

# Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar *Candida* besiyerininin kullanımı

## *Use of CHROMagar Candida for rapid identification of Candida species isolated from bloodstream infections*

Feza Otağ, Gönül Aslan, Sebahat Şen, Gürol Emekdaş

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

İletişim / Correspondence: Yrd. Doç. Dr. Feza Otağ Adres / Address: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 33079, Mersin Tel. 324 337 43 00/1541, Faks. 324 337 43 05 E-mail: fezaotag@mersin.edu.tr

### ÖZET

CHROMagar *Candida* besiyeri (CAC) *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*' in tanımlanmasında kullanılan seçtirici ve ayırt ettirici bir besiyeridir. Bu besiyerinde suşlar, 35°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından sırasıyla yeşil, çelik mavi, pembe, parlak beyaz ve koyu pembe-mor renkte kolaylıkla ayırt edilebilen koloniler oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada, Şubat 2002-Ağustos 2003 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 35 stok *Candida* suşu ile Eylül 2003-Mart 2006 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen ve maya hücreleri saptanan toplam 283 kan kültürü örneği CAC besiyerinin etkinliğinin ve rutin maya tanısındaki yerinin saptanması amacıyla değerlendirilmiştir. Kontrol amacıyla aynı zamanda Sabouraud Dekstroz Agara da ekim yapılmıştır. Stok suşların ve kan kültürlerinden izole edilen suşların %92-94'den fazlasını oluşturan *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. Krusei* ve *C. glabrata* kolonileri morfolojilerine ve renklerine göre doğru tanımlanmıştır. CAC besiyerinin kullanımı ile *Candida* türlerinin doğrudan tanısı klinisyenlere yüksek riskli fungemi şüpheli hastalar için doğru antifungal seçiminde hız kazandıracağı gibi morbidite ve mortalitenin düşmesine de yardımcı olacaktır.

**Anahtar sözcükler:** Chromagar *Candida*, *Candida* türleri, fungemi, mayaların hızlı tanısı

### SUMMARY

CHROMagar *Candida* is a new differential medium that allows selective isolation of yeasts and simultaneously identifies colonies of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. Colony morphology and color have been well defined when CAC has been used to isolate yeast directly from clinical specimens. We evaluated the designation of effectiveness and ability of this medium with 35 stock *Candida* strains, isolated from different clinical specimens, between February 2002-August 2003, and 283 hemoculture specimens which yeast cells were determined, between September 2003-March 2006. As a control the same isolates were inoculated on SDA simultaneously. Stock and clinical isolates, consisting of over 92-94% of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. Krusei* and *C. glabrata*, were correctly identified on the basis of colony morphology. Direct isolation could allow mycology laboratories to more rapidly identify *Candida* strains, enable clinicians to more quickly make antifungal drug selections, and potentially decreases patient mortality and morbidity.

**Key words:** Chromagar *Candida*, *Candida* spp., fungemia, rapid identification of yeast

## GİRİŞ

Son yirmi yılda *Candida* türleri kan kültürlerinden izole edilen hastane infeksiyonları patojenleri arasında dördüncü sırada olup mortalite oranı %40 olarak bildirilmektedir (1). *C. albicans* fungeminin en sık etkeni olarak bilinmekteyken izole edilen türlerin *albicans* dışı *Candida* türleri lehine giderek artmakta olduğu ve beraberinde antifungal ajanlara duyarlılık azalmasının görüldüğü bildirilmektedir (2). Dolayısıyla klinisyenlerin uygun antifungal ajan seçimi için etkenin çabuk izolasyonu önem kazanmıştır. Hızlı maya identifikasyonu amacıyla birçok kromojenik besiyeri geliştirilmiştir. Türe özgü kromojenik substratlar içeren bu besiyerlerinde mayalar ürettikleri enzimlerle reaksiyona girerek çeşitli renkte koloniler oluşturmaktadırlar (3, 4, 5). CHROMagar *Candida* (CAC) hazır besiyeri öncelikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* için tasarlanmış olup 35°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından sırasıyla yeşil, çelik mavi ve toz pembe renkte kolaylıkla ayırt edilebilen koloniler oluşturmaktadırlar (6, 7, 8). *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* türlerinin de CAC besiyerinde kolaylıkla tanılabildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (4, 6, 7).

