

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Türlerinin Tanımlanmasında Kromojenik Besiyerinin Değerlendirilmesi

The Evaluation of Chromogenic Medium in Identification of Candida Species Isolated from Various Clinical Samples

Ayşegül Çopur Çiçek¹, A. Nedret Koç², Ayşe Ertürk³, Gonca Demir², İlkey Bahçeci¹

1 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize

2 Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

3 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize

Özet

Amaç: Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel mikolojik yöntemler ile Kromojenik besiyeri (Oxoid Brilliance™ Candida agar, İngiltere) (KB) kullanılarak yapılan tanımlamaların karşılaştırılması amaçlandı.

Yöntem: Otuz üç idrar, 34 transtrakeal aspirat (TTA), 7 bronkoalveolar lavaj (BAL) örneği, 13 balgam, 12 kan, 9 yara, üç kateter ve iki vajinal akıntı olmak üzere toplam 113 klinik örnek çalışmaya alındı. İzole edilen suşların konvansiyonel mikolojik yöntemlerle; mikroskopik ve makroskopik morfoloji, germ tüp testi, üre hidrolizi, karbonhidrat kullanımı (API 20 C AUX, Biomerieux, Fransa), üreme ısısı ve sikloheksimid hasasiyetine göre tür tanımlaması yapıldı. Suşlar kromojenik besiyerine (Oxoid Brilliance™ Candida agar, İngiltere) ekilerek renk değişimleri değerlendirildi ve her iki yöntem karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışılan klinik örneklerde her iki yöntemle toplam 113 örneğin 103'ünde (% 91.2) aynı tür tanımlaması yapılırken, 10 (%8.8) tanesinde farklı tür tanımlanmıştır. Kromojenik besiyeri *C. albicans* suşlarını %94.1, *C. parapsilosis* %88.9, *C. glabrata* %81.3 oranında doğru tanımlarken birer suş olan *C. krusei* ve *C. tropicalis* doğru, *C. lusitania* yanlış tanımlanmıştır. Stok kültürlerimizin 6 tanesinden birinin bakteri ile 5'inin iki çeşit Candida türü ile karışık kültür olduğu kromojenik besiyeri ile anlaşılmıştır.

Sonuç: İnfeksiyon etkeni olarak sık karşılaşılan Candida suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında ve karışık kültürlerin ayırt edilmesinde kromojenik besiyerinin duyarlılığının yüksek olmasına rağmen nadir karşılaşılan maya türleri için daha fazla çalışmalara gereksinim vardır.

Abstract

Objective: To compare of conventional mycologic methods used to determine yeast or candida spp extracted from some clinical samples with the definitions identified using the chromogenic medium (CM, Oxoid Brilliance™ Candida agar, United Kingdom) was aimed in this study.

Method: Total of 113 clinical samples (33 of urine, 34 of transtracheal aspirate (TAT), 7 of bronchoalveolar lavage (BAL), 13 of sputum, 12 of blood, 9 of wound, 3 of catheter, 2 of vaginal smear) were included. Species identification was carried out using conventional mycologic methods; microscopic and macroscopic morphology, germ tube test, urea hydrolysis, carbohydrate use (API 20C AUX, Biomerieux, France), growth temperature and cycloheximide sensitivity. The strains were inoculated in the chromogenic medium (Oxoid Brilliance™ Candida agar, UK) and colour changes were evaluated, and two methods were compared.

Results: With both method, 91.2% of (n=103) total 113 samples was identified as similar while 8.8% of them (n=10) was defined differently. 94.1% of *Candida albicans* spp, 88.9% of *C. parapsilosis* and 81.3% of *C. glabrata* was truly identified. *C. krusei* and *C. tropicalis* were correctly identified whereas *C. lusitania* was wrongly identified. It was understood that one of total 6 of our stock cultures was found as mixed culture with bacteria, and the rest of them was found as mixed with two types of *Candida* species, with using chromogenic medium.

Conclusion: There is a need to further studies for rare yeast species although the sensitivity of chromogenic medium is high for using the determination of common candida species as infectious agents.

AnahtarKelimeler: Candida, tür tanımlaması, kromojenik besiyeri

Keywords: Candida, species identification, chromogenic medium

Giriş

Uzun yıllar sadece hematolojik malignitesi olan ya da transplant yapılmış, immunsupresse hastalarda gelişen infeksiyonların etkeni olarak bilinen mantarlar günümüzde birçok kliniklerde gittikçe artan sıklıkta infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (1-3). Büyük cerrahi girişimlerin ve geniş spektrumlu ve birden fazla

antibiyotik kullanımının artması, hiperalimentasyon, yoğun bakım ünitelerinde genel durumu bozuk hastaların daha fazla izlenmesi ve yapay protezlerin kullanımının yaygınlaşması ciddi fungal enfeksiyonların insidansında artıştıran sorumludur (1-4). Candida türleri normalde insan deri ve mukoza florasında bulunan mik-

roorganizmalardır. Normal bireylerin %30-50'sinin ağız ve gastrointestinal sisteminde bulunurlar ve bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan ciddi infeksiyonların gelişiminde rol oynarlar (3,4). Mantar infeksiyonlarında görülen artışla birlikte, bu infeksiyonlara neden olan türlerin çeşitliliğinde de değişiklikler görülmeye başlanmıştır. Endojen kaynaklı olması nedeniyle hala nozokomiyal fungal enfeksiyonlarda ilk sırayı *C. albicans* almakla birlikte antifungal tedaviye daha zor yanıt verdiği bilinen *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* gibi *albicans* dışı türlerle karşılaşma oranı da giderek artmaktadır. Bu nedenle türlerin identifikasyonu ve direnç profillerinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır (4). *Candida* türlerinin tanımlanmasında mikroskopik morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve substrat asimilasyonunun değerlendirilmesine dayanan bazı yöntemler kullanılır. Bu yöntemler oldukça zaman gerektiren ve rutin laboratuvarında iş yükünü arttıran yöntemlerdir. Bu nedenle 4-72 saat içinde sonuç veren, uygulaması daha kolay olan çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir (5,6). Ayrıca hızlı maya identifikasyonu sağlamak amacıyla birçok kromojenik besiyeri geliştirilmiştir. Türe özgü kromojenik substratlar içeren bu besiyerlerinde, mayaların ürettikleri enzimlerle bu substratlar reaksiyona girerek çeşitli renklerde kolonilerin oluşumunu sağlamaktadır. Koloni rengine göre hızlı tanı sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri arasında; Albicans ID (bioMerieux), Candichrom albicans (International Mycoplasma), Candiselect (Sanofi Diagnostic, Pasteur), CHROMagar Candida (BBL) sayılabilir (2,3,7). Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında standart yöntem olarak konvansiyonel mikolojik yöntemler ile kromojenik besiyeri (Oxoid Brilliance™ *Candida* agar, İngiltere) karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal v eMetod

Rize Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kliniklerinden Kasım 2011-Temmuz 2012 arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden (33 idrar, 34 transtrakeal aspirat (TTA), 7 bronkoalvaolar lavaj (BAL) örneği, 13 balgam, 12 kan, 9 yara, 3 kateter ve 2 vajinal akıntı)

izole edilen toplam 113 maya suşu çalışmaya alındı. Suşlar % 20 gliserol içeren buyyonla -20°C de stoklandı. Suşların tanımlanması Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki Mikoloji Laboratuvarında yapıldı. Suşlar Sabouraud dekstroz agar (SDA)(Oxoid, İngiltere)'a pasajlandı. İzolatların tanımlanmasında, germ tüp testi, makroskopik ve mikroskopik morfolojik görünümleri (mısır unu-Tween 80 agar besiyerinde), üre hidrolizi, karbonhidrat kullanımı (API 20 C AUX (bioMerieux, Fransa), üreme ısısı ve sikloheksimid hassasiyetine göre tür tanımlaması yapıldı. Kromojenik besiyeri; Brilliance™ *Candida* Agar Base (OXOID, İngiltere) ve supplement olarak Brilliance™ *Candida* selective supplement (OXOID, İngiltere) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Kromojenik besiyerinde üreyen maya kolonileri en geç 7 gün içinde 25°C ısıda ve ışıktan korunarak muhafaza edilirken, renk, genişlik, koloni çevresindeki renk difüzyonu gibi özellikleri izlenerek kaydedildi. Kromojenik besiyerinde yeşil renkli, düzgün koloniler; *C.albicans*, koyu mavi koloniler; *C.tropicalis*, kuru, pürtüklü, kahverengipembe koloniler; *C.krusei*, bej-sarı renkli koloniler *C.glabrata*, kahverengi koloniler *C.parapsilosis* olarak identifiye edildi. (7-9). Çalışmada uygulanan testlerin kontrolünde *C albicans* ATCC 90028 kalite kontrol suşu kullanıldı.

Bulgular

Konvansiyonel yöntemlerle 113 *Candida* suşunun 85'i (%70.8) *C. albicans* olarak en sık izole edilen tür iken bunu sırayla *C. glabrata* 16 (%14.2), *C. parapsilosis* 9 (%8) suş ve birer suş *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. lusitania* izlemiştir.

Her iki yöntemle toplam 113 suşun 103'ünde (%91.2) aynı tür tanımlaması yapılırken 10 (%8.8) tanesinde farklı türler tanımlanmıştır. *Candida* suşunun tür tanısında kromojenik besiyerinin duyarlılığı Tablo 1'de görülmektedir.

Stok kültürlerimizin 6 tanesinden birinin bakteri ile 5'inin iki çeşit *Candida* türü ile karışık kültür olduğu kromojenik besiyeri ile anlaşılmıştır. Karışık kültürler tekrar konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış ve hepsi KB'deki üremelerle uyumlu bulunmuştur.



Tablo 1. Candida suşlarının tür tanısında kromojenik besiyerinin duyarlılığı

İzolatlar	n	%
<i>C. albicans</i> (n:85)	80	94. 1
<i>C. glabrata</i> (n:16)	13	81. 3
<i>C.parapsilosis</i> (n:9)	8	88. 9
<i>C. krusei</i> (n:1)	1	100
<i>C. tropicalis</i> (n:1)	1	100
<i>C. lusitania</i> (n:1)	-	0
Toplam (n:113)	103	91. 2

Konvansiyonel mikolojik yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanmış 5 suşun üçü KB ile *C. parapsilosis*, ikisi *C. glabrata* olarak tanımlanırken, *C. glabrata* olarak tanımlanmış 2 suştan biri *C. parapsilosis* biri de *C. albicans* olarak belirlenmiştir. Yine konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış olan bir *C. parapsilosis* suşu KB ile *C. glabrata*, bir *C. lusitania* suşu *C. parapsilosis* olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo2. Kromojenik besiyerinde farklı tür olarak tanımlanan izolatlar

Konvansiyonel yöntemler	n	Kromojenik besiyeri
<i>C. albicans</i>	3	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C.albicans</i>	2	<i>C. glabrata</i>
<i>C.glabrata</i>	2	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. glabrata</i>	1	<i>C. albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	1	<i>C. glabrata</i>
<i>C. lusitania</i>	1	<i>C. parapsilosis</i>

Ayrıca KB 6 örnekte karışık kültürleri hem diğer maya türlerinden hem de bakteri kültürlerinden ayırmada fayda sağlamıştır. Bunlar tekrar konvansiyonel yöntemlerle belirlenmiş ve hepsi KB'deki üremelerle uyumlu bulunmuştur.

Tartışma

İnsanlarda enfeksiyona sebep olan pek çok mantar antifungal ajanların pek çoğuna karşı başlangıçta doğal dirençli olabileceği gibi kullanım sonrasında da direnç geliştirebilmektedir. Bu sistemik enfeksiyonların uygun tedavisi çoğunlukla etiyolojik ajanın hızlı ve doğru tanımlanmasına bağlıdır. Bu çalışmada 113 maya suşunun %70.8'i *C. albicans*, %11.5'i *C. glabrata*, %7.1'i *C. parapsilosis*,%0.9'u *C. krusei* ve yine %0.9' u *C. tropicalis* olarak konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı.

Candida türlerinin üretilmesinde, bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremelerini baskılayan besiyerlerinin seçilmesi kolaylık sağlar. Bu amaçla CHROM agar ve Pagano-Levine gibi kromojenik besiyerleri de primer izolasyon amacıyla kullanılabilir. Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda Candida türlerinin tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (2-4). Yapılan birçok çalışmada CHROMagar Candida ile mısır unu-Tween 80 agarda morfolojik incelemenin bir arada kullanılması ile alınan sonuçların API maya tanımlama kiti sonuçları ile uyumlu olduğunu, bu şekilde laboratuvarlarında maya izolatlarının %95'inden fazlasını tanımlayabildiklerini bildirmişlerdir. Çalışmacılar, iki yöntemin sonuç verme süresinin benzer olduğunu ve kültür yönteminin daha ucuza mal olduğunu belirtmişler, bunun yanında API 20C AUX'un tanımlayamadığı bazı mayaların morfolojik özellikleri ve CHROMagar Candida besiyerinde koloni özellikleri ile tanımlanabileceğini bildirmişlerdir (7,11,12). Yapılan çalışmalara göre kromojenik besiyerlerinin *C. albicans* suşlarında 48 saatte üretme ve tanımlamadaki duyarlılığı ve özgüllüğü %88-100 arasında değişmektedir (12,13).

Çalışmamızda stok kültürler direkt SDA'ya ekim yapmış sonra KB ile tüm izolatlar 48 saatte üretilmiş ve tanımlanmıştır. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*'nın 48 saatten sonraki koloni renklerinde sadece renk koyulaşması gözlenmiştir. *C. parapsilosis* kolonileri 24 saatlik inkübasyondan sonra daha açık pembemsi-kahverengi renkte iken, 48 saatten sonra koyu kahve renge dönüşmüştür. Bu durum yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (7). Kültürde üreyen mayaların API 20C AUX ile tanımlanması için 24 saat maya üremesi, ortalama 48 saat de tanımlama için olmak üzere ortalama 72 saate ihtiyaç vardır. Örnekten kromojenik besiyerine direkt ekim ile mayaların tanımlanmasında zaman kazanmak mümkündür (8,12). Bu çalışmada konvansiyonel yöntem ve KB ile elde edilen tanımlama sonuçları arasında %91.2'e varan oranlarda uyumluluk saptanmıştır. Yüz on üç örneğin 10'unda KB ile iki farklı tür maya tanımlanmıştır. Konvansiyonel mikolojik yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanmış 5 suşun 3'ü KB ile *C. parapsilosis*, 2'si *C. glabrata* olarak tanımla-



nirken, *C. glabrata* olarak tanımlanmış iki suştan biri *C. parapsilosis* biri de *C. albicans* olarak belirlenmiştir. Yine konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış olan bir *C. parapsilosis* suşu KB ile *C. glabrata*, bir *C. lusitania* suşu *C. parapsilosis* olarak saptanmıştır. Her iki yöntemle farklı tanımlanan 10 suşun 6'sının *C. parapsilosis* olması dikkat çekicidir.

Polimikrobiyal üremelerde KB besiyerinden tanımlamada zaman ve maliyet açısından avantaj oluşturmakta ve daha iyi tanımlama sağlamaktadır (14-18). Bizim çalışmamızda da KB 6 suşta karışık kültürleri hem diğer maya türlerinden hem de bakteri kültürlerinden ayırmada fayda sağlamıştır. Bu tanımlama ile KB'e yapılacak olan örnekten direk ekimler türleri ayırmada daha etkin olabilir. Ayrıca yoğun bakım, yanık, onkoloji gibi immün sistemi zayıflamış hastaların uzun süreli tedavi gördüğü ünitelerde özellikle ender rastlanan *Candida* türleriyle oluşan epidemilere rastlanmaktadır (19-20). İspanya'da yapılan bir çalışmada geleneksel yöntemlerle tanısı konamamış kateter ucu ve kan kültür örneklerinde üreyen *Candida* CHROMagar *Candida* besiyerinde beyaz koloniler olarak gözlenmiş ve moleküler yöntemlerle *C. nivariensis* olarak tiplendirilmiştir (18). Yine aynı şekilde ülkemizde CHROMagar *Candida* besiyeri kullanılarak tanı konmuş nadir görülen *Pichiaohmeri* ve *Dipodascus capitatus* salgınları bildirilmiştir (21,22). Agarwal ve ark. yine bu besiyerlerinde *C. pelliculosa*, *C. utilis*, *C. rugosa*, *C. glabrata* ve *C. hemulonii* gibi farklı türde mayaların üretilebildiğini bildirmişlerdir (23).

