

MİKOZLARIN LABORATUVAR TANISI, ETKEN MANTARIN TÜR TANISI VE ANTİFUNGAL DİRENÇ ANALİZİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ

A. Nedret KOÇ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, anedret@erciyes.edu.tr

Son yıllarda immünyetmezlikli hasta sayısındaki artış, mantar infeksiyonun sıklığını ve önemini artırmıştır. Mantar infeksiyonlarının erken tanısına yönelik çalışmalar hızlanmıştır. Ancak halen direkt tanı, kültür içeren rutin tanımlama yöntemleri altın standartlığını korumaktadır. Ancak kültür yöntemlerinin zaman alıcı olması, infeksiyon bölgesinden örnek alınamaması, alınan örneklerde kültür pozitifliğinin sınırlı sayıda olmasından dolayı tanıda yeni yöntem arayışı devam etmektedir (1, 2).

Moleküler biyolojik testler, diğer bir deyişle, klinik örneklerden öncelikle ekstrakte edilen nükleik asitlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya diğer DNA ve RNA amplifikasyon teknolojisi kullanılarak daha fazla çoğaltılabildiği, rutin testlere göre duyarlılığının artırıldığı testlerdir. Fungal DNA'nın belirlenmesi, antikor belirleyen testlere göre immünyesistem fonksiyonundan bağımsızdır ve antikor yanıtı oluşmadan önce erken tanıyı sağlayabilir. Moleküler biyolojik testlerin diğer bir avantajı, birden fazla etkenin neden olduğu infeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanıma yetenekleridir. Ayrıca moleküler biyolojik testlerle, kan ve idrar gibi invazif olmayan yöntemlerle alınan örneklerde nükleik asidi belirleyerek biyopsi ve bronko-alveoler lavaj gibi invazif yöntemlere ihtiyacı azaltır. Polimeraz zincir reaksiyonu gibi amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığı ve özgürlüğü yüksektir. Ancak klinik örneklerde mantar DNA ve RNA'sını ekstrakte edici standart prosedürlerin olmaması ve inhibitörlerin elimine edilememesi nedeni ile prosedürlerin tam oluşmaması testin duyarlılığında azaltır (2).

Bu bölümde; moleküler yöntemlerin izolasyonda, tanıda ve antifungal dirençte yeri konusunda yapılan çalışmaların sonuçları ve Türkiye'deki mikoloji laboratuvarlarında moleküler yöntemler hangi amaçla ve hangi mantarlar için kullanıldığına ait bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Mantar infeksiyonu ve moleküler yöntemlerin tanıda yeri

Sistemik mantar infeksiyonlarının mortalitesinin yüksek olması nedeni ile erken tanı ve tedavi önemlidir. Bundan dolayı kanda etkenin nükleik asidini belirlemek hastaların yaşam oranını etkiler. Moleküler yöntemlerden, hasta örneklerinde organizmayı tanımak için spesifik nükleik asit problemlerinin kullanıldığı *insitu* hibridizasyon yöntemi en basit kullanılan yöntemdir, ancak duyarlılığı diğer yöntemlere göre düşüktür. Morfolojik tanı yapılamadığı zaman *Aspergillus*, *Candida* ve diğer mantarları değerlendirmek için yararlanılabilir (2).

Polimeraz zincir reaksiyonu ve diğer benzer amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde küçük miktardaki hedef DNA'yı belirlemeye izin verir. Literatürlerde sistemik mantar infeksiyonlarının tanısında PCR kullanımı konusunda ve kültür ve serolojik yöntemlere göre duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğuna ilişkin birçok yayın vardır (3-7). Polimeraz zincir reaksiyonunun kan örneklerinde 1CFU/ml'ye kadar mantarları belirlemede duyarlı olduğu bildirilmektedir (8). Yeo ve Wrong (9) ve Che ve ark. (10) amplifikasyon yönteminde kullanılan spesifik hedefleri özetlemişlerdir. *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium marneffii*,

