

**CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASINDA KROMOJENİK
BESİYERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**
The Evaluation of Chromogenic Medium in Identification of *Candida* Species

Ashhan GÜLTEKİN¹, Ayşe Nedret KOÇ², Mustafa Altay ATALAY³

Özet : Mayalar morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik benzerliklerinden dolayı sıklıkla karıştırılabilir. Bu çalışmanın amacı, sistemik kandidoz şüphesi olan hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının örneklerinin tanımlanmasının değerlendirilmesidir. Kasım 2007 Aralık 2008 ayları arasında sistemik kandidoz hastalarından toplanan 48 farklı örnek (bronkoalveolar lavaj, beyin omurilik sıvısı, steril vücut sıvısı, doku ve kan) çalışmaya dahil edildi. Morfolojik ve biyokimyasal testlerle *Candida* cinsi olarak tanımlanan mayaların kromojenik besiyeri (CHROMagar ID *Candida*, Biomerieux, Fransa) ekimi yapıldı. İzole edilen toplam 48 *Candida* suşları, morfolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak 22'si *C. albicans*, 5'i *C. keyfr*, 6'sı *C. tropicalis*, 7'si *C. glabrata*, 6'sı *C. parapsilosis*, biri *C. krusei* ve biri de *C. rugosa* olarak tanımlandı. Kromojenik besiyerinde 22 *C. albicans*, 13 *C. tropicalis/C. keyfr* ve 15'i diğer *Candida* türleri olarak tanımlandı. İki *C. parapsilosis* suşu hatalı olarak tanımlandı. Sonuç olarak, kromojenik besiyerinin, konvansiyonel yöntemlerle birlikte *Candida* türlerinin erken tanısında faydalı bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *Candida* türleri, kromojenik besiyeri, tanımlama

Summary: Yeasts can often be confused owing to similarities of their morphological, biochemical and physiological properties. The aim of the study was to evaluate the identification of *Candida* samples by chromogenic medium which are isolated from systemic candidiasis suspected patients. Between 2007 November and 2008 December, 48 different samples (bronchoalveolar lavage, cerebrospinal fluid, sterile body fluids, tissue, blood) recovered from systemic candidiasis suspected patients have been included in this study. Isolated yeasts identified as *Candida* with morphological and biochemical tests were inoculated on to chromogenic medium (CHROMagar ID *Candida*, Biomerieux, France). A total number of 48 *Candida* isolates were identified as 22 *C. albicans*, 5 *C. keyfr*, 1 *C. rugosa*, 6 *C. tropicalis*, 7 *C. glabrata*, 6 *C. parapsilosis*, 1 *C. krusei* with morphological and biochemical methods. In chromogenic medium, results were 22 *C. albicans*, 13 *C. tropicalis/C. keyfr* and 15 other *Candida* species. Two *C. parapsilosis* isolates were identified as incorrect. In conclusion; it is suggested that chromogenic medium with conventional methods is a useful method in early diagnosis of *Candida* species.

Keywords: *Candida* species, chromogenic medium, identification

¹ Bilim Uzm, Sađ. Bil. Enst. Mikrobiyoloji AD, Kayseri

² Prof. Dr. Erciyes Ün. Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD, Kayseri

³ Yrd. Doç. Dr. Erciyes Ün. Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 30.01.2012 Kabul Tarihi : 15.03.2012

***Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-08-491 nolu proje ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir .**

Son yıllarda immün sistemi baskılanmış, yenidoğan ve erişkin yoğun bakım birimlerinde yatan hastaların ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının artması ile fungal enfeksiyonlarda ve özellikle *Candida* enfeksiyonlarında bir artış olmuştur (1-6). Hastane kaynaklı kandidoz tablosunun hastanın yatış süresini uzattığı ve mortaliteyi artırdığı bildirilmektedir. Mikoloji laboratuvarlarında hastaların örneklerinden üreyen maya türleri için geleneksel yöntemlerle cins ya da tür düzeyinde tanımlama yapmak 2-5 gün kadar sürmektedir. *Candida* türlerini daha erken tanımlamak için yeni yöntemler ve besiyerleri arayışı sürmektedir.

