

Penggunaan Kaedah Tindak Balas Rantai Polimerase dalam Penentuan Prognosis Infeksi Sistemik Kandidiasis pada Tikus

(Determining Prognosis of Systemic Candidiasis Infection in Rats with the Polymerase Chain Reaction Method)

JACINTA SANTHANAM*, SITI AZURA ZAINON, CHIN CHOOK FUNG & FAEZAH SHEKH ABDULLAH

ABSTRAK

Infeksi kulat sistemik yang paling kerap berlaku pada pesakit hospital adalah infeksi kandidiasis yang disebabkan oleh Candida spp. Pendiagnosan infeksi ini melalui pengkulturan dan ujian serologi mengambil masa ataupun kurang sensitif dan spesifik. Oleh itu, tindak balas rantai polimerase (PCR) yang mengesan DNA kulat telah diperkembangkan untuk mendapatkan diagnosis yang cepat dan tepat. Dalam kajian ini, keupayaan asai PCR 'seminested' untuk mengesan infeksi sistemik Candida albicans pada haiwan makmal telah ditentukan. Tikus dewasa Sprague-Dawley diinfeksi dengan C. albicans secara suntikan intravena sel yis tersebut. Darah tikus diperolehi setiap 3 atau 4 hari untuk ekstraksi DNA. Setiap minggu, 3 ekor tikus dikorbankan dan organ-organ dalamannya dikultur untuk memastikan kehadiran infeksi sistemik C. albicans. Tempoh kajian ini adalah selama 4 minggu (28 hari). PCR 'seminested' dijalankan ke atas sampel DNA dengan menggunakan primer fungus universal, iaitu ITS1 dan ITS3 serta primer spesifik C. albicans (CALB1). Produk PCR yang terhasil dikesan dengan elektroforesis gel agaros. Asai PCR 'seminested' berjaya mengesan DNA C. albicans di dalam sampel darah haiwan terinfeksi dari hari ke-2 sehingga hari ke-25 pos-infeksi secara tekal. Pengkulturan organ ginjal, hati dan limpa menunjukkan haiwan tersebut diinfeksi secara sistemik sehingga hari ke-21 pos-infeksi dan telah pulih (keputusan kultur negatif) pada hari ke-28 pos-infeksi. Kesimpulannya, kajian ini menunjukkan PCR 'seminested' adalah satu kaedah yang berupaya mengesan infeksi sistemik Candida albicans sepanjang tempoh infeksi. Oleh itu, asai PCR ini mempunyai nilai sebagai kaedah diagnosis yang berkesan dan juga mampu menentukan prognosis apabila memantau status infeksi.

Kata kunci: Candida; infeksi sistemik; prognosis; seminested

ABSTRACT

Candidiasis infections caused by the fungi Candida spp. are currently the most common systemic fungal infection in hospitalised patients. Diagnostic procedures involving culture or serological tests are either slow or lacking sensitivity and specificity. Thus polymerase chain reaction (PCR) assays which detect fungal DNA have been developed to provide a rapid, accurate diagnosis. In this study we evaluated a seminested PCR assay for the detection of systemic Candida albicans infection in laboratory animals. Adult Sprague-Dawley rats were infected with C. albicans by intravenous injection of yeast cells. Blood was collected from the animals every 3 to 4 days for extraction of DNA. Each week, 3 animals were sacrificed and their organs were cultured to confirm systemic C. albicans infection. The study period was 4 weeks (28 days). A seminested PCR was performed on DNA samples using universal fungal primers (ITS1 and ITS3) and a C. albicans specific primer (CALB1). The PCR product was detected by agarose gel electrophoresis. The PCR assay was able to detect C. albicans DNA in the blood samples of infected animals consistently from day 2 until day 25 post-infection. Organ culture of kidneys, liver and spleen revealed that the rats were systemically infected until day 21 post-infection and had recovered from infection (negative culture results) by day 28 post-infection. This study shows that the seminested PCR was an effective method to detect systemic C. albicans infection throughout the infection period. Therefore this assay is not only a diagnostic tool but has prognostic value as well for the monitoring of infection status.