Blastomyces dermatitidis, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve dermatofiti belirleyecek hedef DNA'lar geliştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda hedef primer genler; amplifiye rRNA gen (18S, 28S, 5.8rRNA gen) sıklıkla kullanılmasına rağmen sitokrom P450 geni (11), ısı şok protein geni (12), pH regulation geni (13) de çalışmalarda kullanılmaktadır. Amplifikasyon sonrası yöntemlerin çeşitli olmasının nedeni, rRNA ampikonların içindeki çeşitli bölgelerin kullanılmış olmasıdır ve bu da mantarın cins ve türünün tanınmasını sağlar. Amplifikasyon ve sonrası ürünü belirlerken nested PCR, multiplex PCR, random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR), restriction fragment length polymorfism-PCR (PCR-RFLP), PCR-enzim-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA), single-stand confirmation polimorfism (PCR-SSCP), spesifik problemler ile hibridizasyon, PCR-dizi analizi ve real time PCR kullanılmaktadır (5). Real time PCR (gerçek zamanlı PCR) floresan ile işaretlenmiş türe spesifik problemlerin kullanıldığı ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan yöntemdir (3-5). Bu yöntem, amplifikasyon sonrası ürünü belirlemeyi standartize eder, "turnaround" zamanını kısaltır, kısa sürede sonuç verir, kontaminasyonu azaltır, probun tanımlamasına dayanarak tür/cins düzeyinde tanı yapar ve hedef DNA'nın sayısını vererek tedavinin takibinde kullanılabilir. Bu teknoloji *Aspergillus*, *Candida* ve *Zygomycetes* için kullanılmıştır (14, 15). Klingsor ve Jalal (4) real-time PCR ve otomatik DNA ekstraksiyon kiti kullanarak klinik örneklerde *Aspergillus*, *Candida* türlerini tür düzeyinde tanımlamışlardır. Bu yöntemle klinik örnekten izolasyonun %100 oranında ve kanda 2 CFU/ml duyarlılıkta ve 5-6 saatte *invitro* ve *invivo* patojen mantarları belirlemede ve tanımlamada duyarlı ve özgül olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak O'Sullivan ve ark. (16) deneysel invazif akciğer aspergillozunda *Aspergillus fumigatus*'u belirlemek için kantitatif real-time PCR yöntemi ile kültür yöntemini değerlendirmişler; BAL (bronko-alveolar lavaj) ve akciğer dokusunda PCR'in yüksek duyarlılıkta (%100) olduğunu ve kültür duyarlılığının % 63.3 olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak, diğer bir çalışmada, deneysel invazif akciğer aspergillozunda BAL sıvısında *Aspergillus fumigatus*'u belirlemek için kantitatif real-time PCR yöntemini galaktomannan ELISA, kültür ve direkt inceleme ile karşılaştırmışlar; galaktomannan ELISA'nın cut off'u 0.75 alındığında tedavi edilmemiş kontrolde %100, ancak tedavi edilmiş hasta grubunda %92; kantitatif real-time PCR'in cut off'u 36 siklus kabul edildiğinde duyarlılığının %80 ve özgüllüğünün %100 olduğunu ve kantitatif kültürün tedavi edilmemiş kontrolde %46 ve özgüllüğün %100 olduğunu, ancak tedavi edilmiş hasta grubunda %16 oranına düştüğünü belirlemişlerdir (3). Sheppard ve ark. (17) deneysel fare modelinde invazif akciğer infeksiyonlarında kültür, kantitatif PCR ve galaktomannan antijenini karşılaştırmışlar, bu üç test arasında en iyi uyumun kantitatif PCR ve galaktomannan antijeni ile olduğunu ve bunlardan da kantitatif PCR'in duyarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile fungal DNA'nın belirlenmesinin kültür ve radyolojik yöntemlere göre daha hızlı olduğu geniş klinik verilerle belirlenmiştir (2). Hepatosplenik kandidoz ve aspergillozlu hastaların tüm kan örneklerinde fungal DNA'nın radyolojik bulgulardan ortalama dört gün önce belirlendiği bildirilmektedir. Ayrıca aynı çalışmalarda bu yöntemin hastaların tedaviye yanıtını izlemekte de kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemin dökümente edilen (kesin) invazif aspergilloz için, tam kan örneği iki veya daha fazla test edildiği takdirde % 100 duyarlı olduğu rapor edilmiştir (2). Leinberger (18) invazif infeksiyona en sık neden olan 12 *Candida* ve *Aspergillus* türünü klinik örnekten belirleyip tür düzeyinde tanımlamak için PCR-microarray sistemini oluşturmuşlar ve beş saat sonra tür düzeyinde tanımlama yapabildiklerini bildirmişlerdir.