Son yıllarda hızlı tanı için, biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonunu sağlayan ticari kitler de kullanıma girmeye başlamıştır. Ayrıca *Candida* türlerinin koloni rengine göre identifikasyonunu sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Bu nedenle hızlı tanı sağlayabilen özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, sistemik kandidoz şüpheli hasta örneklerinden *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerlerin duyarlılığının belirlenmesi amaçlandı.

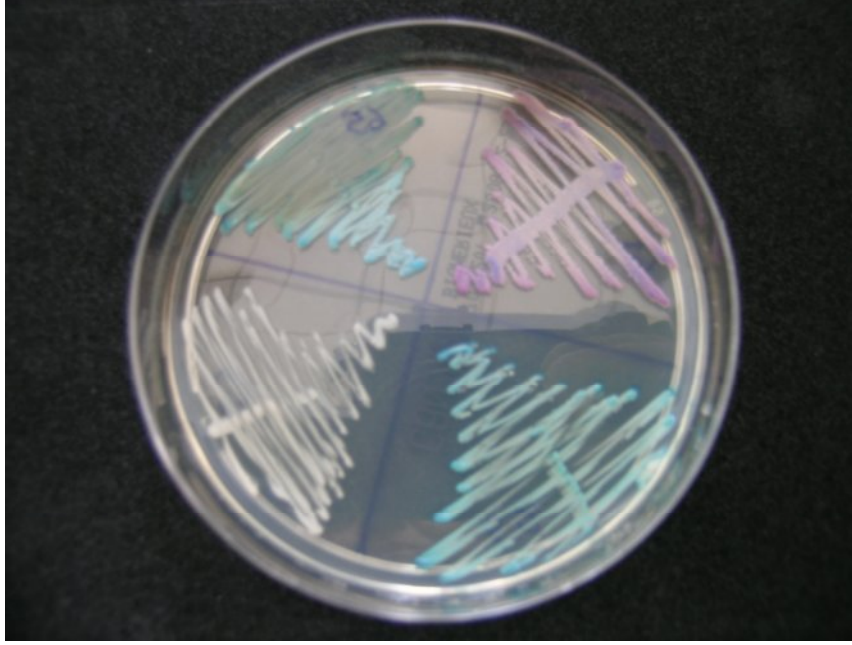
GEREÇ VE YÖNTEM

Kasım 2007-Aralık 2008 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Klinikleri'nde sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısıyla takip edilen 48 hastadan alınan çeşitli klinik örnekler (beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkoalveoler lavaj (BAL), kan ve diğer steril vücut sıvıları, doku) çalışmaya alındı. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda gelen klinik örnekler öncelikle %

15 –20'lik KOH ile direkt mikroskopik değerlendirilmesi yapıldı. Ayrıca uygun boyama yöntemleri (laktofenol pamuk mavisi, Gram, Giemsa) ile de incelendi. Gelen klinik örnekler antibiyotikli ve antibiyotiksiz Sabouraud Dektroz Agar (SDA)'a ekilip hem 25 °C'de, hem de 37°C'lik etüvlerde inkübe edildi. SDA'da genellikle 2-3 günde üreyen, hamur kıvamında, beyaz veya krem renkli, genellikle düzgün sınırlı ve kendine özgü maya kokusu olan kolonilerden Gram boyama yapıldı. Saf olduğu anlaşılan kültürlerden, makroskopik morfolojisi ve mikroskopik morfolojisi için lam kültürü, germ tüp testi, üreaz testi, karbonhidrat asimilasyonu testi için API 20C AUX (Biomerieux, Fransa) testleri yapıldı. Tanımlamanın ileri aşamasında kullanılmak üzere mikrobanklere alınan örnekler laboratuvar çalışmasının yapılacağı güne kadar -20 °C saklandı. CHROM agara (Biomerieux, Fransa) ekimi yapılan suşlar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edildi. CHROM agarda mavi renkli koloniler *C. albicans*, pembe renkli koloniler *C. tropicalis* veya *C. keyfr*, krem renkte olanlar ise diğer *Candida* türleri olarak tanımlandı (Resim 1). Kontrol kökenleri olarak *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. parapsilosis* ATCC 90018 kullanılmıştır.

