

# Kan Kültürlerinden Direkt Olarak Çimlenme Borusu (Germ tüp) Testinin Değerlendirilmesi

Mustafa Altay ATALAY, Gonca DEMİR, Hafize SAV, Ayşe Nedret KOÇ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

**Amaç:** Kandidemilerin erken tanımlanması ve uygun anti-fungal tedaviye erken başlanması morbidite ve mortalite açısından önemlidir. Kandidemilerde *Candida albicans* dışı türlerin oranı artmasına rağmen, *C. albicans* halen en sık görülen tür olup, çoğu azollere duyarlıdır. Bu nedenle, hedeflenen ve maliyet etkin antifungal stratejiye yol göstermesi açısından *C. albicans*'ın hızlı tanısı, önemli bir basamaktır. Bu çalışmada, Gram boyama yöntemiyle maya görülen pozitif kan kültürü şişelerinden direkt çimlenme borusu testinin (ÇBT) yapılarak tanısal doğruluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Yaklaşık bir yıl boyunca (Haziran 2011-Temmuz 2012), Gram boyama yöntemiyle maya görülen tüm pozitif kan kültürü şişelerinden Sabouraud dekstroza agar pasajları yapılmış ve direkt ÇBT uygulanmıştır. Direkt ÇBT testi için 10-20µl kan kültürü şişe içeriği alınmış ve tavşan serumu içerisine konularak 37°C'de üç saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Geleneksel ÇBT, 24-48 inkübasyondan sonra pasajda üreyen kolonilerden yapılmış ve ayrıca izolatların tanımlanmasında mısır unu-Tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünüşleri ve API 20C AUX (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Toplam 67 izolattın 32'si (%47,8) *C. albicans*, 14'ü (%20,9) *C. glabrata*, 11'i (%16,4) *C. parapsilosis*, beşi (%7,5) *C. kefyr*, dördü (%6) *C. krusei* ve biri de (%1,5) *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Direkt ÇBT, *C. albicans* dışı türlerin hiçbirinde yalancı pozitiflik vermezken, iki *C. albicans* izolatu direkt ÇBT ile negatif bulunmuş ve direkt ÇBT'nin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %94 ve %100 olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Direkt ÇBT'nin, geleneksel ÇBT kadar duyarlı olmasa da, kan kültürlerinden elde edilen *C. albicans* türlerinin hızlı ön tanısında güvenilir bir test olduğu ve erken antifungal ajan seçimine katkıda bulunabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Candida albicans*, çimlenme borusu testi, kan kültürü

## SUMMARY

**Evaluation of the Germ Tube Test Directly from Blood Cultures**

**Objective:** Early identification of yeast isolates from blood cultures and establishment of appropriate antifungal therapy may improve clinical outcomes. While the proportion of candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species continues to increase, *Candida albicans* still remains as the predominant pathogen. Most of the bloodstream *C. albicans* isolates remain susceptible to azoles. Thus rapid identification of *C. albicans* is an important step to guide targeted and cost-effective antifungal strategy in the treatment of bloodstream infections due to *C. albicans*. The aim of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of germ tube test (GTT) performed directly from BacT/Alert® blood culture bottles which were detected as yeast positive by Gram staining.

**Materials and Methods:** Over a year period (June 2011-July 2012), all positive blood cultures in which yeasts were visualized by Gram staining, were subcultured onto Sabouraud dextrose agar, and a direct GTT was performed. To perform direct GTT, 10-20µl of the blood culture bottle contents were incubated with rabbit serum for 3h at 37°C. Traditionally, GTT is performed on colonies grown on agar plates after 24-48 h of incubation. All isolates were then completely identified using the API20C AUX (bioMérieux, France) and morphological appearance on corn meal-Tween 80 agar medium.

**Results:** Among a total of 67 isolates, 32 were identified as *C. albicans* (47,8%), 14 as *C. glabrata* (20,9%), 11 as *C. parapsilosis* (16,4%), five as *C. kefyr* (7,5%), four as *C. krusei* (6%), and one as *C. tropicalis* (1,5%). No false-positive germ tube results were observed for non-*albicans* *Candida* isolates. Two *C. albicans* isolates were GTT negative when tested directly from blood culture bottles but were subsequently found to be GTT positive when the test was performed directly from the colonies. Thus, the calculated sensitivity and specificity of the direct GTT for prospective clinical samples were 94%, and 100%, respectively.

**Conclusion:** Although not as sensitive as the traditional GTT, direct GTT seemed to be a reliable test in the rapid initial diagnosis of *C. albicans* species obtained from blood cultures and may contribute to the early and appropriate initiation of the antifungal agent therapy.

