

VAJİNAL ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* SUŞLARININ DAĞILIMI VE CHROMAGAR *CANDIDA* BESİYERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

DISTRIBUTION OF *CANDIDA* SPECIES IN VAGINAL SPECIMENS AND EVALUATION OF CHROMAGAR *CANDIDA* MEDIUM

Berna GÜLTEKİN**, **Vesile YAZICI****, **Neriman AYDIN****

ÖZET: Sık rastlanan ve tekrarlama özelliği nedeni ile uzun süreli tedavi gerektirebilen vulvovajinal kandidozda, etken olan *Candida* türünün bilinmesi tedavinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada vajinal örneklerden izole edilen etkenlerin dağılımının belirlenmesi ve CHROMagar *Candida* kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, laboratuvarımıza klinik olarak vajinit ön tanısı konulmuş 80 hastadan gönderilen örnekler incelenmiş ve CHROMagar *Candida* besiyerinde 35°C'de 48 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler renk ve özellikleri açısından değerlendirilmiştir. *Candida* suşları; germ tüp testi, mısır unu-Tween 80'li agarda üreme şekli ve gerektiğinde API 20C AUX ticari kiti ile tanımlanmıştır. Toplam 80 örnekten 84 *Candida* suşu izole edilmiştir. Örneklerin dördünde (%5) iki ayrı *Candida* türü üremiştir. *Candida* izolatlarının 45'i (%53.6) *C.albicans*, 29'u (%34.5) *C.glabrata*, 7'si (%8.3) *C.krusei*, 3'ü (%3.6) *C.kefyr* olarak tanımlanmıştır. CHROMagar *Candida* besiyerinde *C.albicans* suşlarının tümü ve 7 *C.krusei* suşundan 6'sı doğru olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak, vajinal örneklerden en sık izole edilen türün yine *C.albicans* olduğu ve özellikle sık görülen bazı *Candida* türlerine ait kolonilerin tanımlanmasında ya da aynı kültürde üreyen birden fazla *Candida* türünün ayırt edilmesinde CHROMagar *Candida* besiyerinin yararlı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Vulvovajinal kandidoz, *Candida* türleri, CHROMagar.

ABSTRACT: Identification of *Candida* species is important to guide treatment in vulvovaginal candidiasis which is seen frequently and needs long-term therapy due to recurrence. The aim of this study was to determine the species distribution of *Candida* isolated from vaginal specimens and evaluation of CHROMagar *Candida* medium in the laboratory diagnosis. Samples from 80 patients who were clinically diagnosed as vaginitis have been analysed in our

* Verilerin bir bölümü XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (19-23 Eylül 2004, Kuşadası) poster olarak sunulmuştur.

** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

laboratory. Colonies appeared on CHROMagar *Candida* media after 48 hours of incubation at 35°C were evaluated for their colors and characteristics. *Candida* strains were identified by germ tube test, growth on corn meal Tween 80 agar and when necessary also by API 20 C AUX commercial kit. A total of 84 *Candida* strains were isolated from 80 patients. Two different *Candida* species have been isolated from four (5%) of the samples. Among *Candida* strains isolated, 45 (53.6%) were *C.albicans*, 29 (34.5%) *C.glabrata*, 7 (8.3%) *C.krusei*, and 3 (3.6%) *C.kefyr*. All of the *C.albicans* and six of the seven *C.krusei* isolates have been identified correctly by CHROMagar *Candida* medium. These results showed that *C.albicans* is still the most frequently isolated species from vaginal samples. It was concluded that CHROMagar *Candida* medium is useful for identification of colonies due to frequently seen *Candida* species and also in differentiation of multiple *Candida* species grown on the same culture.

Key words: Vulvovaginal candidiasis, Candida spp, CHROMagar.

