

VULVOVAJİNAL CANDIDIASIS OLGULARINDAN İZOLE EDİLEN CANDİDALARIN TÜRLERE GÖRE DAĞILIMI

CLASSIFICATION OF THE YEASTS ISOLATED FROM VULVOVAGINAL CANDIDIASIS CASES

Nurten ALTANLAR

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tandoğan
ANKARA, 06100.

ÖZET

Vajinal akıntı kaşıntı yakınmalarıyla Ankara'da çeşitli sağlık ocağına başvuran değişik yaş gruplarından 354 hastanın vajinal sürüntü örnekleri fungal enfeksiyon varlığı bakımından incelenmeye alınmıştır. Vajinal numuneler Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ve kanlı ağara inoküle edilmiş ayrıca boyasız ve Gram ile boyanarak taze preparat incelenmiştir. Direkt preparat ve vajinal kültürler sonucunda numunelerin 78'inde (%22.30) maya varlığı belirlenmiştir. İzole edilen mayalar klasik tiplendirme yöntemleri ve ticari Fungichrom test kiti ile tiplendirilmiştir. Klasik yöntemler ile ticari kit sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür. İzole edilen Candidaların tiplendirilmesi sonucu aşağıdaki türler saptanmıştır. C.albicans 39 (% 50) , C. glabrata 21 (% 26.92) , C.krusei 9 (%11.53) , C.kefyr 7 (%8.97) , C. tropicalis 1 (%1.28) , C. parapsilosis 1 (% 1.28) . Sonuç olarak vajinal örneklerden izole edilen mayalar arasında ilk sırayı C albicans almıştır. Yine bu çalışma Fungichrom ticari test kiti ile maya türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanabileceğini ve bu kitin maya türlerinin tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Vajinal akıntı, Candida türleri, vulvovajinal candidiasis.

ABSTRACT

In our study , a total of 354 vaginal swab specimens taken from patients admitted to the health center in Ankara with the complaints of vaginal discharge and pruritis have been investigated. Vaginal specimens were inoculated to SDA and Blood Agar and unstained and Gram stained fresh preparations were also examined. 78 yeast were determined from vaginal specimens. The isolated yeast were identified by conventional methods and commercial Fungichrom test kit . Conventional methods results were in agreement with the fungichrom test kit. The distribution of isolated Candida were as follows: C albicans 39 (50%), C. glabrata 21 (26.92 %), C. krusei 9 (11.53 %), C kefyr 7 (8.97 %), C tropicalis 1 (1.28 %), C. parapsilosis 1 (1.28 %). As a result the predominant species of yeast isolated from vaginal specimens is C. albicans. This study was demonstrated that Candida species can be rapidly and accurately identified by using Fungichrom test kit. We concluded that fungichrom test kit can be used successfully in identification of Candida species.

Key words : Vaginal discharge , vulvovaginal candidiasis , Candida spp

GİRİŞ

Oldukça çok sayıda bulunan maya ve benzeri mantarlar içinde insanlarda en çok hastalık yapanlar *Candida* türleridir. *Candida* türleri insanlarda deri, ağız, barsak ve vajina mukozasında yaygın olarak bulunan sık enfeksiyona neden olan mantarlardır(1).Vajinal *candidiasis* özellikle yurdumuzda önemli bir sağlık problemidir. Vajinitlerin büyük kısmını *Candida* enfeksiyonları oluşturmaktadır. Bu enfeksiyonların % 80' i ve fazlasında *C. albicans* etken olarak bildirilmektedir (2,3,4,5).

C. krusei, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* da enfeksiyondan sorumlu tutulmaktadır (6).

Normal popülasyonun % 20'sinin vajeninde *Candida* kolonizasyonu bulunacağından kültür tek başına anlamlı olmayıp, direkt preparatın incelenmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda vaginal akıntı ve kaşıntı şikayetiyle başvuran kadınlarda vajinal *candidiasis* görülme oranı ve etken olan maya türlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla maya türlerinin ayırımında kullanılan klasik testler uygulanmıştır. Ayrıca ticari bir kit olan ve klasik testlere göre uygulanması daha kolay olan Fungichrom test kiti ile de çalışılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmamız Ankara'da çeşitli sağlık ocaklarına vajinal akıntı ve yanma şikayetiyle başvuran 354 hasta üzerinde yapılmıştır.

Vajinal akıntı örnekleri steril eküvyonla vajinanın üçte ikisinin orta kısmından bir adet kültür sürüntü örneği ve bir adet direkt preparat örneği çevre dokulara değdirilmeden alınmıştır. Transport besiyeri (Stuart) içine alınan kültür sürüntü örneği Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ve kanlı agar besiyerine ekilmiştir. SDA' daki örnekler 37 °C'de 3 gün ve kanlı agardaki örnekler 37 °C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Direkt preparatlar ise 10x40 büyütme ışık mikroskobunda incelenmiştir. Blastospor ve pseudo hif yapısı göstermeyen örnekler kültür sonucuna bakılmaksızın değerlendirme dışı bırakılmıştır. SDA besiyerinde inkübe edilen örnekler 3. gün sonunda değerlendirilmiştir. Kültürlerin değerlendirilmesinde SDA'da opak, krem rengi ve belirgin maya kokusu olan kolonilerden hazırlanan preparatlar incelenmiştir. Metanolla tespit edilen ve Gram yöntemiyle boyanan preparatlar incelenerek blastospor ve pseudohif oluşturan hücrelere maya tanısı konmuştur.

C. albicans'in rutin identifikasyonunda en hızlı test germ tüp oluşumunun incelenmesidir. Yaklaşık 0.5 ml insan serumu içeren tüpe *Candidaların* saf kültürü ekildikten sonra 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hazırlanan lam-lamel arası preparat mikroskopta incelenerek germ tüp oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. Fasulye filizini andıran kısa borular testin pozitif olduğunu göstermektedir (7). Sonuçlar bu görünüme göre değerlendirilmiştir. Kontrol suş olarak testlerde *C. albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır.

Tween 80' li Corn meal (mısır unlu) agara çizgi şeklinde ekilen *Candidaların* klamidospore oluşumu incelenmiştir. Ekim yerine lamel kapatılarak 2 gün sonra kontroller yapılmıştır. Kontrol suşta klamidospore oluşumu belirlenerek diğer *Candida* suşları buna göre değerlendirilmiştir (7).

Ayrıca *Candidaların* glukoz, maltoz, sukroz, laktoz ve galaktozu fermente ve asimile etme özellikleri de incelenerek tür tayini yapılmıştır (7).

Asimilasyon testi için karbohidrat ilave edilmiş Yeast Nitrojen Base kullanılmıştır. *Candida* izolatlarının Yeast Nitrojen Broth içindeki 24-36 saatlik kültürlerinden birer damla karbohidratlı yatık Yeast Nitrojen Base Agar'a damlatılmıştır. 96 saatlik inkübasyon sonucu karbohidrat içermeyen kontrol olarak kullanılan besiyerindeki üremeye bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

Fermentasyon testi için Sabouraud Dextrose Broth' da 35°C'de inkübe edilen kültürler kanlı agar'a pasaj lanmıştır. 35°C de bir gece inkübe edildikten sonra tek düşen koloniler SDA'a pasajlanmıştır. 35°C 'de bir gece inkübasyondan sonra kültürler şekersiz Beef Extract Agar'a alınarak 35°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerin steril tuzlu suda süspansiyonları hazırlanmıştır. İçinde % 0.04 bromtimol mavisi bulunan Beef Extract Broth içeren tüplere bu süspansiyonlardan 0.2 'şer ml ilave edilmiştir. Her tüpe filtrasyonla sterilize edilen % 20' lik stok glukoz, maltoz, sukroz, laktoz ve galaktozdan 0.5'er ml ilave edildikten sonra tüpler steril parafinle kapatılmıştır. Kontrol olarak inoküle edilmemiş şeker içeren tüpler kullanılmıştır. Tüpler 35°C'de 10 gün inkübe edilerek asit ve gaz varlığı yönünden incelenmiştir (7).

Üreaz testi için maya izolatları üre besiyerine inoküle edildikten sonra 30 dakika ile 4 saat arasında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyerindeki rengin sarı renkten kırmızı-pembe'ye dönüşümü pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. (7).

İzole edilen bu suşların tiplendirimi, özelliği ve yöntemi aşağıda tanımlanan Fungichrom I (Cat.no.44325 Int. Mycoplasma Lab. Ekin Med. Ltd.) kiti ile de doğrulanmıştır. Enzimatik aktivitelerle değerlendirme yapılan Fungichrom test kitinde değerlendirmeler test prosedürüne uygun olarak 3 çeşit reaksiyona göre yapılmıştır.

Kromojenik substrat hidrolizi: Mayaların oksidaz ve peptidaz aktiviteleri kromojenik substratları hidrolize eder.

Doğal substratların asimilasyonu: Şekerlerin kullanımı bromkresol morunun eflatundan sarıya veya renginin kaybolmasına dayanır.

Sentetik substratların oksidasyonu: Kafeik asit varlığında fenol oksidaz aktivitesi kahverengi oluşturur. Bu testlerin uygulanmasında maya kolonilerinin taze olmasına dikkat edilmiştir (24-48 saatlik). Koloniler test tablasına inoküle edilmeden makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. İncelenen kolonilerden ucu tıkalı pastör pipetiyle 2-3 tane alınarak tanımlama için içinde besiyeri bulunan şişelere konup iyice karıştırılmıştır.

İnokülümların standardizasyonu: İnokülümün yoğunluğu kontrol tüpteki yoğunluğa göre ayarlanmıştır.

Test tablası işaretlendikten sonra 2 damla (yaklaşık 100 ml) inokülasyon medium'dan damlatılmıştır. Test kapağı kapatılıp 30 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Test tablasındaki kontrol kuyucuğu mordan sarıya veya renksiz hale döndükten sonra okuma işlemi yapılmıştır. Eğer

pozitif kontrol kuyucuğu sarı veya renksiz ise 1 damla 0.1 N NaOH' den 2. kuyucuğa ilave edildikten sonra test aşağıdaki şemaya göre okunmuştur.

Şema-1 Fungichrom test kiti değerlendirme şeması

Kuyucuk	Reaksiyonun okunması	
	(-)	(+)
GAL PRO	Renksiz	sarı
ACT	mor	sarı-renksiz
ONPG	Renksiz	sarı
EPA	Renksiz	açık sarı
SGL-GLY	Renksiz	sade sarı
ÜRE	sarı	füksia kırmızısı
POX	Renksiz	kahverengi
GAL-SAC TRE MAL CEL RAF LAC	mor	sarı renksiz

GAL: N- Asetil- beta- D- galaktozaminidaz için kromojenik substrat içeriyor.

PRO: L-Proline amidaz için kromojenik substrat içeriyor.

ACT EPA: Aktidione, glikoz içeriyor.

ONPG: ORTO- nitrophenyl-B-D-galaktozidaz için kromojenik substrat içeriyor.

EPA: Peptidaz için kromojenik substrat içeriyor.

SGL: Peptidaz için kromojenik substrat içeriyor.

GLY: Gisine - amidase için kromojenik substrat içeriyor.

ÜRE: Üre içeriyor

POX: Penoloksidaz için kromojenik substrat içeriyor.

GAL- SAC: Galaktoz, Sukroz içeriyor

TRE: Trihalose içeriyor.

MAL: Maltoz içeriyor

CEL: Sellabioz içeriyor.

RAF: Raffinoz içeriyor

LAC: Laktoz içeriyor.

Fungichrom I tablasının yorumu kitin içinde verilmiş olan cod sistemiyle yapılmıştır.

BULGULAR

Vajinal akıntı örneği alınan 354 hastanın 78' inde (% 22.03) Gram boyama ve kültür sonucu maya varlığı belirlenmiştir.

78 adet *Candida* izolatının üreme ve biyokimyasal özelliklerine göre ayrımı tablo 1' de gösterilmiştir .