CHROMagar *Candida* besiyerinin kullanımı ender rastlanan bu türlerin varlığının hızla farkına varılmasını da sağlayacaktır. Sonuç olarak, KB'nin sık karşılaşılan *Candida* türlerinin ayırımında duyarlılığı yüksek, kullanımının kolay olması, çabuk sonuç vermesinden dolayı rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ancak nadir rastlanan maya türlerinin ayırımında kullanılması için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole İn Vitro Duyarlılıkları. Selçuk Tıp Derg 2012; 28: 149-51.
2. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses 2009; 52: 197-205.
3. İnci M, Atalay MA, Koç AN, Özer B, Kılınç Ç, Durmaz S. *Candida albicans* dışı mayaların tanımlanmasında VITEK 2 YST kart ile API 20C AUX sisteminin karşılaştırılması. Dicle Tıp Derg 2012; 39: 80-82.
4. Ener B. İn vitro antifungal duyarlılık testleri: standardizasyon ve klinik önemi. Mikrobiyol Bul 1996; 30: 419-25.
5. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P: Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypic methods. Med Mycol 2001; 39: 9-33.
6. Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında "API 32C" Ve "RapidYeast Plus" Sistemlerinin Karşılaştırılması. ANKEM Derg 2006; 20: 214-6.
7. Otağ F, Aslan G, Şen S, Emekdaş G. Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar *Candida* besiyerinin kullanımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36: 200-4.
8. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. From blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*: J Clin Microbiol 2003; 41: 2629-32.
9. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. Annals Clin Microbiol Antimicrobial 2003; 2: 8.
10. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blue print for the future of antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 435-47.
11. Koehler AP, Chu KC, Houang ET, Cheng AF: Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. J Clin Microbiol 1999, 37: 422-6.
12. Gültekin B, Yazıcı V, Aydın N. Vajinal örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının dağılımı ve chrom agar *Candida* besiyerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 319-24.
13. Odds FC. Presidential address. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. J Medical and Veterinary Mycology 1994; 32: 1-8.
14. Pulimood S, Ganesan L, Alangaden G, Chandrasekar P. Polymicrobial candidemia. Diag Microbiol Infect Dis 2002; 44: 353-7.
15. Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. J Clin Pathol 2004; 57: 196-8.



16. Willinger B, Manafi M. *Mycoses*. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida species. 1999; 42: 61-5.
17. Mahmoudi Rad M, Zafarghandi S, Abbasabadi B, Tavallae M. The epidemiology of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 155: 199-203.
18. Castro LA, Alvarez MI, Martínez E. Pseudo-membranous Candidiasis in HIV/AIDS Patients in Cali, Colombia *Mycopathologia*. 2013; 175: 91-8.
19. López-Soria LM, Bereciartua E, Santamaría M, Soria LM, Hernández-Almaraz JL, Mularoni A, Nieto J, Montejo M. First case report of catheter-related fungemia by Candida nivariensis in the Iberian Peninsula. *Rev Iberoam Micol*. 2013; 30: 69-71
20. Eddouzi J, Hofstetter V, Groenewald M, Manai M, Sanglard D. *J ClinMicrobiol*. Characterization of a new clinical yeast species, Candida tunisiensis sp. nov., isolated from a strain collection of Tunisian hospitals. 2013; 51: 31-9.
21. Otag F, Kuyucu N, Erturan Z, Sen S, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of Pichiaohmeri infection in the paediatric intensive care unit: case reports and review of the literature. *Mycoses* 2005; 48: 265-9.
22. Ersoz G, Otag F, Erturan Z, Aslan G, Kaya A, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of Dipodascus capitatus infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 248-52.
23. Agarwal S, Manchanda V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance *Indian J Med Microbiol* 2011 ; 29: 172-7