Keywords: Candida; prognosis; seminested; systemic infection

PENGENALAN

Kandidiasis adalah penyakit mikosis yang wujud sama ada secara akut atau kronik, superfisial atau tersebar, yang disebabkan oleh spesies *Candida* (Emmons et al. 1971). Menurut Conant et al. (1971) pula, kandidiasis

disebabkan oleh spesies *Candida*, terutama *Candida albicans* yang mana ia boleh menjadi infeksi akut atau subakut dan boleh menyebabkan lesi pada mulut, vagina, kulit, kuku, bronkiol, atau paru-paru dan kadangkala menyebabkan septisemia, endokarditis atau meningitis.

Infeksi sistemik kandidiasis selalu berlaku pada pesakit terimunokompromi melibatkan demam jenis intermiten, pembengkakan nodul dan papula serta kesakitan pada otot, injap jantung, otak dan ginjal. Kadar morbiditi dan mortaliti yang disebabkan oleh infeksi *Candida* spp. semakin meningkat terutamanya di kalangan pesakit yang terimunokompromi (Dupont 1990 & Walsh et al. 1995). Memandangkan bilangan individu yang rentan terhadap infeksi *Candida* spp. semakin meningkat, maka kefahaman mengenai *Candida* spp. dan kaedah diagnosis yang berkesan adalah penting untuk kawalan dan rawatan infeksi. Pengesanan infeksi *Candida* spp. biasanya adalah berpandu pada ciri-ciri klinikal dan diagnosis makmal. Kaedah diagnosis makmal konvensional mengambil masa dua hingga lima hari untuk mendapat keputusan dan masalah ketidakspesifikan sering ditemui (Liu et al. 1996).

Oleh itu berkadar dengan peningkatan infeksi ini, satu kaedah diagnosis baru yang lebih sensitif, cepat dan spesifik perlu dicari. Reaksi rantai polimerase (PCR) telah dibuktikan dapat menjadi alat yang lebih sensitif untuk mengesan atau mendiagnos pada peringkat awal beberapa penyakit berjangkit (Wahyuningsih et al. 2000). Sebelum ini banyak kajian telah dijalankan tentang penggunaan PCR untuk mendiagnos infeksi kandidiasis seperti pengesanan subunit kecil rRNA (Niesters et al. 1993), gen lanosterol demetil (Morace et al. 1993) dan gen rRNA 5.8S (Holmes et al. 1994). Kaedah ini berkesan dalam pengesanan infeksi genus *Candida*, tetapi pengcaman ke peringkat spesies adalah perlu untuk pemberian rawatan yang tepat kepada pesakit.

Selain itu, Bougnoux et al. (1999) telah menggunakan kaedah 'nested' PCR untuk mengesan jangkitan kandidiasis sistemik. Hasilnya, mereka membuktikan bahawa serum lebih sesuai dijadikan sampel berbanding darah kerana 93% dari sampel serum menunjukkan hasil yang positif berbanding 86% sampel darah. Kajian yang dilakukan oleh Wahyuningsih et al. (2000) juga melibatkan penggunaan serum untuk mengesan DNA *Candida albicans* dengan kaedah PCR. Di dapati PCR adalah lebih sensitif berbanding kultur darah kerana ada di antara pesakit yang mana kultur darahnya adalah negatif tetapi PCR pula menunjukkan hasil yang positif. Satu kajian baru oleh Mousavi et al. (2007) telah mendapati bahawa enzim restriksi, iaitu *MspI* telah berjaya dalam pemotongan dan pengesanan DNA ribosom spesies *Candida* dengan menggunakan teknik PCR-RFLP. Oleh itu, enzim ini adalah bernilai dalam aplikasi diagnosis molekul untuk penyakit kandidiasis berbanding kaedah lama.