Tablo-1 İzole edilen *Candida* türlerinin üreme ve biyokimyasal özellikleri

Tiplendirile n <i>Candida</i> türleri	37 °C'de üreme	Kla mido spor	ger m tüp	Asimilasyon					Fermentasyon					
				Gl	M	S u	L a	G a	G l	M	S u	L a	G a	Ur e
C.albicans (39)	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+	
C.glabrata (21)	+			+					+					
C.krusei (9)	+			+					+					+
C.kefry (7)	+				+				+					+
C.tropicalis (1)	+			+	+	+		+	+	+	+		+	
C.parapsilos is(1)	+			+	+	+			+				+	

Gl: Glukoz; M: Maltoz; Su: Sukroz; La: Laktoz; Ga: Galaktoz

Tablo 1'de görüldüğü gibi *C. albicans* için spesifik olan germ tüp oluşturma testi 39 türde pozitif olarak belirlenmiştir. Klamidospor testi de 78 izolatın 39' unda pozitif olarak değerlendirilmiş ve

bunların *C. albicans* olduğu saptanmıştır. Karbohidratların asimilasyon ve fermentasyon testleri ile izolatların türlere göre identifikasyonu yapılmış sonuçlar tabloda gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar Fungichrom I kiti ile de doğrulanmıştır. Tiplendirilen *Candida* türleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo-2 Mayaların tiplere göre dağılımı

İzolat	Sayı(n)	Yüzde (%)
C.albicans	39	50.00
C.glabrata	21	26.92
C. krusei	9	11.53
C. kefry	7	8.97
C. tropicalis	1	1.28
C. parapsilosis	1	1.28

Tablo 2'de görüldüğü gibi 78 örneğin 39'unda (% 50) *C.albicans*, 21'inde (% 26.92) *C. glabrata*, 9'unda (% 11.53) *C. krusei*, 7'sinde (% 8.97) *C. kefry* ve birer hastada (% 1.28) *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izole edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Vajinal *candidiasis* tüm dünyada yaygındır. A.B.D.'de vaginal enfeksiyonlarda ilk sırayı bakteriler alırken maya enfeksiyonları ikinci sırayı almaktadır (8). Diğer dış ülkelerde mayaların % 20-25 oranında vajinal enfeksiyona yol açtığı bildirilmiş ve bu enfeksiyonlardan *C albicans* en yaygın etken olarak izole edilmiştir (2, 9, 10). Hurley ve arkadaşları doğurganlık çağı süresince kadınların % 75'inin en az bir kez vajinal *candidiasis* geçirdiklerini bildirmişlerdir (11).

Yapılan bir çalışmada da vajinitlerden izole edilen mayaların % 85-90'nın *C.albicans* suşları olduğu belirlenirken geriye kalanların ise *C. glabrata* ve *C. tropicalis* olmak üzere diğer *Candida* türleri olduğu saptanmıştır (12).

Çalışmamızda % 50 *C. albicans* izole edilmiştir. *C. glabrata* % 26.92, *C.krusei* % 11.53, *C.kefyr* % 8.97, *C.tropicalis* % 1.28, *C.parapsilosis* % 1.28 olmak üzere diğer *Candida* türleri izole edilmiştir. Bu sonuçlara göre *C. albicans* dışındaki türlerinde çok görüldüğü anlaşılmaktadır. Bu da *C. albicans* dışındaki *Candidaların* da patojenite kazandıklarını düşündürmektedir.

1980 yıllarında *C. albicans* dışı vajinal enfeksiyonlar %20' lere ulaşmıştır (9).Tiball ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada *C. albicans* dışı enfeksiyonların önemli oranda arttığını bildirmişlerdir (13).

Türkiye'de Gönlüm ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 302 hastanın % 24.1'inde *Candida* enfeksiyonu tespit etmişler ve % 76.7 oranında *C. albicans* saptamışlardır (14). Aydın ve arkadaşları ise 400 hastanın % 11.7' sinde maya varlığı belirlemişler, % 34 oranında da *C. albicans* saptamışlardır (15).

Araştırmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Vajinal *candidiasis'* de ilk sırayı *C.albicans 'ın* aldığı *C.albicans* dışı enfeksiyonlarda da bir artış olduğu saptanmıştır.