G İ R İ Ş

Candida türleri insan deri ve mukoza florasında bulunan organizmalardır. Deri, tırnak ve mukoza tutulumu ile seyreden yüzeysel enfeksiyonların yanı sıra, iç organları tutan derin yerleşimli enfeksiyonlara da neden olabilirler. Yüzeysel kandidozlar arasında yer alan vulvovajinal kandidoz, oldukça sık rastlanan, tekrarlama özelliği bulunan ve cinsel yolla bulaşabilen bir klinik tablodur^{1,2}. Vulvovajinal kandidozda en sık etkenin *Candida albicans* olduğu, bunu *C.glabrata*'nın izlediği belirtilmektedir³. *Candida* türlerinden *C.glabrata*'nın azol grubu antifungallere doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi, *C.krusei* suşlarının ise flukonazole doğal dirençli olması nedeniyle tedavinin belirlenmesinde etken *Candida* türünün bilinmesi önem taşımaktadır⁴.

Candida türleri germ tüp testi, klamidospore oluşumu ve biyokimyasal testlerle tanımlanabilmektedir¹. Tanımlamada kullanılan kromojenik besiyerleri içinde bulunan kromojenik substratların bazı *Candida* türlerinde bulunan enzimlerle parçalanması ile 24-48 saat inkübasyon sonrasında değişik renklerde koloniler oluşmaktadır⁵. Böylece farklı *Candida* türleri farklı renklerde koloniler oluşturmaları ile tanımlanabilmektedir. Kromojenik besiyerleri tüm *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılamamakta; kandidozlarda sıklıkla etken olan *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei* gibi türlerin kendilerine özgü renklerde koloni oluşturduğu belirtilmektedir⁵⁻⁷.

Bu çalışmada vajinal örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının belirlenmesi ve tanımlamada CHROMagar *Candida* kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na Kasım 2003-Temmuz 2004 tarihleri arasında vajinit ön tanılı hastalardan gönderilen örnekler direk mikroskopik olarak incelendikten sonra rutin bakteriyolojik besiyerlerine ve Sabouraud dekstroza (SDA) ekildi.

Serum fizyolojik ile hazırlanan direk preparatta blastospor ve/veya yalancı hif görülen örnekler doğrudan CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) besiyerine ekildi, mikroskopide mantar elemanı görülemediği halde kültürde üreyen maya suşları ise 4-5 farklı koloniye dokundurulan öze ile CHROMagar *Candida* besiyerine pasajlanarak karışık üremeler saptanmaya çalışıldı. CHROMagar *Candida* besiyerlerinde 35°C'de 48 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler üretici firmanın önerilerine göre değerlendirildi. Yeşil renkte koloni oluşturan suşlar *C.albicans*, mavi renkte koloni oluşturanlar *C.tropicalis*, pembe renkte koloni oluşturanlar *C.krusei*, beyazdan pembeye farklı renklerde koloni oluşturanlar diğer *Candida* türleri olarak tanımlandı ve suşlar koloni şekilleri açısından değerlendirildi.

İzole edilen *Candida* suşları germ tüp testi ve mısır unu-Tween 80'li agarda (Oxoid) üreme şekline göre tanımlandı¹, gerektiğinde API 20C AUX (Bio Mérieux) ticari kitinden yararlanıldı. Çalışmada uygulanan testlerin kontrolünde *C.albicans* ATCC 90028 ve *C.krusei* ATCC 6258 standart suşları kullanıldı.

B U L G U L A R

Çalışmamızda, toplam 80 olguya ait vajinal örneklerden 84 *Candida* suşu izole edilmiştir. Örneklerin dördünden (%5) iki ayrı *Candida* türü izole edilmiştir. İzole edilen *Candida*'ların 45'i (%53.6) *C.albicans*, 29'u (%34.5) *C.glabrata*, 7'si (%8.3) *C.krusei*, 3'ü (%3.6) ise *C.kefyr* olarak tanımlanmıştır.