Otomatik DNA ekstraksiyon sistemi mantarlar için de uygulanmaya başlanmıştır. Böylece hem otomatik DNA izolasyonu ve 'lightCycler' sistemler klinik örneklerden mantar DNA'sı belirlemek için çok hızlı ve çok büyük kolaylık olarak görülmektedir (3, 4, 14). LightCycler, hem klinik örneklerden organizmayı tanımayı hem de spesifik primer problemler kullanarak tür düzeyinde belirlemeyi sağlamaktadır.

Mantar identifikasyonda moleküler yöntemlerin yeri

Klinik önemli mantarların bir çoğunda tanımlama mikroskopik ve makroskopik morfolojik özelliğe dayanmaktadır. Bir çok laboratuvarında kullanılan rutin direkt mikroskopik baki, kültür ve biyokimyasal yöntemlerin (API20C, API32C gibi) yaygın *Candida* türlerini %92-97 ve nadir suşları %85-88 oranında tanıyabildiği bildirilmektedir (16, 19). Son zamandaki çalışmalarda, fenotopik idenfikasyon yöntemlerinin bazı *Candida* türlerini yanlış tanımladığı bildirilmektedir (20). Xu ve ark. (21) invazif kandidoza neden olan 58 *Candida* suşunun identifikasyonunda API20C teknolojisi ile kısa internal transcribed spacer region 2 (ITS2) ile PCR amplifikasyonu ve dizi analizini karşılaştırmışlar ve bir *C. dubliniensis* dışında doğru olarak tanı koyduklarını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada API20C teknolojisi ve PCR dizi analizi ile identifikasyon, çalışma koşulları ve zamanı incelemişler ve zaman açısından PCR ile dizi analizini önerirken kolaylık ve ekipman gerekmemesinden dolayı rutin için API20C teknolojisini önermişlerdir (Tablo 1). Çevredeki mantarların fazlalığını düşünecek olursak, yakın zamanda moleküler yöntemler tanı ve identifikasyonda konvansiyonel yöntemlerin yerini alacaktır. Ancak sınırlı sayıda mantarlar PCR ve spesifik problemlerle cins ve tür düzeyinde identifiye edilebilmektedir.

Aspergillus, *Candida*, *Cryptococcus neoformans* ve *Zygomycetes*, dermatofit ve diğer bir çok filamentöz mantarların PCR ve spesifik problemler kullanılarak tanımlandığını bildiren çalışmalar vardır (3, 8, 9, 18, 22-24). Posteraro ve ark. (25) PCR ve reverse cross blot hibridizasyonun *Candida*, *Cryptococcus neoformans* ve *Saccharomyces cerevisiae*'yi klinik örneklerden hem belirleyip hem de tanımlamada hızlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Chen ve ark. (10) tıbbi önemi olan mayaların PCR amplifikasyonu ile ITS2' deki DNA sequence polymorphism ile doğru, hızlı identifiye edildiğini göstermişlerdir. Mirhandi ve ark. (22) *Candida* türlerinin ayırımında fenotipik yöntemlerin zaman alıcı olmasından dolayı moleküler biyolojik yöntemlerden mantarların ITS1-2 rRNA genlerinin PCR ile amplifiye edilip bir kesici enzimle (Msp1) tanımlamasının basit hızlı bir şekilde yapılabildiğini bildirmişlerdir.