Tıp mikolojisi bakımından önemli *Candida* türleri, diğer türlerden 37 °C de üreme, klamidospore, germ tüp oluşumu, üreaz varlığı, bazı şekerleri fermentleme ve bazı karbon ve azot kaynaklarını asimile etme özellikleri incelenerek ayırt edilebilmektedir. Çalışmamızda izole ettiğimiz maya türlerinin ayırımında önce bu klasik testler uygulanmıştır. Daha sonra sonuçlar klasik testlere göre uygulanması daha kolay ve daha çabuk sonuç verebilen ticari bir kit olan Fungichrom I test kiti ile doğrulanmıştır. Fungichrom I kiti özellikle kromojenik substratların kullanımı yoluyla insanda patolojik olarak karşılaşılan başlıca mayaların tanımlanması amacıyla üretilmiştir. Mayaların ayırımı renklendirilmiş reaksiyonlarla görüntülenen değişik enzimlerin varlığına ve yokluğuna dayanmaktadır. Klasik testte elde ettiğimiz sonuçlarla kiten aldığımız sonuçlar arasında uyum görülmüştür.

Sonuç olarak Fungichrom test kitinin klasik testlere göre daha kolay kullanımı olması, kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle maya türlerinin ayırımında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- 1- **Bilgehan, H.**, "Candidanın tarihçesi , ekolojisi ve dağılımı". Tümbay E. (ed), *Candida ve enfeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Yayınları* No, 6 İzmir, 1-9, (1986)
- 2- **Thin, R., Leighton, M., Dixon, M.**, "How often is genital yeast infection is sexually transmitted " *Br. Med. J.* 1-9, (1977)
- 3- **Tietz ,H.J., Küssner, A., Thanos, M., Andrade, M., Presber, W., Schönian, G.**, " Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa". *Am. Soc. Microbiol.* 33, 2462-2465 ,(1995)
- 4- **Faye-Kette, YH., Kouassi, AA., Sylla- Koko, DF., Kacou, N., Doubba et al.**, "Prevalence of 4 agents of sexually transmitted diseases in leukorrhoea in Abidjan". *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 86 (4); 245-47, (1993)
- 5- **Köksalan, H, Esen, N., Çağatay, M., Tülek, N., Mert, A.**, "Vaginal akıntı örneklerinden *Gardnerella vaginalis*'in izolasyonu". *Mikrobiyol. Bült* 27 -(3), 191-195, (1993)
- 6- **Sobel, JD.**, "Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis", *Am J.Obstet. Gynecol.* 158, 924-934, (1985)
- 7- **Finegold, S., Martin, W.**, "Diagnostic Microbiology", Sixth ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis. Toronto, London, 430-434,(1982)
- 8- **Center for disease control.**, "Non- reported sexually transmitted diseases". *MMWR*, 28 -61, (1979)
- 9- **Kent, HL.**, "Epidemiology of vaginitis". *Am. J. Gynecol.* **165**, 1169-1175, (1991)
- 10- **Kinghorn,GR.** "Medical overview of vaginal candidiasis". *Int. Gynecol. Obstet.*37, 3-8, (1992).
- 11- **Hurley, R., De Louvois, J.**, "Candida vaginitis". *Postgrad. Med. J.* **55**, 645-647, (1975)
- 12- **Oriel, J.D., Partridge ,BM., Denn, MJ., et al.**, "Genital yeast infections". *Br. Med. J.* 4, 761-764,(1972)

- 13- **Tiball, R., Zarins, L., He X, Kaufmann, C,** "Toluropsis glabrata. Azole susceptibilities by microdilution colorimetric and macrodilution broth assay". *J.Clin. Mic* 33 (10), 2612-2615, (1995)
- 14- **Gönlüm, A., Gün, H., Haznedaroğlu, T., Baysallar, M., Başustaoglu, A., Özyurt, M.,**"Vajinal akıntı örneklerinden izole mayaların türlere göre dağılımı". *XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongre Bildiri Özetleri* 189, (1994)
- 15- **Aydın, F., Tosun, İ., Ekmek, Ü., Bilekli, C, Köroğlu, H., Soylu, H., Alpay, Ş.,** "Vulvovajinal candidiasis olgularından izole edilen mayaların türlere göre dağılımı" *Mikrobiyol. Bült.* 30, 51-55, (1996)