

Mantarlara Ait DNA Eldesinde İki Farklı Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması ve Sekans Analizlerinin Değerlendirilmesi

Nilgün IŞIK(*)

(*) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Bağışıklık yetersizliği olan hastalarda, özellikle lösemi, lenfoma ve transplantasyon hasta gruplarında, mantar infeksiyonlarının yüksek oranda morbidite ve mortaliteye yol açtıkları bilinmektedir. Kan kültürü ve seroloji gibi klasik tanı testleri, mantar infeksiyonlarının erken tanısı için yeterince duyarlı ve özgül değildir. Bu nedenle son yıllarda, daha duyarlı ve özgül moleküler biyoloji yöntemleri kullanıma girmiştir. Bu çalışmada, bağışıklık yetersizliği olan hasta gruplarından alınan 120 EDTA'lı kan örneği ile çalışılmış; hastalardan alınan kan örneklerinden, DNAzol yöntemi ve ticari DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılarak, DNA izole edilmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanan örnekler, %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve pozitif örneklerin jelde mantar türlerine özgü ürünlerin verdiği 500 bp'lik tek bandı verdikleri saptanmıştır. Örneklerin sekans analizi için öncelikle Qiagen purifikasyon kiti kullanılarak, miktarları saptanan PCR ürünlerinin beş katı oranda alkol serileri ile muamele edilerek, özel filtreleri bulunan kolonlardan süzülen DNA'lar saflaştırılmıştır. PCR ürünleri Qiagen Dye Ex kiti kullanılarak işaretlenmiştir. Sekans analizleri ABI Prism 377 (Perkin Elmer) aletiyle yapılmıştır. BLAST programı kullanılarak sekans analizleri değerlendirilmiş ve pozitif olarak değerlendirdiğimiz örneklerin, mantar türlerine özgü gen dizileri taşıdıkları saptanmıştır. Yüzyirmi kan örneğinde uygulanan iki farklı ekstraksiyon tekniği sonuçları karşılaştırıldığında, DNA izolasyonunda Qiagen ekstraksiyon tekniğinin daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Qiagen kitiyle bulunan 20 pozitif örneğin, DNAzol tekniği kullanıldığında yalnızca 5'inde pozitiflik saptanmıştır. Bu da bize infeksiyon etkenlerinin tanısı amacıyla kullanılan ekstraksiyon teknikleri seçilirken, maliyet uygunluğu yanısıra duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan yöntemlerin seçilmesi gerektiğini göstermektedir. Örnekler üzerine yapılan ekstraksiyon (Qiagen) ve PCR'ı takiben, 20 pozitif örnek bulunmuştur. Pozitifliklerin %35'inin *Aspergillus niger*, %60'ının *Aspergillus fumigatus* ve %5'inin mikst infeksiyon (*A.niger/A.fumigatus*) olduğu saptanmıştır. Son yıllarda özellikle araştırmalarda PCR ürünlerinin gerçekte aranılan suş olup olmadığının saptanmasında, sekans analizlerinin yapılarak doğrulanması gerektiği vurgulanmaktadır. Çalışmada öncelikle mantar infeksiyonu tanısı amacıyla DNA izolasyonunda uygulanan ekstraksiyon tekniklerinden ikisini karşılaştırarak, en uygun teknik olarak; DNAzol tekniğine göre maliyeti yüksek fakat PCR sonuçları daha iyi olan Qiagen tekniği ekstraksiyonda kullanılmıştır. PCR sonuçlarında mantarlara spesifik kullandığımız 18S rRNA gen dizilerini taşıyan primerlere özgü ürünlerin, agaroz jelde 500 bp'lik tek band verdiği saptanmış ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif örneklerin, sekans analizleri de değerlendirildiğinde *A.fumigatus*, *A.niger*, türlerine ait gen dizileri taşıdıkları saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Mantar, ekstraksiyon yöntemi

SUMMARY

Comparison of Two Different Extraction Methods in Isolation of DNA from Fungi and Interpretation of Sequence Analysis