**Key words:** *Candida albicans*, germ tube test, blood culture

Alındığı tarih: 10.07.2012

Kabul tarihi: 20.08.2012

Yazışma adresi: Mustafa Altay Atalay, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

e-posta: altayatalay@gmail.com

## GİRİŞ

*Candida* türleri hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8-10'una neden olur ve koagülaz negatif stafilokoklar, *Staphylococcus aureus* ve enterokoklardan sonra dördüncü sırayı alır ve yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir<sup>(1,2)</sup>. Uygun antifungal ajana erken başlanması, *Candida* türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının tedavisinde önemlidir<sup>(3)</sup>. Kandidemilerde *C. albicans* dışı türlerin görülme sıklığı artmakla birlikte, en sık etkenin genellikle *C. albicans* olduğu ve *C. albicans* izolatlarının çoğunun flukonazol gibi azollere duyarlı olduğu bildirilmektedir<sup>(4,5)</sup>. Bu nedenle, hedeflenen ve maliyet etkin antifungal stratejiye yol göstermesi açısından, kandidemilerdeki tanı ve tedavi algoritmasında *C. albicans*'ın hızlı tanısı, önemli bir basamaktır<sup>(6)</sup>.

Geleneksel olarak, *C. albicans*'ın ön identifikasyonu kan kültür şişelerinden pasajlanmış katı besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan çimlenme borusu (germ tüp) testi (ÇBT) ile gerçekleştirilir. Bu test basit, hızlı ve değerli olmasına rağmen, katı besiyerinde yeterli miktarda koloni oluşması için 24-72 saat gereklidir<sup>(6,7)</sup>.

Bu çalışmada, Gram boyama yöntemiyle maya görülen kan kültürü şişelerinden direkt ÇBT yapılması ve bunun rutinde uyguladığımız ÇBT ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Haziran 2011-Temmuz 2012 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli birimlerinden Merkez Laboratuvarı Bakterioloji Ünitesi'ne gönderilen ve BacT/Alert 3D (Biomérieux, Fransa) otomasyon sisteminde inkübe



Resim 1. Kan kültürü şişesinden yapılan direkt çimlenme borusu görüntüsü.

edilen kan kültürleri takip edilmiştir. Kan kültür şişelerinden üreme sinyali verenler önce pasajlanmış, daha sonra preparat hazırlanmış ve Gram boyama yöntemiyle maya görülen 67 örnek çalışmaya alınmıştır.

Direkt ÇBT için, 10-20µl kan kültür şişesi içeriği 0,5 ml tavşan serumu içerisinde 37°C'de üç saat inkübe edilmiş ve mikroskop altında çimlenme borusu aranarak kaydedilmiştir (Resim 1). Geleneksel ÇBT için pozitif kan kültürlerinden yapılan pasajlardaki kolonilerden alınarak, 0,5ml tavşan serumunda koyu olmayan süspansiyon hazırlanmış ve 37°C'da üç saat inkübe edilmiştir. Süspansiyondan bir damla alınıp, lam-lamel arasında mikroskopta küçük büyütme ile incelenmiştir. Sonuçlar direkt ÇBT ile karşılaştırılmış ve ayrıca, tüm izolatların tanımlanması, mısır unu-Tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünümüne göre ve API 20C AUX (bioMérieux, Fransa) kullanılarak da yapılmıştır.

İstatistiksel olarak, direkt ÇBT'nin tanınasal doğruluğu, duyarlılık ve özgüllüğün %95 güven aralığında hesaplanmıştır.

## BULGULAR

Toplam 67 izolatın 32'si (%47,8) *C. albicans*, 14'ü (%20,9) *C. glabrata*, 11'i (%16,4) *C. parapsilosis*, beşi (%7,5) *C. kefyr*, dördü (%6) *C. krusei* ve biri de (%1,5) *C. tropicalis* olarak tanımlandı.

Direkt ÇBT, *C. albicans* dışı türlerin hiçbirinde yalancı pozitiflik vermezken, iki *C. albicans* izolatu direkt ÇBT ile negatif, geleneksel ÇBT ile pozitif sonuç vermiştir (Tablo 1). Direkt ÇBT'nin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %94 (%95 güven aralığı [GA]=%79-99) ve %100 (%95 GA=%90-100) olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinde direkt ÇBT ve geleneksel ÇBT uyumu.

Türler (sayı)	Uyum (sayı)	Uyumsuzluk (sayı)
<i>C. albicans</i> (n=32)	30	2
<i>C. parapsilosis</i> (n=14)	14	0
<i>C. glabrata</i> (n=11)	11	0
<i>C. kefyr</i> (n=5)	5	0
<i>C. krusei</i> (n=4)	4	0
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	1	0
<b>Toplam (67)</b>	<b>65</b>	<b>2</b>

ÇBT: Çimlenme borusu testi

## TARTIŞMA

Risk altındaki bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonu giderek arttığı için, hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları etkenleri arasında üst sıralarda yer alan *Candida* türleri her geçen gün önem kazanmaktadır<sup>(8)</sup>. Türlerin hızlı tanısı erken ve uygun antifungal tedavi için yol gösterir ve erken antifungal tedavi de *Candida* türlerine bağlı kan dolaşımı enfeksiyonları sonuçlarının iyileştirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle mayaların hızlı olarak tür düzeyinde tanımlaması mikrobiyoloji laboratuvarları için zorunludur<sup>(9,10)</sup>.