Germ tüp testi *C.albicans* suşlarının tümünde pozitif bulunmuş, yalancı pozitiflik saptanmamıştır. Mısır unu-Tween 80'li agarda *C.albicans* suşlarının 43'ü (%95.6) klamidospore oluşturmuş, yalancı pozitifliğe rastlanmamıştır. *C.albicans* suşlarının 10'unun (%22.2) 48. saatte, 33'ünün (%83.4) ise 72. saatte klamidospore oluşturduğu gözlenmiş, iki suşta klamidospore (%4.4) görülmemiştir.

CHROMagar *Candida* besiyerinde *C.albicans* suşlarının tümü yeşil koloni oluşturmuş (duyarlılık ve özgüllük: %100), *C.krusei* suşlarından 6'sı pembe renkte, basık ve tırtıklı koloniler oluşturmuş, bir *C.krusei* izolatının kolonilerinin açık mor renkli olduğu görülmüştür (duyarlılık: %87.5, özgüllük: %100). *C.glabrata* suşlarının 27'si (%94) mor renkte, biri (%3) pembe renkte, biri (%3) beyaz renkte koloni oluşturmuştur. *C.kefyr* suşlarından ikisi beyaz-krem renkte, biri açık pembe renkte koloni oluşturmuştur.

T A R T I Ş M A

Vajinitler arasında vulvovajinal kandidoz sıklığı bakteriyel vajinozdan sonra ikinci sırada gelmektedir^{8,9}. Normal vajinal florada da bulunabilen *Candida*'lar, vulvovajinal kandidoza neden olabilmektedir¹⁰. Genital kandidozların en sık etkeni *C.albicans* olmakla birlikte, son yıllarda *albicans* dışı türlerin görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir^{11,12}. Bu çalışmada vajinal örneklerden en sık izole edilen türün *C.albicans* (%53.6) olduğu, bunu *C.glabrata*'nın (%34.5) izlediği görülmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda da vaginal örneklerden en sık izole edilen türlerin *C.albicans* (%61.7-85.4) ve *C.glabrata* (%11.2-22.9) olduğu belirtilmektedir¹³⁻¹⁷. *C.glabrata*'nın izolasyon sıklığının oldukça yüksek olması azol

grubundan çoğu antifungale doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi açısından önemlidir^{2,12}. Benzer şekilde, çalışmadaki izolatların %8.3'ünü oluşturan *C.krusei* suşlarında görülen azol direnci bu türün neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır^{18,19}. Çeşitli çalışmalarda vulvovajinitli olgulardan *C.krusei* izolasyon oranı %1.9-8.8 olarak bildirilmiştir^{14,15,17}.

Bu çalışmada CHROMagar *Candida* besiyerinde 45 *C.albicans* suşunun tümü yeşil renkte koloni oluşturarak doğru olarak tanınmış, *C.krusei* suşlarından altısı pembe renkte, basık ve tırtıklı koloni oluşturarak doğru olarak tanınırken, bir *C.krusei* suşunun açık mor renkli koloni oluşturduğu görülmüştür. Çalışmamızda üretici firmanın mavi renkte koloni oluşturduğunu belirttiği *C.tropicalis* izole edilmemiştir. Üretici firmanın koloni rengini belirtmediği mayalardan *C.glabrata* suşlarının 27'si mor, biri pembe ve biri beyaz renkte koloni oluşturmuştur. *C.kefyr* suşlarından ikisi krem, biri ise açık pembe renkte koloni oluşturmuştur. Bu durumda izole edilen 84 suşun %58.3'ünü oluşturan 45 *C.albicans* ve altı *C.krusei* suşu CHROMagar *Candida* besiyerindeki koloni rengi ve şekli ile doğru olarak tanınmıştır.

