretli antikor ile saptanması
- Dezavantajı: *C.glabrata* tanımlanamaz.
- snPCR-EIA ile 1 kob/ml
 - *C.glabrata* dahil tanımlama

Tanımlanan PCR Yöntemleri ile

- **1-10 kob (10 fg) / ml**
- **Kolonizasyon / enfeksiyon ayırımı ?**
- **Uygulama: ÜREMELİ kan kültürleri ile***

1990 Buchman ve ark.

- Lanosterol 14- α -demetilaz geni amplifikasyonu
 - 100 kob/ml. kan
- Kısıtlı tür tanımı
 - (*C.albicans*, *C. tropicalis*)

1994 Burgerner-Kairuz ve ark.

- Lanosterol 14- α -demetilaz geninin “nested-PCR” ile amplifikasyonu

- 2 kob/ml

- *C. parapsilosis*
- *C. tropicalis*
- *C. albicans*

- Isı-şok proteini
- Aktin
- Mitokondri rDNA
- Aspartil proteaz
 - genlerinin amplifikasyonu
- (Duyarlılık-Özgüllük ↓)

- Tekrarlayan DNA bölgelerinin amplifikasyonuna uygun primerler
 - ARTAN Duyarlılık
 - Hedefler:
 - 18S r RNA
 - 5.8 S r RNA
 - 28 S r RNA
 - Kodlayan
 - 50-100 kopyalı
 - Yüksek düzeyde korunmuş bölgeler
 - Türe özgü ITS gen bölgeleri
- 

NÜKLEİK ASİT ÇOĞALTMA UYGULAMALARINDAKİ ZORLUKLAR

1)Kandida DNA sının izolasyonu ve saflaştırılması

- Eritrosit, lökosit lizis işlemleri
- (Tuzlar, deterjanlar, proteinaz K.)
- RNA'nın parçalanması (RNaz)
- Proteinlerin çöktürülmesi
- (Na, K- Asetat.)

2) Hemoglobin

- Heparin
- EDTA
- Laktoferrin
- Lipidler
- Doğal/eklenen proteinaz... gibi..
 - Taq polimeraz inhibitörlerinin varlığı
 - İnhibitörlerin uzaklaştırılması
 - (zararlı fenol-kloroform...)

3) En az 3 saat süren ön işlemler

ÖN İŞLEM ZORLUKLARININ GİDERİLMESİ

- DNA tutucu filtre
- Zirkonyum boncuk (hücre parçalayıcı)
- Kaynatma-Chelex (sindiriciler)
- Zimolaz (mantar hücre duvarının parçalanması)
- Süre yaklaşık 1 saat
- Duyarlılık, özgüllük 
- Standardizasyon ?

4) Yalancı (+) sonuçlar:

- Çapraz kontaminasyon
- Negatif kontrollerin kullanılması zorunluluğu

5) Yalancı (-) sonuçlar:

- Taq polimeraz inhibitörlerinin varlığı
- Pozitif kontrollerin kullanılması zorunluluğu

GERÇEK ZAMANLI (Real-Time) PCR

- Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artan “Floresan Sinyal”in ölçümü
- Kapalı reaksiyon ortamı
- (Çevresel nükleik asit kontaminasyonu riski ↓)
- Taq-Man PCR



TÜRKİYE'DEN ÖRNEKLER:

- **Özer S. ve ark. (2007):**

- EDTA'lı kan
- Üremesiz kan kültürleri

} Simüle kan kültürü
(BACTEC-9240)

- 5 S r DNA ya uygun primerler (PCon1, PCon2)
- 10^2 kob/ml. (üreme sinyali sonrası)
- Üremeli kan kültürleri ile % 100 uyum
- 7 saat
- 8 TL. / hasta

Çerikçioğlu N. ve ark. (2010)

- Sn PCR
- 50 hasta (kandidemi riski ↑)
- Bac T/ALERT (sinyalsiz, 7 gün inkübasyon)

Positive

Negative



Olası Kandida DNA Ekstraksiyonu

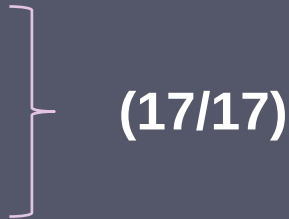
- 1 gece inkübasyon → 1 ml. örnek (kültürün devamı...)
- Santrifüj (720 x g, 2 dk.) (karbon parçacıklarının çökmesi)
- Üst sıvıdan → QI Amp (QIAGEN) doku protokolü ile DNA izolasyonu

- 1.amplifikasyon:
- 5.8 S r DNA (3')
- 28 S r DNA (5') amplifikasyonu
 - CTSF, CTSR primerleri (IDT Inc; ABD)
- 2.amplifikasyon:
- Türe özgül ITS 2 bölgelerinin amplifikasyonu

- * % 0.5 Sığır Serum Albumini (Sigma, Almanya)
- * 5-25 kob/ml. (simüle kan kültüründe)



FIGURE 1- Semi-nested PCR results for *Candida* sp. colonies and blood culture bottles. M: 100 bp molecular marker. sn-PCR 1.step results from colonies, Lane 1: *C. albicans*, Lane 2: *C. tropicalis*, Lane 3: *C. parapsilosis*, Lane 4: *C. glabrata*. sn PCR 2.step results from colonies: Lane 5: *C. albicans*, Lane 6: *C. tropicalis*, Lane 7: *C. parapsilosis*, Lane 8: *C. glabrata*. sn-PCR 1.step results for blood culture bottles: Lane 9: *Candida* sp., Lane 10: *Candida* sp., Lane 11: *Candida* sp., Lane 12: *Candida* sp. Sn-PCR 2.step results for blood culture bottles: Lane 13: *C. albicans*, Lane 14: *C. albicans*, Lane 15: *C. parapsilosis*, Lane 16: *C. parapsilosis*.

- 50 kan kültürü 17 si (+)
 - sn PCR ile 17 (+)
- 
- (17/17)

- Bir hasta

- 1.Kan kültürü → (-)
- sn PCR → *C.parapsilosis* (+)
- 2.Kan kültürü (1 hafta sonra)

C.parapsilosis (+)



- % 100 duyarlılık
- % 97 özgüllük

- Avantajları:

- Tek örnekle kan kültürü izlemi ve PCR
- Kan kültürünün ertesi günü sonuç
- (Candida / tür düzeyinde)
- 11.5 TL. / hasta

- Dezavantajı:

- İkinci basamakta her bir tür için ayrı set hazırlanması

UMUT VEREN GELİŞMELER

- Gebert ve ark. (2008)
- Wellinghausen ve ark. (2009)
- MolySis Yöntemi + Real-Time PCR
- Sitratlı tüpte kan
- İnhibitörlerin etkin uzaklaştırılması
 - 4 saat (toplam)
- Kan kültüründen en az 3 gün önce (+) sonuç olanağı

SONUÇ

- PCR yöntemlerinde duyarlılık ve özgüllük ↑
- Kısa sürede sonuç
 - (Real-Time PCR)



- Pahalı cihazlar
- Hassas çalışma gereksinimi

- **Kültür**
- **Seroloji (galaktomannan)**
- **Rutinde ağırlıklı yöntemler**

Gülhane Mikrobiyoloji Günleri

20 - 22 Nisan 2010

Antimikrobik Kemoterapi
Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler

