

Rutin Laboratuvarda *Candida albicans* Tanısı Almış İzolatlarda Üç Farklı Yöntemle *Candida dubliniensis* Araştırılması(*)

Nuran ESEN(**), Aylın ŞENGÖNÜL(**) , Nuran YULUĞ(**)

(*) 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (8-13 Ekim 2000, Antalya) sunulmuştur.

(**) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Son yıllarda tanımlanan *Candida dubliniensis*, önceleri sadece HIV (+) olguların ve özellikle ağız boşluğundan izole edilmiş olsa da daha sonra HIV (-) olgular ve çeşitli klinik örneklerden de soyutlanmıştır. *C. dubliniensis*'i, germ tüp ve klamidospore oluşturması yanında birçok fenotipik özellikleri de paylaştığı için *Candida albicans*'tan ayırmak oldukça güçtür. En güvenilir çalışmalar olan moleküler teknikler ise henüz birçok rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanmamaktadır. Çalışmamızda, daha önce çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *C. albicans* olarak tanımlanıp stoklanan 195 izolata 3 farklı yöntem uygulanarak *C. dubliniensis* araştırılması planlandı. İlk yöntemde, iki ayrı Sabouraud Dextrose Agar (SDA) içeren plaklara pasajlanan izolatlar 48 saat süreyle 37°C ve 45°C'de inkübe edildikten sonra üremeleri değerlendirildi. İkinci yöntemde, metil mavisi içeren SDA'ya pasajlanan izolatlar 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra oluşan kolonilerin UV lamba altında floresans verme özellikleri araştırıldı. Üçüncü yöntemde ise CHROMagar Candida (CAC) besiyerine ekilip 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra oluşan kolonilerin renkleri belirlendi. Literatüre uygun olarak yapılan ve değerlendirilen çalışmalar sonucunda sırasıyla 1., 2. ve 3. yöntemlere göre, izolatların %85.6'sı, %15.9'u ve %14.3'ü *C. dubliniensis* olarak belirlendi. Üç yöntem karşılaştırıldığında; metil mavili SDA'da floresans verme ve CAC besiyerinde üreyen kolonilerin renkleri arasında %94.4, metil mavili SDA'da floresans verme ile 45°C'de üreyebilme arasında %29.2 ve CAC besiyerinde üreyen kolonilerin renkleri ile 45°C'de üreyebilme arasında %27.7 uyum saptandı. *C. dubliniensis* izolatlarının *C. albicans* izolatlarından ayırt edilmesinde ucuz, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay olması nedeniyle metil mavili SDA yönteminin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılması önerilebilir; ancak sonuçlar moleküler yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Anahtar Kelimeler : *Candida dubliniensis*, *Candida albicans*, 45°C'de üreme, Metil Mavili Sabouraud Dextrose Agar, CHROMagar Candida

SUMMARY

The Evaluation of Three Methods to Determine *Candida dubliniensis* in Isolates Previously Described as *Candida albicans* in Routine Laboratory

Although first associated with oral candidiasis in HIV-infected patients, *Candida dubliniensis*, one of the recently identified pathogens has also been recovered from various specimens from different anatomical sites in HIV-negative individuals. However since *C. dubliniensis* also produces germ tubes and chlamyospores and shares the phenotypic characteristics with *Candida albicans*, it is really difficult to differentiate them from each other. Although molecular tests are reliable but they are not yet used routinely by many clinical microbiology laboratories. In this study we evaluated 195 isolates which were previously identified as *C. albicans*, with three different methods according to previously published studies to find out *C. dubliniensis*. By using the first method; after incubation at 37°C and 45°C all of the isolates which were inoculated into two separate Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plates were evaluated for growth. The isolates were inoculated into methyl blue included SDA for the second method and CHROMagar Candida (CAC) for the third method. After incubating for 48 hours; methyl blue included SDA were evaluated under UV lamp for detecting fluorescence of the colonies, and CAC were evaluated according to the color of the colonies. According to the method 1, 2, and 3, 85.6%, 15.9%, and 14.3% of the isolates were identified as *C. dubliniensis* respectively. The agreement rates of the fluorescence detection in methylblue SDA and the color development in CAC were 94.4%, the ability to growth at 45°C and the detection of the fluorescence were 29.2%, and the ability to growth at 45°C and the color development in CAC were 27.7%. Differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans* isolates according to the detection of fluorescence of the colonies which were inoculated into methyl blue SDA is low cost, easy to prepare and evaluate and it could be recommended to use routinely by clinical microbiology laboratory but results must be confirmed by molecular techniques

Key Words: *Candida dubliniensis*, *Candida albicans*, growth at 45 °C, Methyl Blue Sabouraud Dextrose Agar, CHROMagar Candida

GİRİŞ

İlk kez 1995’de Sullivan ve arkadaşları (1) tarafından ayrı bir tür olarak tanımlanan *Candida dubliniensis*, sıklıkla ağız boşluğundan izole edilmiş ve HIV (+) olgularda görülmüştür. Bununla beraber diğer vücut bölgelerinden de soyutlandığı bildirilmiştir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *C. albicans*’ın belirlenmesinde rutin olarak kullanılan germ tüp testinin pozitif olması ve mısırunlu Tween 80 agarda klamidospore oluşturması nedeniyle *C. dubliniensis*’i ayırtmak oldukça güçtür. Özellikle azol grubu antifungallere *C. albicans* izolatlarından daha sık direnç geliştirmesi nedeniyle *C. dubliniensis* izolatlarının tanımlanması gerekmektedir (2). Seçilecek yöntemlerin, uygulamasının kolay ve değerlendirmesinin objektif ve ekonomik olması gereklidir. Kesin identifikasyonun yapılabildiği moleküler tekniklerin ise rutin laboratuvarında uygulanması oldukça zor ve pahalıdır; ancak doğrulama deneyi olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla daha önce biyokimyasal testlerle *C. albicans* olarak tanımlanıp stoklanan 195 izolata üç farklı yöntem uygulayarak *C. dubliniensis* varlığının araştırılması ve yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılması planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Daha önce ağız, boğaz, dil, safra, balgam, vajina, endoserviks, üretra, apse, yara, BOS, kan, kemik iliği, kateter ucu, idrar, dışkı gibi çeşitli klinik örneklerden izole edildikten sonra *C. albicans* olarak tanımlanıp stoklanan 200 izolat SDA besiyerinde üretilmiştir. Tüm izolatlar germ tüp testi uygulanmıştır ve mısırunlu tween 80 agara pasaj yapılmıştır. Germ tüp testi negatif bulunan ve mısırunlu tween 80 agarda klamidospore oluşturmayan beş izolat çalışma dışı bırakılırken, çalışma grubunu test sonuçları pozitif olarak değerlendirilen 195 izolat ve *C. albicans* ATCC 90028 suşu oluşturmuştur. Çalışma grubundaki izolatların tümüne 45°C üreme, %0.01 metil mavili SDA (MM SDA)’da üreme Chromagar Candida (CAC) yöntemleri iki kez uygulanmıştır.

İki uygulama sonuçları farklı bulunan izolatlar üçüncü kez çalışıldı ve iki kez aynı bulunan sonuç değerlendirmeye alınmıştır.

1. 45°C üreme yöntemi: Tüm izolatlardan iki ayrı Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid) içeren plaklara pasaj yapılmıştır. Plaklardan biri 37°C, diğeri ise 45°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra her iki inkübasyon ısısında da üreme olanlar *C. albicans*, 37°C’de üreme olup 45 °C’de üreme saptanmayanlar ise *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir (3).

2. MM SDA yöntemi: Tüm izolatlar %0.1 metil mavisi (CI: 42780) (Sigma) içeren SDA besiyerine pasaj yapılmıştır. 35-37°C’de 48 saat inkübe edilip üremeleri belirlendikten sonra UV lamba altında floresans verme özellikleri araştırılmıştır. Floresans veren izolatlar *C. albicans*, vermeyenler ise *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir (4,5).

3. CAC yöntemi: Tüm izolatlar CHROMagar Candida (CHROMagar) besiyerine pasaj alınıp 35-37°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan kolonilerin renkleri incelenmiştir. Açık yeşil ve pembe tonları *C. albicans*, koyu yeşil ve tonları ise *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir (6).

İstatistiksel Analiz: Üç yöntemin sonuçlarına da SPSS 10.0 programından yararlanılarak, McNemar testi uygulandı ve yöntemlerin ikişer olarak birbiriyle uyumlarındaki p değerleri belirlenmiştir.