Tujuan kajian ini dilakukan adalah untuk melihat sama ada PCR dapat dijadikan sebagai salah satu kaedah untuk mengesan infeksi kandidiasis sistemik dari sampel darah dan serum tikus sepanjang tempoh infeksi dalam haiwan.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGARUHAN INFeksi KANDIDIASIS DALAM HAIWAN KAJIAN

Tikus yang digunakan adalah tikus jantan *Sprague Dawley* berberat badan 150 g hingga 200 g (Unit Sumber Haiwan, UKM). Yis *Candida albicans* digunakan untuk menginfeksi haiwan. Ia disubkultur pada plat SDA dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Kemudian, yis tersebut disubkultur pada kaldu Sabouraud dekstros (37°C; 24 jam). Sel yis yang diperolehi dicuci dengan larutan salin normal dan dikira jumlahnya dengan hemasitometer dan ujian viabiliti (mengira bilangan sel hidup).

Subjek kajian terbahagi kepada 14 ekor tikus ujian (tikus terinfeksi) dan 10 ekor tikus kawalan. Sebanyak 0.5 mL sediaan suspensi yis *Candida albicans* (1×10^6 sel yis per mL larutan salin) disuntik secara intravena pada tikus ujian. Manakala, tikus kawalan disuntik dengan 0.5 mL larutan salin normal yang steril secara intravena.

PEROLEHAN DARAH DAN SERUM SERTA PENGKULTURAN ORGAN

Darah dan serum tikus diambil menggunakan tiub kapilari berheparin melalui sinus orbital pada setiap 3 hingga 4 hari; sebahagian darah disimpan dalam tiub berEDTA dan sebahagian lagi dalam tiub tidak berEDTA. Sampel darah disimpan pada suhu 4°C sebelum pengekstrakan DNA dijalankan. Manakala, darah yang dikumpulkan dalam tiub tidak berEDTA, dibiarkan semalaman pada suhu 4°C untuk mendapatkan sampel serum, yang seterusnya disimpan pada suhu -20°C sehingga digunakan untuk ekstraksi DNA.

Pengkulturan organ (hepar, limpa dan ginjal) dilakukan ke atas 3 ekor tikus, setiap kali, yang dikorbankan pada hari ke-7, 14, 21 dan 28. Organ-organ yang diambil dicincang halus dalam salin normal. Ampaian organ dicairkan (10^{-2}), dititiskan pada plat SDA dan diinkubasi (37°C; 48 jam). Bilangan koloni yis yang tumbuh bagi setiap gram berat organ (CFU/g) dikira.

PENGEKSTRAKAN DNA DARI SAMPEL DARAH DAN SERUM TIKUS

Pengekstrakan DNA *Candida* daripada sampel darah dan serum dilakukan dengan menggunakan kit komersial (Genomic DNA Purification Kit, Promega Corp, Amerika Syarikat). Sebanyak 300 µL sampel darah dimasukkan ke dalam tiub 1.5 mL yang mengandungi 900 µL larutan lisis sel dan kemudian direndam dalam mandian air (suhu bilik; 10 minit). Selepas itu, sampel darah tersebut atau 300 µL sampel serum ditambah dengan 200 µL larutan 50 nM EDTA dan 7.5 µL litikase seterusnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 minit. Sampel diempar (13000 rpm; 2 minit) dan pelet di tambah 300 µL larutan lisis nukleus dan direndam dalam mandian air (37°C; 15 minit). Setelah sejuk, 100 µL larutan presipitasi protein ditambah dan divorteks.

Larutan supernatan diambil dan dicampurkan dengan 300 μL larutan isopropanol. Campuran diempar (13000 rpm; 2 minit) sehingga bebenang DNA atau pelet putih kelihatan. Seterusnya, larutan supernatan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 300 μL larutan etanol. Sampel DNA kemudiannya ditambah dengan 20 μL larutan rehidrasi DNA dan 1.5 μL larutan RNase, diinkubasi (37°C; 15 minit) dan disimpan semalaman pada suhu 4°C. DNA tersebut disimpan pada suhu -20°C sehingga PCR dijalankan.

PCR 'SEMINESTED'

Komponen 'seminested' PCR disediakan berpandu kepada kaedah penyediaan yang disyorkan oleh Syarikat Promega (Amerika Syarikat). PCR 'seminested' adalah reaksi PCR yang dijalankan dua kali berturut-turut, yang mana primer bagi reaksi kedua mengamplifikasikan bahagian DNA yang lebih spesifik. Reaksi PCR pertama menggunakan set primer umum untuk fungus, iaitu ITS 1 (5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGGA-3') dan ITS 3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'). Manakala, PCR kedua menggunakan primer spesifik *Candida albicans*, iaitu CALB 1 (5'-AACTTGCTTT GGCGGTGGGC-3') dan ITS 3. Kesemua jujukan set primer ini diperolehi daripada Bougnoux dan rakan-rakan (1999). Komponen PCR pertama adalah 5 μL penimbal 1X, 0.2 μL *Taq* Polimerase 0.04 U/ μL , 3 μL MgCl_2 3 mM, 0.3 μL DNTP 0.12 mM, 0.25 μL primer *forward* 1 μM , 0.25 μL primer *reverse* 1 μM , 34 μL air suling steril dan 7 μL DNA. PCR kedua menggunakan komponen yang sama dengan PCR pertama (kecuali jenis primer dan templat DNA) tetapi hanya separuh daripada jumlah isipadu PCR pertama. Kawalan negatif disediakan dengan semua komponen PCR kecuali DNA digantikan dengan air suling steril. Manakala, kawalan positif adalah DNA *Candida albicans* (Jabatan Sains Bioperubatan, UKM KL).

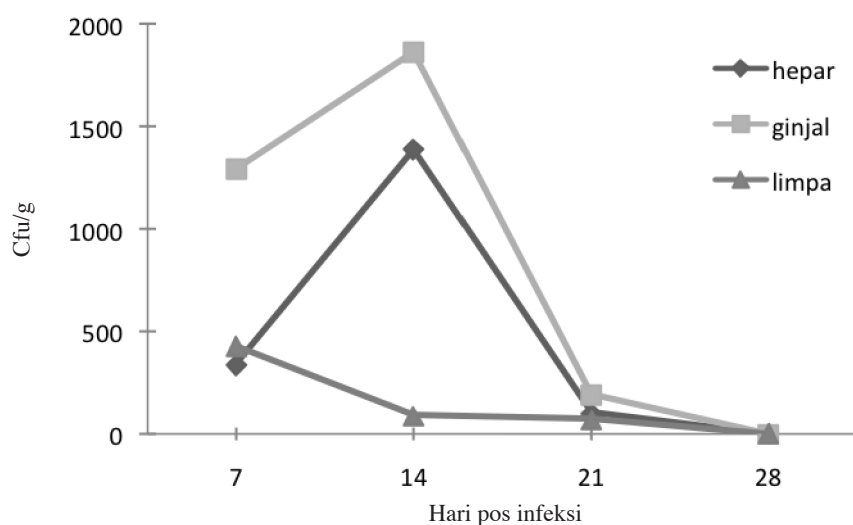
Sebanyak 35 kitaran PCR dijalankan oleh mesin *Mastercycler Gradient PCR* (Eppendorf, Jerman). Setiap kitaran terdiri daripada langkah denaturasi bebenang ganda dua (95°C; 1 minit), perlekatan oleh primer (54.4°C; 1 minit) dan pemanjangan (72°C; 1 minit 30 saat). Pada kitar terakhir, pemanasan pada suhu 72°C selama 5 minit dilakukan. Seterusnya, PCR kedua (30 kitaran) dijalankan dengan mengambil 1.0 μL hasil daripada PCR pertama sebagai sampel DNA. Seperti PCR pertama, PCR kedua terdiri daripada tiga langkah utama, iaitu langkah denaturasi bebenang ganda dua (95°C; 1 minit), perlekatan oleh primer pada suhu 63°C (1 minit) dan pemanjangan (72°C; 1 minit 30 saat). Pada kitar terakhir, pemanasan pada suhu 72°C selama 5 minit dilakukan. Suhu pelekatan primer dan kepekatan MgCl_2 dalam reaksi PCR telah dioptimasikan terlebih dahulu untuk mendapat hasil terbaik dengan DNA *Candida albicans*.