In immunosuppressed patients, particularly in leukemia, lymphoma, and transplantation patient groups, fungal infections are known to cause high mortality and morbidity rates. Classical diagnosis tests such as hemoculture and serology are not sufficiently specific and sensitive in early diagnosis of fungal infections. For this reason currently molecular biological methods that are more specific and sensitive are in used. In this study, blood samples with EDTA from 120 immunosuppressed patients were studied; DNA was isolated from the blood samples by using DNAzol method and commercial DNA extraction kit (Qiagen) samples on which PCR had done were monitored on %2 agarose gel. Positive samples were noted to give 500 bp single bands, which is specific to fungal products on agarose gel. Qiagen purification kits were used for analyses of the samples. Amounts of PCR products were measured and mixed with %96 and %70 percent alcohol. After that DNA filtered from columns were purified. PCR products were labeled by using Qiagen Dye Ex kit. Sequence analyses were performed by ABI Prism377 (Perkin Elmer) device. Sequence analyses were evaluated by using blast programme and the samples evaluated, as positive

samples were observed to posses gene sequences specific to fungus species. When the results of two different extraction techniques, applied to 120 blood samples, were compared, it is observed that Qiagen extraction techniques showed better results in DNA isolation. 20 positive samples were found by Qiagen techniques and only 5 were found by DNAzol techniques. This shows us, in choosing the extraction techniques used for diagnosis of infection agents, besides cost effectiveness the techniques, methods which are more specific and sensitive, should be chosen. Following extraction (Qiagen) and PCR, 20 positive samples were found 35% of the positivities were found to be *A.niger*, 60% *A.fumigatus* and 5% mixed infections (*A.niger/A.fumigatus*). Recently, particularly in studies, in determination of whether PCR products are really the target strain or not, it is stressed that sequence analysis has to be done and verified. In our study, primarily two of the extraction techniques used in DNA isolation for diagnosis of fungal infections, were compared. Qiagen techniques were used in extractions, which are expensive but have better PCR results than DNAzol techniques. The products specific to 18S rRNA gene sequences in PCR results were observed to give single band evaluated by sequence analysis, positive samples were observed to posses gene sequences from *A.fumigatus* and *A.niger* species.

Key words: Fungi, extraction techniques

GİRİŞ

Günümüzde ölümcül sistemik mantar infeksiyonlarının oranı, risk grubundaki hastalardan özellikle bağışıklık yetmezliği olan kanserli hastalar, transplantasyon hastaları gibi gruplarda anlamlı olarak artmıştır. Bu hastalarda hücrel immunitenin bozulması ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi sırasında gelişen kolonizasyon, mantar infeksiyonları için bilinen risk faktörleridir. Ayrıca bu hastalarda başarılı bir antifungal tedavinin önündeki en önemli engel, tanı konulmasındaki güçlülüdür. Son yıllarda mantar infeksiyonların tanısına yönelik önemli gelişmeler olmuş ve bugüne kadar tanıda kullanılan kültür, mikroskop incelemesi ve antijen tayini gibi yöntemler yerine duyarlılık ve özgüllüğü yüksek PCR'a dayalı kısa sürede sonuç veren teknikler kullanıma girmiştir. Kantitatif niteliği de olan bu yöntemlerle hem tanı konulması, hem de tedaviye yanıtın izlenmesi mümkündür (1,2,3). Duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olan PCR'a dayalı tanı testlerinin güvenilir biçimde yapılması içinde; günlük, kolay uygulanabilen, kısa sürede sonuç veren ve DNA'yı en saf şekilde izole edebilen özellikte, en uygun ekstraksiyon tekniği seçilmektedir (4,5,6). Bu amaçla çalışmamızda *Aspergillus* ve *Candida* cinslerine ait DNA'ların eldesinde kullanılmakta olan iki farklı ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon öncesi infekte olmayan sağlıklı gönüllü kanları kullanarak mililitrede 10^4 - 10^0 CFU (Colony Forming Unit) arasında *Aspergillus fumigatus* dilüsyon serileri hazırlanıp, DNAzol ve Qiagen ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Daha sonra PCR'ları yapılarak ürünler agaroz jelde görüntülenmiştir. Ayrıca bağışıklık