LuminexDNA-based multipleks teknolojisi olarak tanımlanan moleküler flow cytometri (FC) yönteminin de mantar identifikasyonunda API20 C ve large-subunit rRNA domains 1 ve 2 (D1/D2) gen dizi analizi ile karşılaştırılmasında sırasıyla %90, % 92 ve %100 başarı gösterdiği görülmüş bunun yanında FC yönteminin daha kolay ve hızlı (5 saat) olduğu bildirilmiştir (23).

Nükleik asit dizi analizi, kültürden mantarları identifiye etmek için büyük başarıyla kullanılmaktadır. Bunun yanında diğer moleküler yöntemler; 'randomly amplified polymorphic DNA analysis' (RAPD), 'restriction fragment length polymorphism' (RFLP), 'isozyme analysis', 'nucleotide sequence analysis' (26), 'DNA-DNA hybridization' (27) ve 'electrophoretic kariotype analysis' kullanılmaktadır. Son zamanlarda, iki bağımsız grup ile üçüncü bir grubun 'multilocus sequence typing' (MLST) ile de analiz edilebileceği rapor edilmektedir (28, 29). Suşlar arasında farklılığı belirlemede RFLP analizinin daha yetersiz olduğu (26), buna rağmen 'electrophoretic kariotype analysis' in yüksek oranda farklılığı belirleyebildiğinden dolayı daha fazla kullanıldığı bildirilmektedir (30). Ancak suşlar arası genetik ilişkiyi belirlemede tam yeterli olmadığına ait çalışmalar vardır. MLST yöntemi ile bir grup, araştırılan iki bağımsız grup ile karşılaştırıldığında, nükleotit dizideki farklılıkları gösterebildiği bildirilmektedir (28, 29). Bazı çalışmalar MLST analizinin nükleotit varyasyonlarını düşük düzeyde belirlediğinden sınırlı bilgi verebildiğini ve bundan dolayı polimorfik microsatellite markerları (PMMs) tiplendirmek için kullanılabileceğini bildirmektedir. Microsatellite lokusların analizinin avantajı, genomdaki zincir varyasyonlarının mikro-organizmalar arasındaki en düşük derecedeki farklılığı hızlı olarak belirleyebilmesidir (31). Lasler ve ark. (32) *C. parapsilosis* izolatları arasındaki genetik farklılığı genomik zincirinden elde edilen 'polymorphic microsatellite loci' kullanarak identifiye

edip tanımlayabildikleri çalışmalarında, 'microsatellite analysis'in fırsatçı patojen mayaların moleküler epidemiyolojik analizinde önemli ek bir yöntem olabileceğini bildirmektedirler. Moleküler yöntemler, hastanedeki salgınları saptamak ve ayrıca hastalara ilişkin ve çevresel mantar kaynağını belirlemek için de önemlidir.

Tablo 1. API20C ve PCR+dizi analizi ile identifikasyonunun laboratuvar parametreleri ile karşılaştırılması (21)

Laboratuvar parametreleri	PCR dizi analizi ile identifikasyon	API20C
Sonuçlar için zaman		
Kültür zamanı	-	72 saat
DNA ekstraksiyonu	1 saat	-
PCR amplifikasyon	3 saat	
Agoraz jel elektroforez	15 dakika	
Dizi analizi	16 saat	
Toplam zaman	20 saat	72 saat
Fiyat	Yüksek	Orta
Kullanım kolaylığı	Kompleks	Basit
Tekrarlanabilirliği	mükemmel	İyi
Subjektivitesi	Düşük	Orta
Kompleks ekipman gerekliliği	Yüksek	Orta
Rutin laboratuvarlarda uygulanabilirliği	Zayıf	İyi

Antifungal dirençe moleküler yöntemlerin yeri

Mantar infeksiyonlarının sıklığının artması ve antifungallerin sıklıkla kullanılması, tedavisi sırasında dirençlerin görülmeye başlamasına neden olmuştur. Gözlenen direnç sorunu, bu ilaçlara direnç mekanizmasının araştırıldığı çalışmalara hız kazandırmıştır. Antifungal direnç multifaktöryel özelliklere bağlıdır. Direnç *in vitro* -moleküler -linik direnç olarak ayrılabilir (32). Antifungal dirençte potansiyel mekanizmaları araştırmak için mantarların tanısında ve identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerin bir çoğu kullanılmaktadır. Ayrıca antifungal ilaçlara direnç ve duyarlılığı, benzer suşlar arasında farklılığı belirlemede yine çeşitli moleküler yöntemler (RFLP, karyotiplendirme, RAPD ve çeşitli PCR) kullanılmaktadır (33-53).

