

ÇEŞİTLİ BESİYERLERİNDE CANDIDA TÜRLERİNİN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

THE EVALUATION OF THE MORPHOLOGY OF CANDIDA SPECIES ON DIFFERENT AGAR PLATES

Ayşe SEYER, Melek YAMAN, Israa KHALİL, Gülşah BİTER,
Burçe YALÇIN, Ayşe KALKANCI, Semra KUŞTİMUR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

İletişim / Correspondence:

Ayşe KALKANCI

Emek Mah. 75 sok. 29/11 06510 Ankara

E-mail: kalkanci@gazi.edu.tr

aysekalkanci@email.com

Bu çalışma XXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (21-25 Ekim 2008, Bodrum) sunulmuştur.

ÖZET

Candida cinsi mayalar klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen mantarlardır. *Candida* cinsi içinde yer alan türler arasında, antifungal tedaviye cevabın farklılık göstermesi nedeniyle, *Candida* türlerinin tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Tür tanımının hızlı yapılabilmesi için, kullanılan besiyerlerindeki maya morfolojilerinden yararlanılması amacıyla, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Eosin Metilen Blue (EMB) agar, Mısır unu-Tween 80 agar, Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Mueller Hinton Agar (MHA) plakları kullanılmıştır. Plaklara daha önce tür tanımı yapılmış 20 klinik köken ve üç referans köken ekilmiştir. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida rugosa* türlerinin oluşturdukları kolonilerin mikroskopik morfolojileri incelenmiştir. Her besiyerindeki koloni mikroskopta fotoğraflanmıştır. *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. rugosa* türlerinin tür tanımı yapılmasına yeterli, belirgin morfolojik özellikleri olduğu, ancak diğer türler için tipik özellikler bulunmadığı saptanamamıştır. MHA plaklarının maya morfolojisinin kolaylıkla değerlendirilmesine olanak sağladığı gösterilmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan besiyerlerinde *Candida* türlerinin tür düzeyinde tanımlanmalarına yardımcı olabilecek mikroskopik özelliklerin izlenebildiği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Candida*, mikroskopi, tür ayırımı, EMB, kanlı agar, MHA

SUMMARY

Candida genus are most frequently isolated yeasts in the clinical microbiology laboratories. Species identification is very important in the genus because different *Candida* species have variable antifungal susceptibility patterns. In this study, Sabouraud dextrose agar, Eosin Metilen Blue agar, Corn Meal- Tween 80 agar, Potato Dextrose agar and Mueller Hinton agar plates were compared for the determination of species specific morphology on agar plates. Twenty clinical strains and three reference strains were inoculated into agar plates. Microscopic morphology of the colonies of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida rugosa* species were investigated. All the colonies were documented visually. Differentiative and morphologically typical colonies were detected in *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. rugosa* species, while other species has no typical morphological features. It was demonstrated that MHA plates could be easily visualized for colony morphology. Typical colony morphologies of some *Candida* species were detected on routine media which is widely used in microbiology laboratories.

Key Words: *Candida*, microscopy, species identification, EMB, blood agar, MHA

GİRİŞ

Mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen örneklerden başta *Candida* türleri olmak üzere, diğer maya mantarları ve küf mantarları sıklıkla izole edilmektedir. Üreyen mantarın cins ve tür tanımı yapılabilmesi için fenotipik yöntemlerden ve son yıllarda genotipik yöntemlerden yararlanılmaktadır (1). Kromojenik besiyerlerinde her *Candida* türü farklı renkte koloni oluşturur, buna göre tür tanımı yapılması için CHROMagar *Candida* ve Biggy Agar gibi ticari besiyerleri geliştirilmiştir (1,2,3). Çimlenme borusu veya germ tüpü oluşturma, *Candida albicans* için temel tanımlama özelliğidir. *C. albicans* ve ona yakın türler olan *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özelliklerine göre tanımlanırlar. *Candida albicans* yalancı hif üzerinde tek bir klamidospore oluştururken, *C. dubliniensis* klamidospore demetleri ile ayırt edilir (4). Klamidospore oluşturmeyen diğer mayalar mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özelliklerine bakılarak tanımlanabilir. Mısır unu-tween 80 agar dışında Eosin Metilen Blue (EMB) agar ve Mueller Hinton Agar (MHA) mayaların klamidospore oluşturmaları için kullanılmıştır (5).

Bu çalışmanın amacı, farklı besiyerlerinde *Candida* türlerinin koloni morfolojilerini ve mikroskopik özelliklerini incelemek ve tür tanımı yapılmasında kullanılabilecek özelliklerin olup olmadığını belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik örneklerden izole edilen ve çimlenme borusu oluşturma özelliklerine, mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özelliklerine ve karbonhidrat asimilasyonu sonuçlarına göre tür tanımı yapılmış 20 köken ve üç referans köken çalışmaya dahil edilmiştir. Referans kökenler *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 90028, klinik kökenler 4 *Candida albicans*, 3 *Candida tropicalis*, 3 *Candida glabrata*, 2 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida pelliculosa*, 2 *Candida krusei*, 1 *Candida dubliniensis*, 1 *Candida kefyri*, 1 *Candida famata*, 1 *Candida rugosa*'dır. Stok kültüründen Sabouraud Broth'a canlandırma yapılmış olan her bir kökenden, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), EMB agar, Mısır unu-Tween 80 agar, Patates Dekstroz Agar (PDA) ve MHA plaklarına çizgi ekimi yapılmış-

tır. Ekimler her 24 saatte kontrol edilmek üzere, 96 saate kadar 35°C'de bekletilmiştir. Her besiyerindeki koloni morfolojisi ve mikroskopta izlenen morfoloji fotoğraflanmıştır.

BULGULAR

Candida albicans, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyri*, *C. famata*, *C. rugosa* kökenlerinin SDA, EMB agar, Mısır unu-Tween 80 agar, PDA, MHA plaklarında oluşturdıkları morfolojik özellikler değerlendirilmiş ve tür tanımı yapılması için yeterli olan özellikler kayıt edilmiştir. Buna göre, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. rugosa* türlerinin tür tanımı yapılmasına yeterli, belirgin morfolojik özellikleri olduğu belirlenmiştir. Diğer türler için tipik özellikler saptanamamıştır. PDA, SDA ve EMB agar plakları mayaların morfolojik özelliklerinin görülebilmesi için mikroskopta incelendiğinde net görüntüler elde edilememiştir. Mısır unu-tween 80 agar ve MHA plakları maya morfolojisinin kolaylıkla değerlendirilmesine olanak sağlayan şekilde ışığı geçirmiş ve net görüntüler elde edilmiştir. MHA'da *Candida* morfolojik özelliklerinin, mısır unu-tween 80 agardan daha kolay ayırt edildiği, besiyerinin daha şeffaf olması nedeniyle koloni morfolojisinin ve mikroskopik morfolojinin daha kolay değerlendirildiği görülmüştür. Klamidospore oluşumunun MHA'da kolaylıkla değerlendirildiği görülmüştür. Her köken ve her besiyerinde oluşturduğu koloni morfolojisi fotoğraflanmıştır. Toplam 162 fotoğraf çekilmiştir. Burada bazı fotoğraflar sunulmaktadır.

TARTIŞMA

Düşkün konaklarda gelişen mantar enfeksiyonları ölümcül klinik tablolardır. Son yıllarda kemik iliği nakli, solid organ nakli gibi gelişmiş tıbbi uygulamalar hastaların daha uzun süre nötropenide kalmalarına neden olmaktadır. Tıbbın gelişmesi bir yandan da mantar enfeksiyonlarının artmasına neden olarak ironik bir durum oluşturmaktadır (1,2). Artan mantar enfeksiyonları nedeniyle, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha çok mantar, ve en sık olarak da *Candida* türleri izole edilmektedir. İzole edilen *Candida* türleri fenotipik yöntemler kullanılarak tanımlanabilirler (1). *Candida* türlerinin hızlı tanımlanması ve tedaviye erken başlanması için çok sayıda fenotipik yöntem denenmiştir. Örneğin kan kültür şişelerinden üreyen mayaların Gram boya ile

incelenmesi ile çimlenme borusu oluşturan *C. albicans* ve oluşturmayan *albicans* dışı türlerin birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir (6,7).