CAC besiyerinin kullanımı uygun antifungal ajanın çabuk seçilmesi ve tedaviye erken başlanması açısından klinisyene ve hastaya zaman kazandıracaktır. Bu çalışmada, Şubat 2002-Ağustos 2003 tarihleri arasında çeşitli örneklerden izole edilmiş 35 stok *Candida* suşu ile Eylül 2003-Mart 2006 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen 283 kan kültürü örneği çalışmaya alınmış ve mayaların hızlı tanısı için CAC besiyerinin etkinliği ve kullanım kolaylığı araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Stok suşlar. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinden Şubat 2002-Ağustos 2003 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 35 maya suşu [*C. albicans* (20 suş), *C. tropicalis* (5 suş), *C. glabrata* (1 suş), *C. lusitanae* (1 suş), *C. parapsilosis* (6 suş),

*C. guilliermondii* (1 suş), *C. krusei* (1 suş)], CAC besiyerinin etkinliğinin araştırılması amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir. Konvansiyonel yöntemler (mısır unu-tween 80 agarda hif ve blastospor oluşumunun izlenmesi, çimlenme borusu deneyi) ve API 20 C AUX (Bio-Merieux, Fransa) ticari kiti kullanılarak tanımlanan bu suşlar birer örnek olmak üzere serum fizyolojikli ve gliserinli buyyonlu ortamlarda korunarak saklanmıştır. Tüm suşlar 90-mm. petride hazırlanmış ticari CAC (BBL, Becton-Dickenson, Fransa) besiyerine ve Sabouraud dekstroza agara (SDA) (Oxoid) ekilerek 35°C'de, aerobik ortamda, 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Klinik örnekler. Eylül 2003-Mart 2006 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen ve maya hücreleri saptanan toplam 283 kan kültürü örneği CAC besiyerinin rutin maya tanısındaki yerinin saptanması amacıyla değerlendirilmiştir. Kan kültürleri BACTEC-9120 (Becton-Dickenson, İngiltere) otomatik inkübatör sisteminde takip edilirken pozitif sinyal veren ve Gram boyama ile maya hücreleri saptanan şişelerden SDA ve CAC besiyerlerine ekim yapılmış, 35°C'de, aerobik ortamda, 24 saatlik inkübasyondan sonra SDA'da üreyen koloniler hif ve blastokonidyum yapılarının ve germ tüp oluşumunun incelenmesi için sırasıyla mısır unu-tween 80 agara (Oxoid) ve insan serumuna ekimleri yapılmıştır. Ayrıca gerektiğinde API 20 C AUX veya ID 32 C (Bio-Merieux, Fransa) ticari kiti kullanılmıştır. *C. albicans* ve *C. dubliniensis* ayrımı için 42°C'de üreme deneyi uygulanmış ve Staib agara ekim yapılmıştır.

Mikrobiyolojik çalışma. CAC besiyerinde üreyen maya kolonileri 7 gün süreyle, oda ısısında ve ışıktan korunarak muhafaza edilirken, renk, genişlik, koloni çevresindeki renk difüzyonu, gibi özellikleri en az iki mikrobiyolog tarafından izlenerek kaydedilmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü günlerde örneklerin fotoğrafları çekilmiştir. CAC'deki renk değişimleri referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Kontrol suşu olarak ATCC (100231) *C. albicans*, ATCC (750) *C. tropicalis*,

ATCC (6258) *C. krusei*, ATCC (66032) *C. glabrata* ve ATCC (22019) *C. parapsilosis* kullanılmıştır.

## BULGULAR

CHROMagar Candida besiyerinde kontrol suşları, bir gecelik inkübasyonun ardından, *C. albicans* yeşil, *C. tropicalis* çelik mavi, *C. krusei* yassı-düz, kenarları beyazlaşmış toz pembe renkte ve tüylü görümlü, *C. glabrata* koyu pembe-mor ve *C. parapsilosis* ise parlak beyaz renkli koloniler oluşturmuştur (4, 5, 9)

CAC ve SDA'ya ekimleri yapılan otuzbeş stok suşun 33'ü (%94.3), 20 *C. albicans*, beş *C. tropicalis*, altı *C. parapsilosis*, bir *C. glabrata* ve bir *C. krusei* tür düzeyinde tanımlanmıştır. Diğer iki tür, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* ayırt edilemeyen küçük pembe renkte koloniler oluşturmuştur. Ancak *C. guilliermondii* kolonileri 48 saatten sonra oluşturmaya başladığı karakteristik yapısıyla diğerlerinden ayrılmaya başlamıştır; koloni rengi pembe-leylak tona kayarken koloni yüzeyi kuru ve pürüklü bir görünüm kazanmıştır.