Yapılan çalışmalarda CHROMagar *Candida* besiyeri ile *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* suşlarının yüksek duyarlılık ve özgüllük oranları ile doğru olarak tanımlanabildiği belirtilmektedir^{5,6,20,21}. Bu çalışmada mısır unu-Tween 80'li agarda klamidospore oluşturmamayan iki (%4.4) *C.albicans* izolatı, CHROMagar *Candida* besiyeri ile doğru olarak tanımlanmıştır. Fotedar ve arkadaşları²², klamidospore oluşturmamayan 45 *C.albicans* suşunun tümünün CHROMagar *Candida* besiyeri ile tanımlandığını belirtmişlerdir. Yapılan çalışmaların bir kısmında^{6,23,24} CHROMagar *Candida* besiyeri ile *C.glabrata*'nın doğru tanımlanabildiği, bazılarında ise diğer maya türleri ile benzer koloniler oluşturduğu için doğru tanımlanamadığı bildirilmektedir^{7,20,25}. Çalışmamızda *C.glabrata* izolatlarının %94'ü mor renkte koloni oluşturmuş, mısır unu-Tween 80'li agarda morfolojik inceleme yapılarak *C.glabrata* olduğu doğrulanan suşlar ek bir teste gerek kalmadan tanınabilmiştir.

Bu çalışmada vajinal örneklerden izole edilmemiş olsa da; fenotipik olarak *C.albicans*'dan ayrımı zor olan *C.dubliniensis* suşlarının CHROMagar *Candida* besiyerinde *C.albicans*'a göre daha koyu yeşil renkte koloniler oluşturmalarının tanımlamada yararlı olduğu belirtilmektedir^{7,26,27}.

Koehler ve arkadaşları⁷, CHROMagar *Candida* ile mısır unu-Tween 80'li agarda morfolojik incelemenin bir arada kullanılması ile alınan sonuçların API maya tanımlama kiti sonuçları ile uyumlu olduğunu, bu şekilde laboratuvarlarında maya izolatlarının %95'inden fazlasını tanımlayabildiklerini bildirmişlerdir. Çalışmacılar, iki yöntemin sonuç verme süresinin benzer olduğunu ve kültür yönteminin daha ucuza mal olduğunu belirtmişler, bunun yanında API 20C AUX'un tanımlayamadığı bazı mayaların morfolojik özellikleri ve CHROMagar *Candida* besiyerinde koloni özellikleri ile tanımlanabileceğini bildirmişlerdir⁷. Benzer şekilde bu çalışmada örneklerden CHROMagar *Candida* besiyerine direk ekim ile *C.albicans* ve *C.krusei* suşları 48 saatte tanımlanabilmiş, kültürden yapılan pasaj sonrası ise tanımlama için 72 saate ihtiyaç duyulmuştur. Kültürde üreyen mayaların API 20C AUX ile tanımlanması için 24 saat maya üremesi, ortalama 48 saat de tanımlama için olmak üzere ortalama 72 saate ihtiyaç vardır. Örnekten CHROMagar *Candida* besiyerine

direk ekim ile mayaların tanımlanmasında zaman kazanmak mümkündür^{5,28}. Çalışmamızda CHROMagar *Candida* besiyerinin maliyeti göze alınarak her örnek bu besiyerine ekilmemiştir. Direk mikroskopik incelemede spor ve/veya yalancı hif görülen 33 örnek CHROMagar *Candida* besiyerine direk ekilmiş, direk mikroskopisinde spor görülemediği halde SDA'da üreyen maya suşları ise (47 örnek) CHROMagar *Candida* besiyerine sonradan pasajlanmıştır.

Vajinal örneklerin dördünde iki ayrı tür *Candida* izole edilmiştir. Üç örnekte *C.albicans* ve *C.glabrata*, bir örnekte *C.albicans* ve *C.kefir* birlikte üremiştir. Bu olguların üçünde CHROMagar *Candida* besiyerine direk örnekten ekim yapılmış ve inkübasyon sonrasında farklı renkli koloniler görülerek tanımlamaya gidilmiştir. Bir örnekte ise SDA'daki kolonilerden CHROMagar *Candida* besiyerine pasaj yapıldığında iki ayrı renkte koloni oluştuğu görülerek tanımlamaya gidilmiştir. CHROMagar *Candida* besiyerine direk örnekten ekim ya da pasaj yapılarak birden fazla maya türü üremesi durumunda farklı renkteki kolonilerin ayırımı yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda da CHROMagar *Candida* besiyeri ile kültürde karışık maya üremelerinin kolaylıkla saptanabildiği belirtilmektedir^{5,6,24,27,29}.