BULGULAR

Sistemik mantar enfeksiyonu ön tanı hastalardan alınan 24 kan, 2 plevral mayi, 16 BAL, 1 doku, 4 periton mayi ve 1 BOS örneği çalışmaya alındı. İzole edilen 48 *Candida* kökeninin morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre (Mısır unu -Tween 80 agar, germ tüp, karbonhidrat asimilasyon, lam kültürü, lateks aglütinasyon) tanımlandı. Yirmiikisi (% 45.8) *C. albicans*, 7'si (%14.7) *C. glabrata*, 6'sı (%12.5) *C. tropicalis*, 6'sı (%12.5) *C. parapsilosis*, 5'i (% 10.5) *C. keyfr*, 1'i (%2) *C. krusei*, 1'i (%2) *C. rugosa* olarak tanımlandı (Tablo I).



Resim 1. Kromojenik besiyerinde *Candida* türlerinin pigment morfolojisi

Tablo I. İzole edilen *Candida* türlerinin örnek türlerine göre dağılımı

Candida Türleri	Örnek Türleri					
	Kan	Plevra	Periton	BAL	Doku	BOS
<i>C. albicans</i>	9	1	3	7	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	5	-	-	1	-	-
<i>C. tropicalis</i>	3	-	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	4	1	-	2	-	-
<i>C. kefyr</i>	2	-	-	3	-	-
<i>C. rugosa</i>	-	-	1	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	1	-	-

BAL: Bronkoalveoler lavaj **BOS:** Beyin omurilik sıvısı

Tablo II. *Candida* suşlarının yöntemlere göre karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri	Morfolojik ve biyokimyasal yöntemler n (%)	CHROMagar	
		Doğru n (%)	Yanlış n (%)
<i>C.albicans</i>	22 (45.8)	22 (100)	-
<i>C.glabrata</i>	7 (14.7)	7 (100)	-
<i>C.tropicalis</i>	6 (12.5)	6 (100)	-
<i>C.parapsilosis</i>	6 (12.5)	4 (66.6)	2 (33.4)
<i>C.keyfr</i>	5 (10.5)	5 (100)	-
<i>C.rugos</i>	1 (2)	1 (100)	-
<i>C.krusei</i>	1 (2)	1 (100)	-

Kültür yöntemleri ile CHROMagar sonuçları karşılaştırıldığında; kültür yöntemleri ile tanımlamada, 22'si *C. albicans*, 1'i *C. krusei*, 6'sı *C. tropicalis*, 7'si *C. glabrata*, 5'i *C. keyfr*, 1'i *C. rugosa*, 6'sı *C. parapsilosis* olarak değerlendirildi. CHROMagar'da ise mavi renkli pigment veren kolonilerden 22 örnek *C. albicans*, pembe renkli pigment veren koloniler; *C. tropicalis* veya *C. keyfr*, krem renkli pigment veren koloniler ise diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi. Sadece iki *C. parapsilosis* pembe renkli olarak yani *C. tropicalis* veya *C. keyfr* olarak tanımlandı (Tablo II).

TARTIŞMA

Kandidoz ve kandidemi immünsüprese hastalarda görülen en yaygın enfeksiyondur. *C. albicans* bu tip enfeksiyonlara neden olan en sık *Candida* türü olsa da, diğer *C. albicans* olmayan *Candida* türleri yaygın olarak kandidoz olguların %50'sinden fazlasının etkeni olarak görülmektedir (7-10).

C. albicans olmayan *Candida* türleri azole karşı daha dirençlidir ve azollerle tedavide başarısızlık oranı yüksektir (11,12). Geleneksel morfolojik ve biyokimyasal yöntemler *Candida* organizmalarını sadece cins ve tür seviyesinde tanımlayabilmektedir ve bu prosedürler günler sürmektedir. Bazı biyo-

kimyasal testlerin *Candida* izolatlarını tanımlamada başarısız olduğu rapor edilmiştir (13-15). Bu yüzden hızlı, güvenilir ve doğru bir yöntemin geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir (16). Bu amaçla yeni kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri türlerin farklılığını koloni rengine göre veren kromojenik besiyerleridir. Bu çalışmada, kromojenik besiyerleri olarak CHROMagar *Candida* ID kullanılarak *C. albicans* suşlarını diğer *Candida* türlerinden %100 doğru olarak ayırabildi. Diğer *Candida* türleri, *C. tropicalis* ve *C. keyfr*'i bir grup ve diğerlerini de bir grup olmak üzere üç grupta tanımlanabildi. Ancak üretici firma farklılığına göre kromojenik besiyerleri, tanımlayabildikleri *Candida* türlerini farklı olabilir.