BULGULAR

1. 45°C üreme yöntemi: SDA besiyerine pasajlanıp 37°C’de inkübe edilen izolatların tümünde, 45°C’de inkübe edilenlerden ise sadece 28’inde iyi üreme belirlenmiştir. 45°C’de inkübe edilenlerden 167’sinde ise üreme saptanmamıştır. Bu sonuçlar ile izolatların % 85.6’sı *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir (Tablo1).

2. MM SDA yöntemi: Metil mavili SDA’ya pasajlanan suşların 164’ü UV ile floresans verirken 31’inde floresans belirlenmemiştir. Bu

Tablo 1: Uygulanan yöntemler ve değerlendirme kriterlerine göre *C. dubliniensis* olarak saptanan izolatların sayısı ve yüzdeleri

	45°C'de üremen (%)	MM SDA n (%)	CAC n (%)
<i>C. dubliniensis</i>	167 (85.6)	31 (15.9)	28 (14.4)

Tablo 2: Yöntemlerin % uyumlulukları ve p değerleri

	Uyumluluk	p değerleri*
45°C'de üreme - MM SDA	%9.2	<0.001
45°C'de üreme - CAC	%7.7	<0.001
MM SDA – CAC	%94.4	>0.5

*McNemar testi ile belirlendi

sonuçlar ile izolatların % 15.9'u *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir. (Tablo1).

3. CAC yöntemi: CHROMagar Candida besiyerine pasajlanan suşların oluşturduğu kolonilerden 167'sinin açık yeşil, 28'inin ise koyu yeşil rengin çeşitli tonlarında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile izolatların %14.4'ü *C. dubliniensis* olarak değerlendirilmiştir (Tablo1). İstatiksel analiz sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir (Tablo 2).

TARTIŞMA

Son yıllarda tanımlanan *Candida dubliniensis*, germ tüp pozitifliği, klamidospore oluşturması ve diğer birçok fenotipik özellikleri paylaştığı için *C. albicans*'tan ayırt etmek güçtür. En güvenilir çalışmalar olan moleküler tekniklerin ise rutin mikoloji laboratuvarlarında uygulama zorlukları vardır ; ancak altın standart oldukları bilinmektedir.

Pinjon ve ark. (3) 120 *C. dubliniensis* ve 98 *C. albicans* izolatıyla yaptıkları çalışmalarında SDA besiyerlerini 37, 42 ve 45°C olmak üzere üç farklı ısıda inkübe etmişler ve *C. dubliniensis* - *C. albicans* ayırımında en uygun ısının 45°C olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu yöntemle izolatlardan %85.6'sının *C. dubliniensis* olarak tanımlanması beklenenin çok üzerindedir. İzolatlarımızda b-glikozidaz testi ve moleküler

yöntemlerle doğrulama yapılmasını planlamaktayız.

Odds ve ark (7) çeşitli *Candida* izolatlarını üç ayrı CHROMagar *Candida* besiyerine ekerek 25, 30 ve 37°C olmak üzere farklı ısılarda inkübe etmişler ve tüm plaklarda üreyen koloniler ve renklerini 1. 2. ve 3. gün sonunda değerlendirmişlerdir. 25 °C'de *C. dubliniensis* izolatlarının 1. gün %95'inin açık yeşil, 2. ve 3. günler ise %100'ünün yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. Bu besiyerinde *C. dubliniensis* için ayırteci olan koyu yeşil veya çok koyu yeşil renkte üreme izolatların hiçbirinde gözlenmemiştir. Bunun yanında 37 °C'de izolatların %95'i 1.gün yeşil, 2.gün koyu yeşil, 3.gün ise çok koyu renkte koloniler oluştururken izolatların %5'inde üreme saptanmamıştır. Özellikle *C. albicans* ve *C. dubliniensis* ayırımında 37°C'de inkübasyonun yeterli olması nedeniyle, çalışmamızda izolatların pasajlandığı CAC besiyerleri sadece bu ısıda inkübe edildi.

Odds ve ark. (8) 1970'den beri stokladıkları mayalarda *C. dubliniensis* varlığının belirlenmesi amacıyla yaptıkları üç basamaklı çalışmada önce CAC besiyerine ekim yapılmış, *C. albicans* için tipik yeşil renkteki kolonilerden farklı olan kolonilerde b-glikozidaz testi çalışılmış ve %18.5'inde sonuç negatif bulunmuştur. Son olarak b-glikozidaz testi negatif izolatların

%9.0'unda Ca3 probe ile yapılan DNA parmakizinde *C. dubliniensis* için karakteristik hibridizasyon patternleri saptanmıştır.