Sonuç olarak, çalışmada vajinal örneklerden en sık *C.albicans* izole edilmiştir. CHROMagar *Candida* besiyerinin özellikle *Candida* türlerinin sık izole edildiği örneklerden direk olarak ya da kültürden tanımlanmasında zaman kazandırması ve karışık kültürlerde üreyen farklı *Candida* türlerinin ayırt edilmesinde yararlı olduğu düşünülmektedir. CHROMagar *Candida* besiyeri ile tanımlayamayan suşların diğer yöntemlerle desteklenmesi gerektiği, laboratuvarında belirlenen tanımlama şemasında yer alabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tümbay E: *Candida* türleri, s. 1081-1086. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Segal E, Elad D: *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*, p. 423-460. In: Collier L, Balows A, Susman M (eds), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 1998, 9th ed. Oxford University Press, New York.
3. Rein MF: Vulvovaginitis and cervicitis, p. 1218-1235. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Pennsylvania.
4. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, et al: Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Clin Infect Dis. 2000, 30: 662-678.
5. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y: Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. J Clin Microbiol 1996, 34: 454-456.
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. 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.
8. Quan M: Vaginitis: Meeting the clinical challenge. Clinical Cornerstone 2000, 3: 36-47.
9. Landers DV, Wiesenfeld HC, Heine RP, Krohn MA, Hillier SL: Predictive value of the clinical diagnosis of lower genital tract infection in women. Am J Obstet Gynecol 2004, 190: 1004-1010.

10. Ferrer J: Vaginal candidosis: Epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet* 2000, 71: 21-27.
11. Spinillo A, Pizzoli G, Colonna L, Nicola S, De Seta F, Guaschino S: Epidemiologic characteristics of women with idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 1993, 81: 721-727.
12. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD: *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12: 80-86.
13. Spinillo A, Capuzzo E, Egbe TO, Baltaro F, Nicola S, Piazzi G: *Torulopsis glabrata* vaginitis. *Obstet Gynecol* 1995, 85: 993-998.
14. Arıkan S, Haşçelik G, Günalp A: Hacettepe Üniversitesi hastanelerinde klinik örneklerden izole edilen maya türleri. *İnfeksiyon Derg* 1998, 12: 97-102.
15. Tünger Ö, Özbakkaloğlu B, Ecemiş T, Koyuncu F: Vulvovajinitli kadınlarda maya mantarlarının sıklığı ve türlere göre dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2000, 30: 127-130.
16. del Palacio A, Sanz F, Sanchez-Alor G, et al: Double-blind randomized dose-finding study in acute vulvovaginal candidosis. Comparison of flutrimazole site-release cream (1, 2 and 4%) with placebo site-release vaginal cream. *Mycoses* 2000, 43: 355-365.
17. Corosello S, Spinillo A, Osnengo G, et al: An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 10: 66-72.
18. Berrouane YF, Hollis RJ, Pfaller MA: Strain variation among and antifungal susceptibilities of isolates of *Candida krusei*. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 1856-1858.
19. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG: The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, 48: 153-160.
20. 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.
21. Yucesoy M, Marol S: Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003, 29: 8.
22. Fotadar R, al-Hedaithy SS: Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. *Mycoses* 2003, 46: 96-103.
23. Willinger B, Manafi M: Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 1999, 42: 61-65.
24. 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.
25. Beighton D, Ludford R, Clark DT, et al: Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 3025-3027.
26. Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA Jr, Merz WG, Meiller TF: Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 321-326.
27. Willinger B, Holloworth 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.
28. 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.
29. 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.