Candida türlerinin tanımlandığı, *Candida* ID (Biomérieux), *Candida* CHROMagar (CHROMagar Company) ve CDA'nın (*Candida* Diagnostik agar) kıyaslandığı bir çalışmada; üç besiyerinde de *C. albicans* kolonilerinin *C. dubliniensis* kolonilerinden ayıramadığı, fakat *C. albicans* ile birlikte *C. dubliniensis*'i içeren grup için kullanıldığında hassaslık ve spesifikliğin %100 olduğu rapor edilmiştir. *Candida* ID agarın *C. tropicalis* ve *C. keyfr*'i ayıramadığı, fakat *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii*'yi % 94.7 duyarlılıkta ve %93.8 özgülükte ayırt edebildiği bildirilmiştir (17).

Hem direkt klinik örnekten, hem de üreyen maya suşlarında CHROMagar kullanarak tür tanısının yapıldığı bir çalışmada, stokta ve klinik örnekte *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* suşlarının %95 oranında doğru olarak tanımlandığı bildirilmiştir. CHROMagar örneklerinin okunmasında iki gözlemci arasındaki fikir birliğinin %95 olduğu rapor edilmiştir. CHROMagar'da *Candida* suşlarının gelişiminin antifungal minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve VITEK tanımlama sonuçlarını etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca karışık kültürlerde de başarılı olduğu rapor edilmiştir. CHROMagar besiyerinin hızlı, tahmini bir tanımlama yapmak için son derece kullanışlı olduğu, bu özelliğiyle *Candida* türlerini karışık kültürlerde de analiz edebilmesi eklendiğinde, mikoloji laboratuvarlarında iş akışına çok yardımcı olduğu bildirilmiştir (18). Kromojenik besiyeri olarak CHROMagar *Candida* kullanıldığı çalışmada, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. dubliniensis* suşlarını diğer *Candida* türlerinden ayırt edebildiği gösterilmiştir (19).

Bir diğer çalışmada, kromojenik besiyerinin; *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. firmetaria*, *C. guillermundii*, *C. incanspicua*, *C. keyfr*, *C. lipolytica*, *C. lusitanaeae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis* ve *C. rugosa*'nın tanısında kullanışlı olduğu rapor edilmiştir. *C. incanspicua*'nın ve *C. firmetaria*'nın bazı suşlarının, *C. krusei*'den ayrılmasının güç olduğu bildirilmiştir. Kromojenik besiyerinde yedi günün üzerinde üreyen maya suşlarının koloni renklerinde bozulma olmadığı bildirilmiştir. *Candida*, *Cryptococcus* ve *Trichosporon* suşlarının yalnız veya karışık olarak inoküle edildiğinde, *C. albicans* ve *C. krusei*'nin okuma periyodunda kolayca belirlendiği, ancak *C. glabrata* suşları 3-4 gün üredikten sonra diğer türlerden ayrılmasını kolaylaştığı bildirilmiştir. *C. tropicalis*, *Trichosporon* türleri ve nadir olarak *Cryptococcus* türlerinin de benzer koloniler ürettiği bildirilmiştir. Diğer araştırmalarda farklı olarak, karışık kültürleri tanımlamanın güç olduğu rapor edilmiştir (20).