Amfoterisin B direncinin genetik temelini araştıran yalnızca birkaç çalışma vardır. Amfoterisin B direnci, ergosterol sentezinde rol alan iki enzimin gen kodundaki mutasyonlar olmasıyla ilişkili bulunmuştur. Moleküler yöntemler kullanılarak; amfoterisin B direnci olan *C. albicans* suşlarında ERG2 ve ERG3 genlerinde defekt olduğu ve bunun sonucunda ergosterol yapımında azalma olduğu rapor edilmiştir (14).

Karese ve ark. (45) amfoterisin B ve flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında DNA mikroarray analizi kullanarak gen ekspresyonundaki değişiklikleri; ergosterol biyosentez genlerindeki bu değişikliklerin sterollerin birikmesi, membran steroller için amfoterisin B afinitesinde azalma ve membran sterol üretimindeki lanosterol demetilaz aktivitesinde azalma olarak belirlemişlerdir (45).

Azollerin hedefi olan 14 alfa demetilaz (14DM) enzimini kodlayan gen ERG11 genidir. Genellikle gelişen direnç mekanizmaları bu enzimle ilgilidir. Moleküler yöntemler kullanılarak, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*'ta azol direnci ile ilişkili ERG11'de nokta mutasyonu, aşırı ekspresyon, gen amplifikasyonu ve mikotik rekombinasyonu içeren çeşitli değişiklikler gösterilmiştir (34-44). Ek olarak, ERG3 ve ERG5

gibi diğer ERG genlerini kodlayan enzimlerde değişikliğin, ergosterol biyosentez yolundaki fonksiyonel değişikliğin azol direnci ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (34, 35).

Moleküler çalışmalarla, ERG11'de nokta mutasyonun azol direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiş, özellikle *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus* ve *Pneumocystis jirovecii* suşlarında azol direnci ile ilişkili farklı nokta mutasyonları (Y132H, G464S, R467K, F126L, G129A, T229A, G307S, S405F, I1471T, D116E, E266D, T315A, G54, M220 gibi) tanımlanmıştır (38-41). Balashov ve ark. (46) *Aspergillus fumigatus*'ta itrakonazol direncini belirlemede allellerin kodlandığı genlerdeki nokta mutasyonları 'multiplex real-time PCR' kullanarak belirlemenin hızlı ve uygun bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada, flukonazole dirençli *C. albicans* klinik kökenlerinde ilaç reflüksünü kolaylaştıran genin kodu yüksek düzeyde transcription DNA ve RNA analizi (plazmid izolasyon, PCR, RFLP, kolonlama, jel elektroforez, ve southern ve northern hibridizasyon analizi) ile *MDR1* veya *CDR2* özgü primerler kullanarak gösterilmiştir (47). Farklı bir çalışmada Hiller ve ark. (48) flukonazole ve metabolik inhibitörlere dirençli *C. albicans* klinik kökenlerinin ilaç reflüksünü kolaylaştıran *MDR1* geninin kodunun over ekspresyonunu DNA analizi ve kemoluminesans ile işaretli proplarla southern hibridizasyon kullanarak göstermişlerdir. Macpherson ve ark. (43) *C. albicans*, *S. cerevisiae* suşlarında southern ve northern hibridizasyon yöntemleri ve spesifik primerler kullanarak transkripsiyon aktivatörün UPC2p ve ECM22 ergosterol sentez (ERG genleri) genlerini pozitif olarak regüle ederek azol direncine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir. *Candida dubliniensis* klinik izolatlarının flukonazole direncini belirlemek için northern blotting ve spesifik prob (ERG11, *MDR1*, *CDR*, *CDR1* ve *CDR2*) kullanarak lanosterol demetilaz (ERG11) ve efflux transporters (*CDR* and *MDR1*) genlerinin kodonlarının ekspresyonunu ve ERG11'in PCR ile amplifikasyonu yapılarak göstermişlerdir. *Candida dubliniensis*'nin flukonazole direncinde multipl mekanizmanın rol aldığını bildirmişlerdir (52). Edlin ve ark. (49) mayalarda atifungal dirençte rol oynayan genlerin hedef dizilimlerini spesifik PCR temel alan moleküler yöntemlerle basit ve hızlı olarak belirleyebileceklerini göstererek bunlar gibi çalışmalara kaynak olmuşlardır. Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada PCR ve takibinde *Candida* türlerinin identifiye edildiği ve AP-PCR (arbitrarıly primed-polymerase chain reaction) ile azol dirençli ve duyarlı *C. albicans* suşlarının moleküler farklılıklarının pratik kolay ve güvenilir şekilde tanımlandığı bildirilmektedir (51).