Mikroorganizmaların mikroskopik özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanmaları için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan besiyerlerinin neredeyse tamamı denenmiştir. Bu amaçla ilk kez hipertonic besiyerleri kullanılmıştır. Ancak bu şekilde başarılı sonuçlar elde edilememiştir (8). Eski adı ile *Torulopsis glabrata* olarak isimlendirilmiş olan *Candida glabrata* tipik bir morfolojiye sahip olduğu fark edilen ve mikroskopik özelliğine göre tür tanımı yapılabileceği bildirilen ilk *Candida* türlerindedir (9). Eski adı ile *Candida pseudotropicalis*, yeni adı ile *C. kefyr* ve *C. krusei*, *C. parapsilosis* türlerinin tanımlanması için aynı yıllarda karbonhidrat içeren besiyerleri denenmiştir (10).

Kolonilerin makroskopik özelliklerine bakılarak tür tanımı yapılabileceği de bildirilmiştir. Bu amaçla Sabouraud-Triphenyltetrazolium agar kullanılmıştır (11). Pagano-Levin agar besiyeri kullanılarak taranan 15.234 klinik örneğin, % 8'inde birden fazla maya ile enfeksiyon oluştuğu gösterilmiştir (12).

Çalışmamızda daha önce klasik yöntemler ile tür tanımı yapılmış 20 köken ve üç referans köken, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunan besiyerlerine ekilerek her türün morfolojik özellikleri belgelenmiştir. SDA, PDA, EMB agar, Mısır unu-Tween 80 agar, ve MHA plaklarındaki koloniler mikroskop altında incelendiğinde, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. rugosa* türlerinin tipik görüntü oluşturdıkları belirlenmiştir. Diğer türler için tipik özellikler saptanamamıştır. Bu sonuca dayanarak, klinik örneklerden benzer morfolojide maya kolonisi izole edildiğinde, karbonhidrat asimilasyon deneyleri yapılmadan önce hızlı tür tanımı yapılabileceği ve tedavi başlanması yönünde klinisyenin uyarılabileceği görülmektedir. Tipik morfolojik özellik gösteren iki türden *C. krusei* flukonazole primer dirençli bir türdür. *C. glabrata* ise, kökene göre değişmekle birlikte, azollere daha sık direnç geliştiren bir türdür. Son yıllarda *C. rugosa* ile yapılan bazı çalışmalarda antifungallere karşı yüksek minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri elde edildiği bildirilmiştir (13). Bu nedenle, her üç türün erken tanısı tedavinin erken başlatılması açısından çok önemlidir. Bu çalışma ile rutin besiyerlerinde tipik morfolojik özellik gösteren üç türün tanımlanabileceği bildirilmektedir. Çalışmamızda kullanılan besiyerlerden PDA, SDA ve EMB agar plakları ile koloniler incelendiğin-

de net mikroskopik görüntüler elde edilememiştir. Maya morfolojisinin değerlendirilmesi ve klamidospor oluşumunun gösterilmesi amacıyla laboratuvarlarda mısır unu-tween 80 agar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, MHA'da *Candida* morfolojik özelliklerinin, mısır unu-tween 80 agardan daha kolay ayırt edildiği, klamidosporların daha yoğun olduğu, besiyerinin daha şeffaf olması nedeniyle koloni morfolojisinin ve mikroskopik morfolojinin daha kolay değerlendirildiği görülmüştür. Bu sonuç ile, MHA'nın bakteriyoloji laboratuvarları kadar, mikoloji laboratuvarlarında da kullanılabileceği gösterilmiştir.

Candida türlerinin besiyerinde oluşturdıkları koloniden tür tanımı yapılması düşüncesi yeni değildir. Bu amaç ile kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. CHROMagar, Biggy agar, Pal's agar, Albicans ID2 agar bu amaçla kullanılan besiyerleridir (3, 14, 15). Bütün *Candida* türleri içinde en çok birbirine yakın iki tür olması nedeni ile *C. albicans* ve *C. dubliniensis* kolonilerinin morfolojik özelliklerine bakılarak tür ayırımı yapılması düşüncesi yaygınlaşmıştır. Genotipik yöntemler kullanılmayacak ise, CHROMagar, Stab agar (4), Pal's agar (15), Niger seed (16) bu amaçla kullanılmıştır. Klamidospor oluşumunun oda ısısında bekletilen plaklarda daha belirgin olduğu, bu şekilde *C. albicans* ve *C. dubliniensis* tür ayırımının yapılabildiği, bu amaçla EMB agar, nutrient agar, fenol kırmızısı agar kullanılabileceği bildirilmiştir (17). *Candida albicans*'ın çimlenme borusunun 39°C'de daha hızlı olduğu ve bu şekilde tür tanımı yapılabileceği bildirilmiştir (18). MHA daha önce *C. albicans* ve *C. dubliniensis* klamidosporlarının ayırt edilmesinde ve tür tanımı yapılmasında (5), ayrıca disk difüzyon yöntemi ile yapılan flukonazol ve vorikonazol duyarlılık testinin tekrar edilebilirliğinin sağlanmasında başarı ile kullanılmıştır (19,20). EMB agar besiyerinde *C. kefyr* türlerinin metalik yeşil röfle oluşturduğu ve bu özelliğin tür tanımında kullanılabileceği bildirilmiştir (21). *Mycobacteria* türleri için klasik tanıda rutin besiyerlerinden olmayan kanlı agarın kullanımının maliyet etkin bir yöntem olduğu bildirilmiştir (22).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Candida* türlerinin yanlış tanımlanabileceği ve bunu engellemek için otomatize sistemlere bir morfolojik yöntemin eklenmesi gerektiği belirtilmiştir (23,24). Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunabilecek besiyerlerinde, *Candida* türlerinin tür düzeyinde tanımlanmalarına yardımcı olabilecek mikroskopik özellikler izlenebilir. Bu besiyerlerinin kullanılma-