Eylül 2003-Mart 2006 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen ve maya hücreleri saptanan toplam 283 kan kültürü örneğinden 287 *Candida* suşu izole edilmiştir. Dört örnekte ikişer tür üremiştir. Rutin laboratuvar iş akışı sırasında kullanılan identifikasyon yöntemleriyle (konvansiyonel yöntemler ve gerektiğinde API kitleri kullanılarak) sıklık sırasıyla, *C. parapsilosis* (155 suş), *C. albicans* (62 suş), *C. tropicalis* (34 suş), *C. glabrata* (12 suş), *C. kefy*r (6 suş), *Geothrichum capitatum* (6 suş), *C. guilliermondii* (5 suş), *C. lipolytica* (3 suş), *C. krusei* (2 suş), *C. inconspicua/norvegensis* (1 suş), *Saccharomyces cerevisiae* (1 suş) olarak tanımlanmıştır.

En çok izole edilen 265 suş (%92.3), *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*, CAC besiyerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra türe özgün tanımlanmış renkte koloniler oluşturmuşlardır. Germ tüp ve klamidospore oluşturan *Candida* suşlarının tamamı CAC besiyerinde yeşil renkli koloniler oluşturmuştur. *C. albicans* olarak tanımlanan

suşlara uygulanan 42°C deneyi ve Staib agar'a ekim sonucunda *C. dubliniensis* lehine sonuç alınmamıştır. Germ tüp ve klamidospore oluşturmeyen albicans dışı suşlar öncelikle mısırunu agarda oluşturdıkları hif ve blastokonidyum yapılarına göre ayrılmış ve API ID 32 C veya API 20C AUX oksonogram kiti kullanılarak konfirme edilmiştir. CAC besiyerinde oluşturdıkları pigmentasyonlarına göre değerlendirilmiştir.

*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 parlak beyaz renkte iken, 48 saatten sonra kirli beyaz ve 72 saatten sonra uçuk pembe renge dönüşmüştür.

*C. kefy*r 24 saat sonunda oluşturduğu kirli beyaz-krem renkli kolonilerinde ilerleyen günlerde değişiklik saptanmamıştır.

*C. lipolytica*, kolonileri 24 saat sonra parlak-pembe iken 48-72 saatten sonra bombeleşmeye, yüzeyi kuru ve tüylümsü görünüm kazanmaya başlamış ve kimi kolonilerin etrafında halo gözlenmiştir.

*C. inconspicua/norvegensis*, 24 saat sonra krem-beyaz renkte, yayık, bombesiz koloniler oluşturmuşken sonraki günlerde kolonilerde renk değişikliği olmaksızın yüzeyde kuruma, tüylümsü, tebeşir tozu görünüm meydana gelmiştir.

*Geothrichum capitatum* ve *Saccharomyces cerevisiae* türleri de 24 saatlik inkübasyondan sonra pembe renkli koloniler oluşturmuşlardır. *Saccharomyces cerevisiae* kolonileri küçük, pembe-mor renkte iken *Geothrichum capitatum* kolonilerinde 48 saatten itibaren pembe-beyaz renk ve buruşuk yüzey görünümü hakim olmaya ve koloni çapı genişlemeye başlamıştır.

Dört kan kültürü örneğinde ikişer maya türü üremiştir; kalp-damar cerrahisinde ve beyin cerrahisinde yatan hastalara ait olan kan kültürü örneklerinde *C. parapsilosis*+*C. tropicalis*, reanimasyondaki hastaya ait örnekte *C. albicans*+*C. parapsilosis*, ve göğüs cerrahisindeki hastaya ait örnekte *C. albicans*+*C. kefy*r beraberliği saptanmıştır.

## TARTIŞMA

CHROMagar *Candida* besiyerinde hem kontrol suşları hem de klinik örneklerden izole edilen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* suşları kolaylıkla identifiye edilmiştir. Pozitif kan kültürü şişesinden doğrudan ya da SDA'daki kolonilerinden CAC'a yapılan ekimlerden sonra oluşan koloni renkleri arasında bir fark saptanmamıştır (4, 10).

Çeşitli kliniklerden gönderilmiş kan kültürü örneklerinden *C. parapsilosis* (%40) en sık izole edilen maya olmuştur. Bunu sırasıyla *C. albicans* (62 suş), *C. tropicalis* (34 suş) ve *C. glabrata* (12 suş) izlemiştir. Gerek klinik örneklerden izole edilen stok suşların, gerekse kan kültürlerinden izole edilen maya suşlarının yaklaşık %92'den fazlası CAC ile 24 saatte kolayca tanımlanmıştır. Dolayısıyla bu dört *Candida* suşunun hızlı tanısı önemlidir (1, 3, 7, 11).