Pincus ve ark. (9) çalışmalarında rutin laboratuvarında *C. dubliniensis* varlığının belirlenmesinde kolay ve hızlı yöntemlerin uygulanmasını önermişlerdir. Karşılaştırdıkları ticari sistemlerden API 20C AUX ve ID 32 C sistemlerinde veritabanı değişikliği ile daha güvenilir sonuçlar verilebileceğini bildirmişler. RapID Yeast Plus sisteminde *C. dubliniensis*'i ayırd etmek için optimal substrat bulunmamasına karşın yapılacak ek testlerle *C. dubliniensis*'i tür seviyesine kadar tanımlama potansiyeli olduğunu savunmuşlardır. Cardenes ve ark. (10) ise *C. albicans*'ı diğer *Candida* türlerinden ayırtetmek amacıyla ticari olarak satılan Albicans ID2 besiyerinin *C. albicans*-*C. dubliniensis* ayırımında yetersiz kaldığını bildirmişlerdir.

Cryptococcus neoformans'ın saptanmasında rutin olarak kullanılan Staib agarı *C. dubliniensis* ile *C. albicans*'ın ayırımında ilk olarak Staib ve ark (11) denemiş, koloni morfolojilerinde farklılık belirlemişlerdir. Mosaid ve ark. (12) ise bu amaçla hem Staib hem de Kafeik Asit-Ferrik Sitrat (KA-FS) Agarları kullanmışlardır.*C. dubliniensis* suşlarının %76.9'u Staib Agar'da 72 saatte, %80'i ise Kafeik Asit-Ferrik Sitrat Agar'da 120 saatte klamidospore oluştururken *C. albicans* izolatlarının tamamında negatif sonuç elde etmişlerdir. Gerek Staib, gerekse KA-FS agarları ile sonuç alma süresi çalışmamızda kullanılan yöntemlerle karşılaştırıldığında daha uzundur. Aynı çalışmada tüm izolatların Staib agar'da oluşturdukları koloni morfolojileri incelenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

Schoofs ve ark. (6) çalışmalarında CAC ve MM SDA besiyerlerinde *C. dubliniensis* olarak tanımlanan izolatların dikkate alınıp incelenmesini önermişlerdir.

C. dubliniensis, fenotipik benzerliği nedeniyle *C. albicans*'dan oldukça güç ayırt edilmektedir. *C. dubliniensis*'e bağlı infeksiyonlarda flukonazol

tedavisi sonrası ortaya çıkan direnç, tedavide güçlükler neden olmaktadır (2). *C. dubliniensis* - *C. albicans* ayırımında altın standart olan moleküler yöntemler pahalı ve zahmetli olmaları nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanamamakta; hızlı, kolay, ucuz ve doğru sonuç veren testlere gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamız verileri, % 0.01 metil mavisi içeren SDA besiyerinin ticari olarak satılan CAC besiyeri ile % 94.4 oranında uyumlu sonuç verdiğini göstermektedir (Tablo 2). Metil mavili SDA besiyerinin, hazırlanması kolay, değerlendirilmesi objektif ve ekonomik olması nedeniyle *C. dubliniensis*'in *C. albicans*'tan ayırt edilmesi için uygun olduğunu ve rutin laboratuvarında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507 (1995).
2. Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1695(2002).
3. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 36: 2093 (1998).
4. Sullivan D, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 36: 329 (1998).
5. Goldschmidt MC, Fung DYC, Grant R, White J, Brown T. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 29: 1095-9 (1991).
6. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:296 (1997).
7. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38: 147(2000).
8. Odds FC, Nuffel LV, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin*

Microbiol 36: 2869 (1998).

9. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification system. *J Clin Microbiol* 37: 2533(1999).

10. Cardenes CD, Carillo AJ, Arias A et al. Comparison of Alicans ID (R) agar plate with the germ tube for presumptive identification of *C.albicans*. *Diagn Microbiol*

Infect Dis 42: 181 (2002).

11. Staib F, Arasteh K. Chlamydospor formation on Staib agar. Observation made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 44:23 (2001).

12. Mosaid AA, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. *J Clin Microbiol* 39: 323 (2001).