yetersizliği olan hasta gruplarından alınan kan örneklerinde DNA izolasyonunda bu iki yöntem kullanılmıştır. Daha sonra hasta gruplarında bulduğumuz pozitif örneklerin sekans analizleri de yapılarak hangi tür *Aspergillus* nükleik asit sekansları taşıdıkları araştırılmıştır. Çalışmamızda; birinci hedef, mantar infeksiyonların tanısı amacıyla uygulanan ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılarak en uygun olanının belirlenmesidir. İkinci hedef, bu iki yöntem bağışıklık yetersizliği olan hasta gruplarında mantar infeksiyonları tanısında kullanılarak 120 kişilik grupta ne oranda *Aspergillus* infeksiyonu saptandığı, ayrıca iki teknikle bulunan pozitiflik oranı karşılaştırılmıştır. Üçüncü hedef, örneklerin sekans analizleri yapılarak hastaların hangi tür mantar infeksiyonlu olduklarının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda ekstraksiyon öncesi, *Aspergillus fumigatus* suşu Sabouraud Dextroz Agar (SDA)'da 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra infekte olmayan sağlıklı gönüllü kanları içine mililitrede 10^4 ile 10^0 CFU olacak şekilde *A.fumigatus* suşu ile dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Sonra bu kan örneklerinden DNA izolasyonu, DNAzol ve Qiagen (QIAmp Tissue Kit) yöntemleriyle yapılmıştır. DNAzol tekniğinde (7); EDTA'lı kan örneği üzerine DNAzol ve polyacryl carrier solüsyonu ilave edilerek vorteksledikten sonra oda ısısında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası birkaç seri etanol (%95'lik) ilave edilerek 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen örneklerden izole edilen DNA'lar steril distile su ile sulandırılmıştır. Qiagen tekniğinde (8) ise öncelikle eritrositlerin hipotonik lizisi (10 mM, Tris, 5 mM

MgCl₂, 10 mM NaCl solüsyonuyla), sonra lökositlerin lizisi (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl ve 200 µg Proteinaz K solüsyonuyla) yapılmıştır. Örnekler 300 µg/ml'lik lyticase enzimi ile inkübasyondan sonra Qiagen kiti kolonlarından süzölmüştür. Daha sonra kit protokolüne uygun olarak işlemler sürdürölmüş en son DNA'lar ependorf tüplerde toplanmıştır. İki ekstraksiyon yönteminde de negatif kontrol (steril distile su) ve pozitif kontrol (A.fumigatus suşundan hazırlanan dilüsyon >10⁶ CFU/ml) kullanılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca bağışıklık yetersizliği olan hasta gruplarından alınan 120 EDTA'lı kan örneğinde DNA izolasyonunda yine DNAzol ve Qiagen teknikleri kullanılmıştır. Ekstraksiyonu takiben tüm örneklerin amplifikasyon işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, universal mantar primerleri 18S rRNA (5'-ATT GGA GGG CA-A GTC TGG TG, 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG) kullanılarak thermal cycler'da 35 döngölük (30 sn 94°C, 1 dk 62 °C, 2 dk 72 °C) amplifikasyon işlemi yapılmıştır. PCR sonrası pozitif olarak değeriendirilen örneklerin sekans analizleri incelenerek, hastaların hangi tür mantar infeksiyonlu oldukları tespit edilmiştir. Örneklerin sekans analizi için öncelikle Qiagen purifikasyon kiti kullanılarak, miktarları ölçölen PCR ürünlerinin beş katı oranda alkol serileri ile muamele edilmiş ve özel filtreleri bulunan kolonlardan süzülen DNA'lar saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış DNA'lar Qiagen Dye Ex kiti kullanılarak fluoresans veren boyalarla işaretlenmiştir. Bunun için spektrofotometrede miktarları ölçölen örnekler, primerler, kit içinden çıkan ve değışik renklerle işaretlenmiş baz dizileri içeren terminatör solüsyonuyla birlikte inkübe edilerek işaretleme yapılmıştır. Son aşamada sekans analizleri ABI Prism 377 (Perkin Elmer) aletiyle yapılmıştır. Bilgisayarda BLAST programı kullanılarak sekans değeriendirmeleri yapılmıştır (9).

BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız DNAzol ve Qiagen ekstraksiyon tekniğı karşılaştırma sonuçları tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda bağışıklık yetersizliği olan 120 kişilik hasta gruplarından yapılan ekstraksiyon ve PCR'ı takiben Qiagen tekniğı ile Aspergillus infeksiyonlu 20 pozitif örnek bulunmuştur. Pozitifliklerin %35'inin A.niger, %60'ının A.fumigatus ve %5'inin mikst infeksiyon (A.niger/A.fumigatus) olduğı, sekans ana-

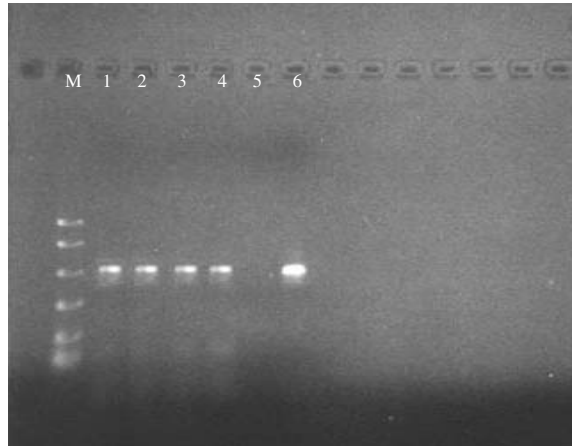
Resim1. Qiagen tekniğı agaroz jel görüntüsü



Sıralar:M: Molekül ağırlık standardı (PCR Markır)

1. Birinci hasta
2. İkinci hasta
3. Üçüncü hasta
4. Dördüncü hasta
5. Negatif kontrol (steril distile su)
6. Pozitif kontrol (>10⁶ CFU/ml A.fumigatus)

Resim 2. DNAzol tekniğı agaroz jel görüntüsü



Sıralar:M: Molekül ağırlık standardı (PCR Markır)

1. Birinci hasta
2. İkinci hasta
3. Üçüncü hasta
4. Dördüncü hasta
5. Negatif kontrol (steril distile su)
6. Pozitif kontrol (>10⁶ CFU/ml A.fumigatus)

Tablo1. Ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırılması

Method	Süre	Test başına maliyet
QIAmp Tissue (Qiagen)	4 saat	2.5 (USD)
DNAzol	4 saat	1 (USD)

Method	Dilüsyonlar (CFU/ml)				
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
QIAmp Tissue (Qiagen)	—	—	—	—	—
DNAzol	—	—	—	—	—

Şekil 1. Ekstraksiyon sonrası yapılan PCR'da ürünlerin 10⁴ ile 10⁰ CFU/ml arasındaki A. fumigatus dilüsyonlarındaki band verileri.

lizleri yapılarak doğrulanmıştır. DNAzol tekniği ile yalnızca beş kişide *A.fumigatus* infeksiyonu saptanmıştır.

DNAzol ve Qiagen tekniklerinde pozitif bulduğumuz dört örnek ile negatif ve pozitif kontrolümüzün agaroz jeldeki görüntüleri ise resim 1 ve 2’de gösterilmiştir.

Resim 1’de görüldüğü gibi Qiagen tekniğinde dört hastanın agaroz jeldeki band görüntüleri kuvvetlidir, oysa ki resim 2’de DNAzol tekniği ile aynı hastaların band görüntüleri zayıftır.

TARTIŞMA

Mantar infeksiyonları bağışıklık yetmezliği olan hasta gruplarında morbidite ve mortalite oranlarını artırmaktadır. Mantar infeksiyonları tanısı için kullanılan yöntem olan kültür için her zaman örnek elde edilmesi kolay değildir. Altta yatan hastalığa veya sitotoksik kemoterapiyle hücrel immunitenin zayıflamasıyla gelişen trombositopeni, derin dokularda biyopsi ile kültür için örnek alınmasını güçleştirmektedir, ayrıca sonuçlar her zaman yönlendirici olmamaktadır. Tanı konulmasındaki bu güçlükler tedavinin optimal düzeyde verilmesini engellemektedir. Son yıllarda PCR’in mantar infeksiyonları tanısında uygunluğunu destekleyen birçok araştırma yapılmış ve duyarlılık ve özgüllüklerinin diğer yöntemlere göre yüksek olduğu bildirilmiştir (10,11).