Polimikrobiyal üremelerde CAC besiyerinde farklı renkte koloniler gözlenmiş ve SDA ilk gün ekim petrisinden birden fazla farklı koloninin saf kültür izolasyonunun yapılması gerektiği konusunda özellikle mikoloji laboratuvarının yeni yapılandırıldığı ünitelerde uyarıcı ve eğitici olmuştur. Bu nedenle polimikrobiyal üremelerde CAC besiyerinden identifikasyon zaman ve maliyet açısından avantaj oluşturmaktadır (11, 12, 13).

Diğer az sıklıkta izole edilen türlerin (*C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. lyopolitica*, *C. inconspicua/norvegensis*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae*) CAC besiyerinde oluşturdukları kolonilerinden tanınması kolay olmadığından hızlı tanı için konvansiyonel yöntemlere ve aynı zamanda hazır ticari identifikasyon yöntemlerine başvurulmuştur (14, 15).

Yoğun bakım, yanık, onkoloji gibi immün sistemi zayıflamış hastaların uzun süreli tedavi gördüğü ünitelerde özellikle ender rastlanan *Candida* türleriyle oluşan epidemilere rastlanmaktadır (16, 17, 18, 19). CAC besiyerininin kullanımı ender rastlanan türlerin varlığının hızla farkına var-

mamızı sağlayacaktır (20).

Fungemi etkeni *Candida* türlerinin tanımlanmasında laboratuvar iş akışında germ tüp, mısır unu-tween 80 agar, API identifikasyon panelleri sırası izlendiği takdirde, pozitif sinyal veren ve maya hücresi saptanan şişeden ekim yapılan ilk gün petrisi SDA' da üreyen kolonilerin saf kültür olduğunu varsayarsak, *C. albicans* suşları yaklaşık olarak en erken 24+24 saat sonra tanımlanabilecektir. Albicans dışı türlerde ise tür düzeyinde tanımlama sadece konvansiyonel yöntemlerle en erken 48-72 saat sonra yapılabilecektir. API kullanımına başvurulduğu takdirde bu süreye 24 saatlik bir süre daha eklenebilir. Oysa maya hücresi saptanan pozitif şişeden doğrudan CAC besiyerine ekim yapılacak olursa klinik olarak sıklıkla izole edilen suşların yaklaşık %90'dan fazlası, sadece SDA petrisinde maya kolonilerin üremesi için gereken süre olan, 24 saat sonra tür düzeyinde tanımlanabilecektir. Ayrıca polimikrobiyal üremelerin farkına varmak daha kolay olacaktır. Fungemi tanısıyla yatan hastaya hızlı sonucun ulaştırılmasının sağlanabileceği bu iş akışında CAC besiyeri API identifikasyon panellerine göre daha fazla kullanılacağından laboratuvar maliyeti de azalacaktır.

Kan kültürlerinden mayaların primer izolasyonu için CHROMagar *Candida* besiyerininin kullanımı klinik olarak önemli *Candida* türlerinin izolasyonuna izin vermesi, laboratuvar iş yükünü ve maliyetini düşürmesi ve daha önemlisi klinisyenlere antifungal ajan seçimini hızla yaptırarak hasta mortalite ve morbiditesini düşürmesi açısından önemlidir.

## Kaynaklar

1. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. J Clin Microbiol 1998; 36: 1886-1889.
2. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE Jr, Jarvis W, Dawson J, Wenzel RP. National epidemiology of mycoses

- survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 253-258.
3. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.
  4. 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: 2629-2632.
  5. Louwagie B, Surmont I, Verhaegen J, Odds F. Differential and enrichment media for selective culture and recognition of yeast species from clinical material: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 406-411.
  6. 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.
  7. Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 201-204.
  8. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3622-3627.
  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. Birinci A, Akkurt L, Acuner C, Unlu M, Durupinar B. Rapid identification of the *Candida* species from direct blood cultures by CHROMagar *Candida*. *J Int Med Res* 2004; 32: 484-487.
  11. Pulimood S, Ganesan L, Alangaden G, Chandrasekar P. Polymicrobial candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 353-357.
  12. 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: 196-198.
  13. 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.
  14. 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: 422-426.
  15. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Howarth LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Annals Clin Microbiol Antimicrobial* 2006; 5: 1-5.
  16. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462-478.
  17. Otag F, Kuyucu N, Erturan Z, Sen S, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the paediatric intensive care unit: case reports and review of the literature. *Mycoses* 2005; 48: 265-269.
  18. 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: 248-252.
  19. Taj-Aldeen SJ, Doiphode SH, Han XY. Kodamaea (*Pichia*) *ohmeri* fungaemia in a premature neonate. *J Med Microbiol* 2006; 55: 237-239.
  20. Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4768-4770.