Setelah selesai semua kitaran PCR, 10 μL produk PCR (bersama-sama *loading dye*) dijalankan elektroforesis gel agaros dan kemudian hasilnya dilihat di bawah *gel documentation system* (Vilber Lourmat, Perancis).

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGKULTURAN ORGAN TIKUS YANG DIINFEKSI DENGAN *CANDIDA ALBICANS*

Hasil pengkulturan organ untuk tikus yang diinfeksi dengan spesies *Candida albicans* adalah ditunjukkan pada Rajah 1. Secara keseluruhannya infeksi *Candida albicans* adalah meningkat pada minggu kedua kecuali untuk organ limpa dan infeksi adalah tinggi pada minggu pertama dan seterusnya menurun pada minggu yang seterusnya.



RAJAH 1. Penentuan infeksi sistemik *Candida albicans* dalam tikus: bilangan koloni fungus per berat organ yang disampel (cfu/g) pada hari yang berlainan

HASIL PCR DENGAN PRIMER UMUM BAGI KULAT KE ATAS SAMPEL DARAH DAN SERUM

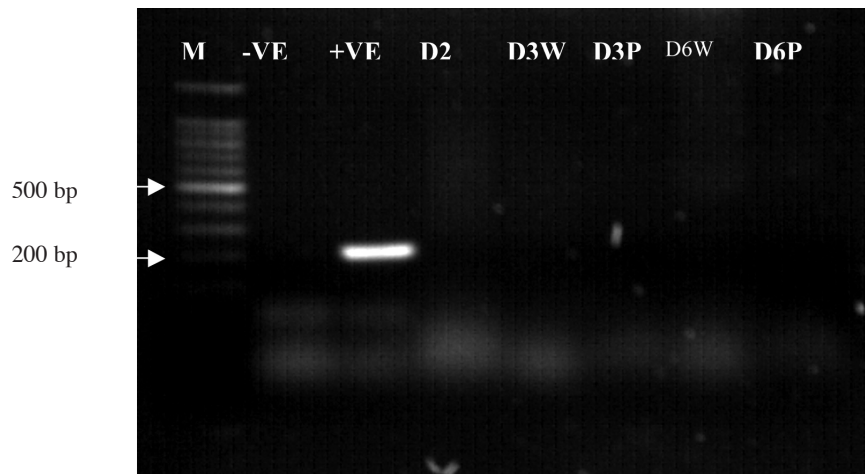
Reaksi PCR untuk primer ITS 1 dan ITS 3 menunjukkan tiada sebarang hasil yang positif dari semua sampel darah dan serum tersebut. Kawalan negatif juga menunjukkan hasil negatif. Hanya kawalan positif sahaja berjaya diamplifikasikan dan mendapat fragmen DNA yang bersaiz 216 bp (Rajah 2 dan Rajah 3).

Sekiranya sampel DNA yang hendak dikesan adalah kurang, maka hasil amplifikasi DNA mungkin tidak dapat dikesan dengan menjalankan 30-35 kitaran PCR, seperti yang diperhatikan dalam kajian ini. Ferrer et al. (2001) telah menunjukkan PCR seminested mampu meningkatkan sensitiviti kaedah PCR sebanyak 10 kali berbanding hasil PCR kitar pertama dan hasil amplifikasi tidak dapat dikesan selepas PCR pertama menjadi positif selepas PCR

seminested. Oleh itu dalam kajian ini, PCR seminested telah dijalankan sebanyak 30 kitaran untuk meningkatkan sensitiviti dan spesifisiti hasil yang dikesan.