Ekinokandinlerin glukon sentetaz enzimi yolu ile glukon sentezini inhibe etmesinde *FKS* geninin *fgsp* fonksiyonunu etkiliyerek ortaya çıktığını ileri sürülmektedir (53).

Moleküler çalışmalarla kasfafungin direncinde *FKS1* ve *FKS2* genindeki mutasyonların rolünün önemli olduğunu bildirmişlerdir. Douglas ve ark. (53) *C. albicans* kasfofungin direncini southern ve northern hibridizasyon ve spesifik proplar ve RFLP kullanarak *FKS1* mutasyonu ve allelleri tanımlamışlardır. Benzer yöntemlerle Katiyar ve ark. (50) *C. albicans* ve *C. glabrata* kasfofungin direncindeki *FKS2* mutasyonları belirleyerek mutant genlerin dizi analizini ortaya çıkarmışlardır.

Türkiye' deki mikoloji laboratuvarlarında kullanılan moleküler yöntemler

Tablo 2'de Türkiye'de 17 farklı mikrobiyoloji ve/veya mikoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin kullanılması ile ilgili anket sonuçlarının değerlendirilmesi görülmektedir. Anket sonucuna göre; 17 merkezin 10'unda moleküler yöntemler rutin, epidemiyolojik ve/veya araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Bu merkezlerde bu yöntemi; rutin tanısal olarak bir merkez kullanırken iki merkez planlamakta; epidemiyolojik olarak beş merkez; araştırma için sekiz merkez; antifungal direnç için bir merkez kullanmaktadır. Merkezlerde kullanılan moleküler yöntemlerin başında PCR, daha sonra Real-time PCR, PFGE, RAPD, RFLP, Pan fungal PCR, PCR-sekans analizi ve karyotipleme gelmektedir. Merkezlerde moleküler

yöntemler kullanarak tanımlanan mantarların başında *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, dermatofit ve steril vucut sıvılarında mantarlar gelmektedir. Anket sonuçları, 4. Ulusal Kongre Tutanakları kitabında Saraçlı (54)'nın yaptığı anket sonuçları ile karşılaştırıldığında merkezlerde moleküler yöntemlerin kullanılmasının arttığı, ayrıca moleküler yöntemlerin çeşitlendiği ve belirlenen etken mantarların çeşitlerinin arttığı da görülmektedir. Ayrıca moleküler yöntemlerin kullanılmadığı bölgelerde de planlamanın arttığı belirlenmiştir. Moleküler yöntemleri rutin tanıda kullanan ve planlayan laboratuvarlar olduğu gibi antifungal direnç ile ilgili (Dokuz Eylül) çalışmaların olması da sevindiricidir.