Genital örneklerde mayaların izolasyonunda kromojenik besiyerinin kullanımı üzerine yapılan bir çalışmada, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın %82'si için doğru sonuç verdiği, deneyimsiz laboratuvar elemanının hepsi *C. albicans* suşlarını %100 ve *C. krusei* ve *C. tropicalis* suşlarını % 90 oranında doğru tanımladığı bildirilmiştir. kromojenik besiyerinin genital örneklerden izolasyon besiyeri olarak uygun olduğu gösterilmiştir. Kromojenik besiyerinin karışık kültürleri kolayca tanımlaması, sık karşılaşılan mayaların doğru izolasyonu ve erken tanısına izin verdiği bildirilmiştir (21).

Kan kültürlerinden *Candida* türlerini kromojenik besiyeri kullanarak direkt izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, kromojenik besiyerinin, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. albicans*'ın tanımlanması için kullanışlı, farklı ve seçici bir besiyeri olduğu bildirilmiştir. Boğaz, balgam, BAL, vajinal, idrar, dışkı gibi klinik örneklerden de direkt maya izolasyonunda kromojenik besiyerinin kullanışlı olduğu bildirilmiştir (21). Kan kültürlerinden direkt olarak *Candida* türlerini kromojenik besiyeri kullanarak renk ve koloni karakteristiklerine göre tanımlandığını bildirerek, *Candida* türlerinin tanımlanması için çok hızlı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. Böylece antifungal ajan seçiminde yardımcı olabileceği ve hastanın morbidite ve mortalitesini azaltmaya yardımcı olabileceği bildirilmiştir (22). Bununla birlikte başka bir çalışmada, direkt kan kültürlerinden *Candida* türlerini kromojenik besiyerinin tanımlayamadığı rapor edilmiştir (23).

Sonuç olarak; *Candida* infeksiyonlarının tanısında kültür sistemlerinin altın standartlığı devam etmektedir. Bu çalışmada kromojenik besiyerinin, konvansiyonel yöntemlerle birlikte *Candida* türlerinin erken tanısında faydalı bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Edwards JE. *Candida Species*. in: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease (4rd edition)*. Vol 2. Newyork, Churchill Livingstone, 1995;2289-2306.
2. Erbakan N. *Derinin Mantar Hastalıkları*. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1989: 1-332.
3. Kuştimur S. *Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler*. *Mikrobiyol Bült* 1994; 28:175-181.
4. Warren NG, Shadomy HJ. *Candida, crypococcus and other yeasts of medical importance*. in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology (6th edition)*. Washington DC, ASM Press 1995;723-737.
5. Edwards JE. *Candida Species*. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE(eds), *Principles and Practice of Infectious Disease*. Vol 2. New York, Churchill Livingstone, 1995:pp2289-2306.
6. Kuştimur S. *Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler*. *Mikrobiyol Bült* 1994; 28: 175-181.
7. Clark TA, Hajjeh RA. *Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses*. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 569-574
8. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:685-702.
9. Marchetti O, Bile J, Fluckiger U, et al. *Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals:secular trends, 1991-2000*. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311-320
10. Tortorano MA, Peman J, Bernhardt H, et al. *Epidemiology of candidaemia in Europe:results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 317-322.
11. Vermitsky JP, Edlind TD. *Azole resistance in Candida glabrata:Coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr-like transcription factor*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3773-3881.
12. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al. *Candidemia in cancer patients a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*. *Clin Infect Dis* 1999; 28:1071-1079.
13. Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS. *Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek yeast biochemical card*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2889-2992.
14. Warren NG, Hazen KC. *Candida, Cryptococcus and other yeasts of medical importance*. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology (6th edition)*. Washington DC, ASM Press 1995; pp 1184-1199
15. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. *Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States*. *Crit Care Med* 1999; 27: 887-892.
16. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, et al. *Species identification of medically important fungi by use real-time LightCycler PCR*. *J Med Microbiol* 2003; 52:1071-1076.
17. Cooke M, Miles RJ, Price RG, et al. *New chromogenic agar medium for the identification of Candida spp*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68:3622-3627.
18. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. *Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61.

19. Duane R, Miriam L, Karon L, et al. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 1-5.
20. Hospenthal DR, Murray KC, Beckius ML et al. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4768-4770.
21. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol* 1997; 50: 563-565.
22. Horvath L, Hospenthal R, Murray K, Dooley D. Direct Isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2629-2632.
23. Willinger B, Hillwoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3793-3795.