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında, *C. albicans* tüm bölgelerde en fazla izole edilen tür olmakla beraber görülme sıklığı bölgelere göre değişmektedir<sup>(11)</sup>. SENTRY antimikrobiyal sürveyans programının 2008-2009 yılları arasındaki çalışmasında Asya-Pasifik, Latin Amerika, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerindeki kandidemilerde en sık etkenin *C. albicans* (%48,4) olduğu ve *C. albicans*'ın anidulafungin, mikafungin, flukonazol, posakonazol ve vorikonazol gibi antifungallere direnç oranının sırasıyla %0,1, %0,1, %0,1, %0 ve %0 olduğu bildirilmektedir<sup>(12)</sup>. Çalışmamızda da en sık izole edilen tür *C. albicans*'dı. Bu nedenle antifungal ajanlara direnç oranı düşük olan *C. albicans*'ın, direnç oranı yüksek *C. albicans* dışı türlerden ayrımı, hedeflenen uygun antifungal tedaviye erken başlanarak mortalite oranlarının azalmasını sağlayabilir.

*Candida* türlerinin tanımlanmasında, ÇBT ve klamidospore oluşturma özelliği, mısır unlu agar morfolojisi, çeşitli karbonhidratları fermente ve asimile etme özelliklerinden ve moleküler yöntemlerden yararlanır<sup>(13)</sup>. Yalnızca *C. albicans* tarafından salgılanan β-galaktozamidaz ve L-prolin aminopeptidaz enzimlerinin araştırılması gibi hızlı testler olsa da laboratuvarlarda *C. albicans* ön tanısında en sık kullanılan hızlı test ÇBT'dir<sup>(14)</sup>. ÇBT hızlı bir test olmasına rağmen, pasaj sonrası oluşan kolonilerden yapıldığı için en erken 24 saatte sonuç verilir. Bu süreyi azaltmak adına, pozitif üreme sinyali veren, Gram boyama yöntemiyle maya görülen kan kültürü şişelerinden direkt olarak yaptığımız ÇBT'nin duyarlılığını %94, özgüllüğünü %100 olarak bulduk. Terlecka ve ark.<sup>(15)</sup> Gram boyama yöntemiyle maya görülen, 31 BacT/Alert pozitif kan kültürü şişesinden yaptıkları

çalışmada, direkt ÇBT ve geleneksel ÇBT arasındaki uyumun %100, direkt ÇBT testinin duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla %92,3 ve %100 olduğunu bildirmektedir. Sheppard ve ark.<sup>(6)</sup> Gram boyama yöntemiyle maya görülen, 67 BacT/Alert pozitif kan kültürü şişesinden yaptıkları çalışmada, direkt ÇBT'nin duyarlılığını %87,1, özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlardır.

Sonuç olarak, direkt ÇBT'nin, geleneksel ÇBT kadar duyarlı olmasa da, kan kültürlerinden elde edilen *C. albicans* türlerinin hızlı ön tanısında güvenilir bir test olduğu ve erken antifungal ajan seçimine katkıda bulunabileceği düşüncesine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20:485-506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.004> PMID:16984866
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3254-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.9.3254-3259.2001> PMID:11526159 PMCID:88327
3. Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64:402-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.002> PMID:19446982
4. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida bloodstream* isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3435-42. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01283-12> PMID:22875889 PMCID:3486211
5. Pemán J, Cantón E, Quindós G, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1181-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks019> PMID:22351683
6. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3508-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01113-08> PMID:18685004 PMCID:2566088
7. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Ellen JB, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC:ASM press, 2003:1693-1711.
8. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52:197-205. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x> PMID:19391253
9. 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. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.81794> PMID:21654115
10. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive

- blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3640-5.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005>  
PMid:16127033 PMCID:1195428
11. **Ener B.** Candida enfeksiyonları Türkiye’de mantar epidemiyolojisi: İzolatların klinik önemi. I. Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı; 12-16 Kasım 2011; Antalya: Türkiye 2011. Sayfa 104-8.
  12. **Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M.** Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among Candida bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* 2011; 49:561-6.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01398-10>  
PMid:21068282 PMCID:3020436
  13. **Kiraz N.** Candida türlerinin makroskopik görüntüleri, identifikasyonunda çimlenme borusu testi ve mısır unu tween 80 agardaki lam kültürü. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi öncesi kursları, Mikoloji Laboratuvarında Tanımlama Kursu Kitabı; 2-3 Kasım 2012; İzmir: Türkiye 2012. Sayfa 22-7.
  14. **Ener B.** Candida türlerinin identifikasyonunda fermentasyon-asimilasyon testleri ve otomatize sistemler. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi öncesi kursları, Mikoloji Laboratuvarında Tanımlama Kursu Kitabı; 2-3 Kasım 2012; İzmir: Türkiye 2012. Sayfa 29-32.
  15. **Terlecka JA, du Cros PA, Orla Morrissey C, Spelman D.** Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-albicans species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. *Mycoses* 2007; 50:48-51.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01307.x>  
PMid:17302748