HASIL 'SEMINESTED' PCR UNTUK SPESIES *CANDIDA ALBICANS* SAMPEL DARAH DAN SERUM

Hasil produk daripada tindak balas PCR dengan menggunakan primer umum kulat telah dijadikan sebagai sampel dalam tindak balas 'seminested' PCR ini. Amplifikasi DNA dengan menggunakan kaedah ini telah berjaya menghasilkan produk yang bersaiz 146bp. Produk seminested PCR dapat dikesan pada hari ke-2, 3, 6, 7, 11, 14, 21, dan 25 bagi sampel darah. Manakala untuk sampel serum pula hanya menunjukkan hasil yang positif pada hari ke-6, 11, dan 25. Bagi kawalan positif pula terdapat dua jalur terbentuk pada gel elektroforesis iaitu pada saiz



* M, Penanda DNA; -VE, Kawalan negatif; +VE, Kawalan positif; D2, Sampel darah pada hari ke-2; D3W, Sampel darah pada hari ke-3; D3P, Sampel serum pada hari ke-3; D6W, Sampel darah pada hari ke-6; D6P, Sampel serum pada hari ke-6

RAJAH 2. Produk PCR sampel darah dan serum tikus yang diinfeksi spesies *Candida albicans* (primer universal ITS 1 dan ITS 3) dari hari ke-2 hingga hari ke-6 pos-infeksi



* M, Penanda DNA; +VE, Kawalan positif; D7W, Sampel darah pada hari ke-7; D7P, Sampel serum pada hari ke-7; D11W, Sampel darah pada hari ke-11; D11P, Sampel serum pada hari ke-11; D14W, Sampel darah pada hari ke-14; D14P, Sampel serum pada hari ke-14

RAJAH 3. Produk PCR sampel darah dan serum tikus yang diinfeksi spesies *Candida albicans* (primer universal ITS 1 dan ITS 3) dari hari ke-7 hingga hari ke-14 pos-infeksi

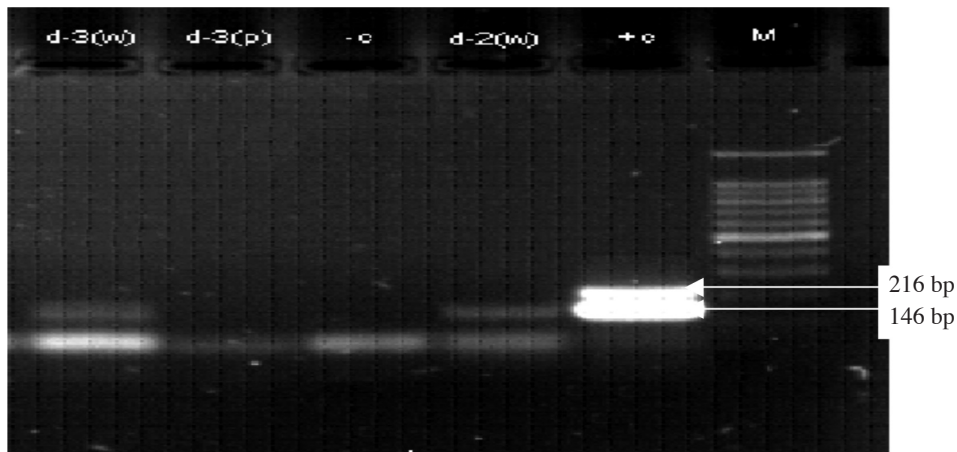
216 bp dan 146 bp. Kawalan negatif tidak menunjukkan sebarang penghasilan jalur pada gel elektroforesis (Rajah 4 dan Rajah 5). Jadual 1 menunjukkan ringkasan hasil seminested PCR bagi sampel darah dan serum tikus yang diinfeksi *Candida albicans* mengikut hari.