Tanıda bu denli umut verici görünen PCR çalışmalarında, duyarlılık ve özgüllüğün en üst sınırdaki tutulması için, kontaminasyona neden olabilecek tüm ayrıntılara dikkat edilmesinin yanı sıra, DNA’yı en saf olarak elde edebileceğimiz ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmesi de önemlidir. Ayrıca zaman ve maliyet açısından da uygun olan ve duyarlılık ve özgüllüğü en yüksek ekstraksiyon yöntemleri kullanılmalıdır (8). Bu nedenle çalışmamızda mantar infeksiyonları tanısında DNA izolasyonunda kullanılan iki farklı ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Sonuçta maliyeti biraz daha yüksek olan fakat duyarlılığı daha yüksek olan Qiagen tekniği kullanılarak bağışıklık yetmezliği olan 120 hastanın 20’sinde *Aspergillus* infeksiyonu saptanmıştır. DNAzol tekniği kullanıldığında ise yalnızca beş kişide *Aspergillus* infeksiyonu tespit edilmiştir. Bu çalışmaya benzer sonuçlar, Loffler ve arkadaşlarının çalışmasında da bildirilmiştir

(8).

Çalışmamızda Qiagen tekniğiyle daha özgül ve duyarlı sonuçlar alınmıştır. PCR çalışmalarında en uygun ekstraksiyon tekniklerinin seçilmesinin bir diğer önemi de, muayene maddelerinde çok düşük miktarda hedef molekül bulunması durumudur (12). Bu nedenle PCR sonrası yapılan amplifikasyon sonuçları değerlendirildiğinde; Qiagen tekniği ile en son 10^2 CFU/ml’lik DNAzol tekniğinde ise 10^4 CFU/ml’lik *A.fumigatus* dilüsyon serisinde pozitiflik saptanmıştır. Böylece ekstraksiyonun Qiagen tekniğiyle yapılmasına karar verilmiştir. *Aspergillus* infeksiyonları tespit edilen örneklerimizin sekans analizleri de değerlendirildiğinde, sonuçların *A.fumigatus* ve *A.niger* türlerine ait gen dizilerine sahip oldukları görülmüştür.

Bu bulgulara göre; ekstraksiyonda en güvenilir sonuçların Qiagen tekniğiyle alındığı, Qiagen tekniğinde 20 kişi, DNAzol tekniğinde ise sadece beş kişide *Aspergillus* infeksiyonu bulunmuştur. Sonuçta %35 *A.niger*, %60 *A.fumigatus*, %5 mikst (*A.niger/A.fumigatus*) infeksiyonları tespit edilmiş ve mantar infeksiyonları içinde *Aspergillus* infeksiyonlarının azımsanmayacak oranda olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Buchman TG, Rossier M, Merz WG: Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I: Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery* 108:338 (1990).
2. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 40:358 (1994).
3. Melchers WJG, Verweij PE, van den Hurk P, van Belkum A, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFGM: General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species, *J Clin Microbiol* 32:1710 (1994).
4. Gabal M: Development of a chromosomal DNA probe for the laboratory diagnosis of aspergillosis. *Mycopathologia*; 106:121 (1992).
5. Tang C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Cohen J: The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 148:1313 (1993).
6. Sandhu G, Kline B, Stockman L, Roberts G: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 33:2913 (1995).
7. Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W:

DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* 22:550-53 (1997).

8. Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H: Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood, *J Clin Microbiol* 35:3311-12 (1997).

9. Jaeger EEM, Carroll NM, Choudhury S, et al: Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 38:2902 (2000).

10. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R: Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 37:3865 (1999).

11. Kawamura S, Maesaki S, Omagari K, Hashiguchi K, Tomono K, Tashiro T, Kohno S: Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed early by polymerase chain reaction assay. *Intern Med* 38:744 (1999).

12. Kitchin PA, Bootman JS: Quality control of the polymerase chain reaction. *Rev Med Virol* 3:107 (1993).