sı laboratuvar çalışanlarının, mikrobiyolojide çok önemli olan, mikroskopkiye hakimiyetini arttıracak ve sadece karbonhidrat asimilasyonuna dayalı tür tanımları yapıldığında oluşabilecek hataları engelleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Freydiere AM, Guinet R, Boirony P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39: 9-33.
2. Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65-84.
3. Yucesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR Candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003; 2: 8.
4. Staib P, Morschhauser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 1999; 42: 521-524.
5. Rimek D, Fehse B, Gopel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 2007; 51: 205-208.
6. Terlecka JA, du Cros PA, Morrissey CO, Spelman D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. *Mycoses* 2006; 50: 48-51.
7. Harrington A, McCourtney K, Nowowiejski D, Limaye A. Differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* yeast directly from blood cultures by Gram stain morphology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 325-329.
8. Rosner R. Comparison of macroscopic, microscopic, and radiometric examinations of clinical blood cultures in hypertonic media. *App Microbiol* 1974; 28: 644-646.
9. Marks MI, O'Toole E. Laboratory identification of *Torulopsis glabrata*: Typical appearance on routine bacteriological media. *App Microbiol* 1970; 19: 184-185.
10. Joshi KR, Bremner DA, Parr DN, Gavin JB. The morphological identification of pathogenic yeasts using carbohydrate media. *J Clin Path* 1975; 28: 18-24.
11. Quindos G, Fernandez-Rodriguez M, Burgos A, Tellaetxe M, Cisterna R, Ponton J. Colony morphotype on Sabouraud-Triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. *J Clin Microbiol* 1992; 10: 2748-2752.
12. Yamanae N, Saitoh Y. Isolation and detection of multiple yeasts from a single clinical sample by use of Pagano-Levin Agar medium. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 276-277.
13. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN; International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 78-83.
14. Ilkit M, Hilmioğlu S, Tasbakan M, Aydemir S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *J Med Microbiol* 2007; 56: 762-765.
15. Raut SH, Varaiya A. Differentiation of *Candida dubliniensis* on chrom agar and Pal's agar. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27:55-58.
16. Lees E, Barton RC. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 13-17.
17. Sancak B, Colakoglu TS, Acikgoz ZC, Arıkan S. Incubation at room temperature may be an independent factor that induces chlamyospore production in *Candida dubliniensis*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 305-309.
18. Kim D, Shin WS, Lee KH, Kim K, Park JY, Koh CM. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. *Yeast* 2002; 19: 957-962.
19. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ. Stability of Mueller-Hinton Agar supplemented with glucose and methylene blue for disk diffusion testing of fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1288-1289.
20. Brown S, Traczewski M. Quality control limits for posaconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 222-223.
21. Munson EL, Troy DR, Weber JK, Messer SA, Pfaller MA. Presumptive identification of *Candida kefyr* on levine formulation of Eosin Methylene Blue Agar. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4281-4284.
22. Drancourt M, Raoult D. Cost-effectiveness of blood agar for isolation of *Mycobacteria*. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1: e83.
23. Kellogg JA, Bankert DA, Chaturvedi V. Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1197-1200.
24. Dooley DP, Beckius ML, Jeffrey BS. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek yeast biochemical card. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2889-2892.