Dalam Rajah 4 dan 5, jalur yang diperhatikan paling bawah sekali (saiz <100 bp) merupakan lebih primer, nukleotid dan kompleks primer yang biasanya lebih jelas kelihatan apabila amplifikasi tidak berlaku atau berlaku pada tahap yang rendah. Hasil PCR bagi sampel hari ke 28 menunjukkan kehadiran nukleotid dan primer yang banyak dalam sampel, tetapi jalur bersaiz 146 bp (hasil positif) tidak diperhatikan. Kehadiran DNA yang banyak tersebut disebabkan oleh pembentukan primer-dimer, kompleks primer dan mungkin amplifikasi tidak spesifik (*mis-priming*) yang boleh berlaku dalam tindak balas PCR

biasa. Keadaan ini boleh diatasi sekiranya PCR *hot-start* dijalankan menggunakan bahan reagen yang menghalang pembentukan artefak DNA semasa tidakbalas PCR (Chou et al. 1992).

Walaupun terdapat kajian yang mendapati serum lebih sesuai dijadikan sampel untuk PCR (Bougnoux et al. 1999), namun kajian lain menunjukkan darah merupakan sampel yang lebih baik dan memberi hasil yang lebih sensitif oleh kerana DNA fungus bebas dan yang terkandung dalam sel fungus dapat dikesan dalam darah, manakala hanya DNA fungus bebas yang dikesan dalam serum (Loeffler et al. 2000; Pryce et al. 2003). Hasil kajian kami menyokong kajian tersebut di mana bilangan sampel darah yang positif melebihi bilangan sampel serum yang positif (Jadual 1).

'Seminested' PCR berupaya mengesan infeksi kandidiasis sistemik sepanjang tempoh infeksi kecuali pada



* M, Penanda DNA; + C, Kawalan positif; d-2(w), Sampel darah pada hari ke-2; - C, Kawalan negatif; d-3(p), Sampel serum darah pada hari ke-3; d-3(w), Sampel darah pada hari ke-3

RAJAH 4. Produk PCR 'seminested' sampel darah dan serum tikus yang diinfeksi spesies *Candida albicans* (primer CA dan ITS 3) dari hari ke-2 hingga hari ke-3 pos-infeksi



* m, Penanda DNA; + VE, Kawalan positif; d14w, Sampel darah pada hari ke-14; d14p, Sampel serum pada hari ke-14; d18w, Sampel darah pada hari ke-18; d18p, Sampel serum pada hari ke-18; d21w, Sampel darah pada hari ke-21; d21p, Sampel serum pada hari ke-21; d25w, Sampel darah pada hari ke-25; d25p, Sampel serum pada hari ke-25; d28w, Sampel darah pada hari ke-28; d28p, Sampel serum pada hari ke-28

RAJAH 5. Produk PCR 'seminested' sampel darah dan serum tikus yang diinfeksi spesies *Candida albicans* (primer CA dan ITS 3) dari hari ke-14 hingga hari ke-28 pos-infeksi

JADUAL 1. Hasil seminested PCR bagi sampel darah dan serum tikus terinfeksi *Candida albicans*

Hari infeksi (Hari ke-)	Hasil PCR	
	Darah	Serum
2	+	-
3	+	-
6	+	+
7	+	-
11	+	+
14	+	-
18	-	-
21	+	-
25	+	+
28	-	-

* +, ada produk PCR; -, tiada produk PCR

hari ke-18 dan 28. Pada hari ke-28 infeksi, kultur organ turut menunjukkan bahawa tiada infeksi ke atas sebarang organ tikus kajian menandakan haiwan telah sembuh daripada infeksi. Dalam kajian ini sampel darah haiwan diperolehi daripada sinus orbital haiwan dan teknik ini kadangkala sukar dilakukan dan jumlah darah yang sedikit diperolehi. Juga kadar infeksi kandidiasis dalam setiap haiwan kajian adalah berbeza. Faktor-faktor intrinsik ini mungkin menyumbang kepada hasil negatif PCR pada hari ke-18. Ralat kajian seperti ini boleh dielakkan sekiranya bilangan haiwan yang lebih banyak digunakan. Pengujian sampel yang berturutan dapat meningkatkan kadar pengesanan infeksi fungus sistemik. Ini adalah kerana kehadiran fungus dalam darah ataupun serum adalah tidak tetap dan dipengaruhi oleh pelbagai faktor. Hasil negatif palsu dapat dielakkan dan sensitiviti ujian ditingkatkan jika lebih daripada satu sampel darah diuji (Einsele et al. 1997).