Tablo 2. Türkiye' de 17 farklı mikrobiyoloji ve/veya mikoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının değerlendirilmesi

Merkezler	Moleküler yöntem kullanma	Rutin tanısal	Epidemiyolojik	Araştırma	Direnç	Mantar	Yöntem
Ankara Ü.	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Candida	PCR
Akdeniz Ü.	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Candida	PCR
Başkent Ü.	Planlanıyor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
GATA	Evet	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Steril vucut sıvılarında mantarlar, kültürden epidemiyolojik	Pan fungal PCR, PFGE, RAPD, RFLP
Gazi Ü.	Evet	Evet	Evet	Evet	Hayır	Candida, Aspergillus ve Pneumocystis	real-time PCR
Gaziantep Ü.	Planlanıyor	Planlanıyor	Hayır	Hayır	Hayır	Candida ve Aspergillus	real-time PCR
Düzce Ü.	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
Dokuz Eylül Ü.	Evet		Evet	Evet	Evet	Candida	RAPD, PCR, - RFLP, PCR- sekansanalizi, real-time PCR
Ege Ü.	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Candida , Aspergillus, Dermatofit	PCR, real-time PCR
Eskişehir Ü.	Planlanıyor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
Erciyes Ü.	Evet	Planlanıyor	Hayır	Evet	Hayır	Candida, Aspergillus ve Pneumocystis	PCR
Haran Ü.	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
İnönü Ü.	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Candida	AP-PCR ve karyotipleme
Lösemili Çocuklar Vakfı	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
Kocaeli Ü.	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Candida	PCR
Pamukkale Ü.	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-
Yüzüncü Yıl Ü.	Planlanıyor	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	-	-

Sonuç olarak; çalışmalar aşamasında moleküler testler mikoloji alanında başarıyla kullanılmıştır. Fakat bunların örnek sayısı ve klinik korelasyon çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmalar ileride moleküler yöntemlerin mantarların tanısında, identifikasyonunda ve direnci belirlemede rutin yöntemlerle birlikte kullanılabileceğini göstermektedir. Rutin laboratuvarlarda moleküler yöntemler, enfeksiyona neden olan bütün mantarların tanısında yer almayabilir fakat sık karşılaşılanların çalışılması kesinlikle gerekli olacaktır. Özet olarak, mantar enfeksiyonlarının tanısında daha doğru ve daha duyarlı olacağı bildirilen bu testler geniş kapsamlı olarak kullanılabilir ancak bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Roberts GD, Goodman NL. Laboratuvar diagnosis. In: Merz WG, Hay RJ, eds. *Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology*. 2005: 80-96.
2. Lindsley MD, Warnock DW, Morrison CJ. Seroloji and diagnosis of fungal Infections. In: Dentrick B, Hamilton RG, Folds JD, eds. 7th ed. Washington, DC: ASM Pres, 2006.
3. Francesconi A, Kasai M, Petraitiene R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2475-2480.
4. 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: 745-753.
5. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comprison of non-culter-based methods for detection of systemic fungal infections, whit an emphasis on invasive *Candida* infection. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2181-2187.
6. Helwed-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2068-2072.
7. Mitchell TG, Freedman EZ, White TJ, Taylor JW. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 253-255.
8. 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: 1353-1360.
9. Yeo SF, Wrong B. Current status of noncultere methods for diagnosis of invasive fungal infection. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 465-484.
10. Chen YC, Eisner JD et al. Identification of medically important yeasts using PCR- based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer region 2 of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2302-2310.
11. Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 667-672.
12. Aracia S, Sandini A, Cassone F, De Bernardis F, La Valle R. Construction and use of PCR primers from a 70 kDA heat shock protein gene for identification of *Candida albicans*. *Mol Cell Probes* 1997; 11: 329-336.
13. Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC, Frosch M, Mühlischlegel FA. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated *PHR1* and *PHR2* genes of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1587-1590.
14. Loeffler J K, Henke N, et al. Quantification of fungal DNA by using using flourescence resonance energy transfer tecnology and light cycler sytem. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 586-590.
15. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically imported yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2240-2243.
16. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, et al. Development and validation of a quantitative Real-time PCR assay using flouresence resonance energy transfer tecnology for detection of *Aspergillus* spp. experimental pulmonal aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5676-5682.
17. Sheppard DC, Marr KA, Fredricks DN, Chiang LY, Doedt T, Filler SG. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 376-380.
18. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNAMicroarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4943-4953.
19. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, et al. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 11: 3396-3398.
20. Rowen JL, Tate JM, Nordoff N, et al. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3735-3737.
21. Xu J, Millar B C, Moore J E, et al. Infections of *Candida* spp. isolated from bloodstream Comparison of API20C with molecular identification *J Clin Pathol* 2002; 55: 774-777.
22. Mirhendi H, Makima K, Khoramizeden M, Yuamaquehi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 2006;47: 225-229.
23. Page BT, Shields CE, Merz WG, KurtzmanCP. Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3167-3171.
24. Yamagata E, Kamberi P, Yamakami Y, Hashimoto A, Nasu M. Experimental model of progressive disseminated trichosporonosis in mice with latent trichosporonemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3260-3266.
25. Posteraro B, Sanguinetti M Masucci L, et al. Reverse cross blot hybridization assay for rapid detection of PCR-amplified DNA from *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1609-1614.
26. Lehmann P F, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3249-3254.

27. Roy B, Meyer SA. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 216–218.
28. Fundyga R E, Kuykendall RJ, Lee-Yang , Lott TJ. Evidence nfor aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 37–43.
29. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 284–292.
30. De Bernardis F, Mondello F, Milla`n RS, Ponto`n J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3481–3486.
31. Lasker BA, Butler G, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* Group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 2006; 44:750–759.
32. Arkan S, Rex JH. Resistance to antifungal agents. *In: Merz WG, Hay RJ, eds. Topley Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology*. 2005: 168-181.
33. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382–402.
34. Nolte FS, Parkinson T, et al. Isolation and characterization of fluconazol and amphotericin B-resistance *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 44:196-199.
35. Orozco AS, Higginbotham LM, et al. Mechanisms of fluconazol resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2648-2649.
36. White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR and MDR1 correlate with increases in azoles resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997a; 41:1482-1487.
37. White TC, Holleman S, et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1704-1713.
38. Loeffler J, Kelly SL, et al. Molecular analysis of cyp51 from fluconazol-resistance *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 151: 253-258.
39. Chen J, Li H, Li R, et al. Mutations in the cyp51A gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially from a patient with lugh aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:31-37.
40. Lo HJ, Wang JS, Lin CY, et al. Efg1 involved in drug resistance by regulating the expression of ERG3 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1213-1215.
41. Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG. Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drug. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 741-748.
42. Sanglard D, Ischer F, et al. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeasts clinical isolates. *Drug Resist Update* 1998;1: 255-265.
43. MacPherson S, Akache B, Weber S, et al. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drug and activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1745-1752.
44. Kurtz MB, Douglas CM. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* 1997; 35:76-86.
45. Barker KS, Crisp S, Wiederhold N, et al. Genome-wide expression profiling reveals genes associated withamphotericin B and fluconazole resistance in experimentallyinduced antifungal resistant isolates of *Candida albicans* *J Antimicrob Chemother* 2004;54:376–385.
46. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, High-Throughput, Multiplex, Real-Time PCR for Identification of Mutations in the cyp51A Gene of *Aspergillus fumigatus* That Confer Resistance to Itraconazole. *J Clin Microbiol* 2005;43;214–222.
47. Harry JB, Oliver BG, Song JL, Silver MP, Little JT, Choiniere J, White TC. Drug-Induced Regulation of the *MDR1* Promoter in *Candida albicans* *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2785–2792.
48. Hiller D, Stahl S, Morschhauser J. Multiple cis-Acting sequences mediate upregulation of the *MDR1* efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 2300–2308.
49. Edlind TD, Henry KW, Vermitsky JP, Edlind MP, Raj S, Katiyar SK. Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. *Curr Genet* 2005;48:117-25.
50. Katiyar S, Pfaller M, Edlind T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates Exhibiting Reduced Echinocandin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2892–2894.
51. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:1027-1032.
52. Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 46; 1695–1703.
53. Douglas CM, D’ippolito JA, Shei GJ, et al. Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-b-D-glucan synthase inhibitors *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2471–2479.
54. Saraçlı M. Mikozların moleküler tanısı: neredeyiz ?. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 3-5 Mayıs, Konya s. 33-45,2005