KESIMPULAN

Daripada kajian ini, didapati 'seminested' PCR dapat mengesan infeksi kandidiasis sistemik dan mempunyai nilai prognostik yang berguna bagi pesakit yang terinfeksi oleh *Candida albicans*. Darah lebih baik digunakan sebagai sampel DNA berbanding serum untuk mengesan infeksi kandidiasis sistemik.

PENGHARGAAN

Sekalung penghargaan kepada Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, Universiti Kebangsaan Malaysia di atas geran penyelidikan. Selain itu, ucapan terima kasih kepada Unit Haiwan UKM atas bantuan pengendalian haiwan dan juruteknologi makmal perubatan di Jabatan Sains Bioperubatan atas bantuan teknikal.

RUJUKAN

Bougnoix, M.E., Dupont, L., Mateo, J., Saulnier, P., Faivre, V., Payen, D. & Nicholas-Choinne, M.H. 1999. serum is

more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 925-930.

- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J. & Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20: 1717-1723.
- Conant, Norman, F., Smith, D.T., Baker, R.D., Callaway, J.L. 1971. *Manual of clinical mycology*. Edisi ketiga. W.B. Saunders company.
- Dupont, B. 1990. Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised patients. 55-84. In *Fungal infection in the compromised patient*, edited by D.W. Warnode & M.D. Richardson. Edisi kedua. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Loeffler, J., Rothenhofer, I., Muller C.A., Bowden, R.A., van Burik, J., Engelhard, S., Kanz, L. & Shumacher U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1353-1360.
- Emmons, C.W., Binford, C.H. & Utz, J.P. 1971. *Medical Mycology*. Ed. ke 2. Lea & Frebiger.
- Ferrer, C., Colom, F., Frases, S., Mulet, E., Abad, J.L. & Alio, J.L. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2873-2879.
- Holmes, A.R., Cannon, R.D., Shepherd, M.G. & Jenkinson, H.F. 1994. Detection of *Candida albicans* & other yeast in blood by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 223-228
- Liu, D., Coloe, S., Jones, Lloyd., Braird, R. & Pedersen, J. 1996. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters* 145: 23-26.
- Loeffler, J., Hebart, H., Brauche, U., Shumacher, U. & Einsele, H. 2000. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3830-3833.
- Morace, G., Pagano, L., Sangiuretti, M., posteraro, B., Mele, L., Equitoni, F., D'Amore, G., Leona, G. & Falda, G. 1999 : PCR restriction enzyme analysis to detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1871-1877.
- Mousavi, S.A., Khalesi, E., Shahidi Bonjar, G.H., Aghighi, S., Sharifi, F. & Aram, F. 2007. Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology* 6(4): 583-587.
- Niesters, H.G., guessens, W.H., Meis, J.F. & Quint. W.G. 1993. Rapid PCR- based identification assays for species *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 3: 904-910.
- Pryce, T.M., Kay, I.D., Palladino, S. & Heath, C.H. 2003. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 487-496.
- Wahyuningsih, R., Freisleber, H.J., Sonntag, H.G. & Schnitzler, P. 2000. Simple and rapid identification of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3016-3021.
- Walsh, T.J., Francesconi, A, Kasai, M. & Chanock, S.J. 1995. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important oppornistic fungi. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3216-3220.

Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: jacinta@medic.ukm.
my

Diserahkan: 28 April 2009

Diterima: 4 Ogos 2009