

CANDIDA GLABRATA'NIN TANISINDA HIZLI TREHALAZ TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

EVALUATION OF A RAPID TREHALASE TEST FOR THE IDENTIFICATION OF *CANDIDA GLABRATA*

Sevin KIRDAR¹, Berna GÜLTEKİN¹, Gonca EVCİL¹, Aydan ÖZKÜTÜK², Aslı Gamze ŞENER³,
Neriman AYDIN¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.
(sevin.kirdar@gmail.com)

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

ÖZET

Candida türleri lokal enfeksiyonların yanı sıra ölümcül seyredebilen sistemik enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Son yıllarda *Candida albicans* dışı türlerin, özellikle de *Candida glabrata* izolasyon oranının artışı ve flukonazole karşı *C. glabrata* suşlarının doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi, tür tayininin önemini artırmıştır. Bu tip enfeksiyonların tedavisinde, etkenin hızlı ve doğru tanısı uygun antifungalın seçiminde değer taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, *C. glabrata* suşlarının tanısında hızlı trehalaz testinin değerlendirilmesidir. Çalışmaya klinik örneklerden izole edilen toplam 173 *Candida* suşu alınmış ve izolatlar germ tüp testi, mısır unu-tween 80 agardaki görünüşleri ve Mast ID-CHROMagar *Candida* (Mast Diagnostics, İngiltere) besiyerindeki koloni rengi ve morfolojisi ile tanımlanmıştır. *C. albicans* dışı türlerin tanısı, API 20 CAUX (BioMerieux, Fransa) kiti ile de doğrulanmıştır. Buna göre suşların 86 (%50)'sı *C. glabrata*, 48 (%28)'i *C. albicans*, 17 (%10)'si *C. krusei*, 13 (%8)'ü *C. tropicalis*, 5 (%3)'ü *C. parapsilosis*, 3 (%2)'ü *C. kefyr*, ve 1 (%1)'i *C. utilis* olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlarda trehalaz enziminin varlığını araştırılması amacıyla, izolatlar %4 glukoz içeren Sabouraud dekstroza agar besiyerine pasajlanmış ve inkübasyondan sonra bir maya kolonisi 50 µl'lik, %4 trehaloz (ağırlık/hacim) içeren sitrat tampon çözeltisinde 37°C'de 3 saat bekletilerek süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süre sonunda trehalaz enziminin trehalozu parçalaması sonucunda ortaya çıkan glukoz, ticari "idrar glukoz stripleri" (Spinreacta, İspanya) kullanılarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, hızlı trehalaz testi ile *C. glabrata* suşlarının tümü pozitif, bir *C. tropicalis* suşu yalancı pozitif ve diğer tüm izolatlar negatif sonuç vermiştir. Çalışmada trehalaz testinin *C. glabrata*'yı tanımlamadaki duyarlılığı %100, özgülüğü %98.9 olarak tespit edilmiş ve bu testin *C. glabrata*'nın tanısında hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida glabrata*, trehalaz, hızlı test.

* 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases (1-4 April 2006, Nice-France) Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Candida species which cause local infections, may also lead to fatal systemic infections. The increasing incidence of non-albicans *Candida*, especially fluconazole susceptible or resistant dose-dependent *C. glabrata*, increased the importance of rapid and accurate species level identification for *Candida*. Rapid and correct identification of *C. glabrata* is essential for the initiation of the appropriate antifungal therapy. This study was conducted to evaluate the performance of the rapid trehalase test in the diagnosis of *C. glabrata* isolates. A total of 173 *Candida* strains isolated from various clinical specimens and identified according to germ tube test, growth on cornmeal Tween 80 agar and the colony morphologies on Mast-CHROMagar *Candida* medium (Mast Diagnostics, UK), were included to the study. The identification of non-albicans *Candida* species were also confirmed by API 20CAUX (BioMerieux, France) system. Accordingly 86 (50%) of the isolates were identified as *C. glabrata*, 48 (28%) *C. albicans*, 17 (10%) *C. krusei*, 13 (8%) *C. tropicalis*, 5 (3%) *C. parapsilosis*, 3 (2%) *C. kefyr* and 1 (1%) *C. utilis*. In order to detect the presence of trehalase enzyme in *Candida* strains, all isolates were grown on Sabouraud dextrose agar containing 4% glucose and then one yeast colony was emulsified in 50 µl of citrate buffer containing 4% (wt/vol) trehalose for 3 h at 37°C. Presence of glucose which emerged after the action of trehalase on trehalose, was detected by a commercial "urinary glucose detection dipstick" (Spinreacta, Spain). All *C. glabrata* strains yielded positive result by trehalase test. None *C. glabrata* isolates were found negative by trehalase test except for one strain of *C. tropicalis*. In this study, the trehalase test allowed identification of *C. glabrata* with 100% sensitivity and 98.9% specificity. It was concluded that trehalase test is a rapid, cost-effective and simple test that can be used for the accurate identification of *C. glabrata*.

Key words: *Candida glabrata*, trehalase, rapid test.

GİRİŞ

Candida albicans, *Candida* türleri içinde kandidemilerden en sık izole edilen tür olmasına karşın, son yıllarda *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin görülme oranında artış olmuştur^{1,2}. Bu artışın en önemli nedeni, flukonazolün profilaktik ve ampirik olarak kullanımı ile etken dağılımının değişmesidir³. Dünyada ve ülkemizde *Candida glabrata*'nın *C. albicans*'tan sonra 2. sıklıkta izole edilen tür olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır^{4,5}. *C. glabrata*'nın tanımlanması, flukonazole doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi nedeniyle önem taşımaktadır⁶. *C. glabrata* suşlarının mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik görünümü ve API 20C AUX gibi ticari asimilasyon kitleriyle tanımlanması ortalama 48 saati bulmaktadır^{1,5}. *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi türlerin hızlı ayırımını sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri de geliştirilmiştir⁷. *C. glabrata*'nın bu besiyerlerinde üreme şekline göre doğru tanımlanması konusunda farklı sonuçlar bildirilmektedir^{8,9}.

Kandidemilerde erken antifungal tedavi için hızlı tanı testlerine gereksinim duyulmaktadır^{10,11}. *C. glabrata*'nın trehalozu diğer türlerden daha hızlı parçalama özelliğine dayanan testler geliştirilmiştir. Bu testler arasında Peltroche-Llacsahuanga ve arkadaşlarının¹¹ geliştirdiği 3 saat süreli strip test, Piens ve arkadaşlarının¹² tanımladığı bir dakika süreli trehalaz testi ve Freydiere ve arkadaşlarının¹³ geliştirdikleri GLABRATA RTT adı verilen ticari test sayılabilir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* suşlarının tanısında 3 saatte sonuç verebilen hızlı trehalaz testinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ege bölgesindeki 3 hastanede (Aydın Adnan Menderes Üniversite Hastanesi, İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi) çeşitli klinik örneklerden etken olduğu düşünülerek izole edilen toplam 173 *Candida* suşu dahil edildi. İzolatlar germ tüp testi, mısır unu-tween 80 agardaki görünümleri ve Mast ID-CHROMagar *Candida* besiyerindeki (Mast Diagnostics, Merseyside, İngiltere) koloni rengi ve şekli ile tanımlandı. *C.albicans* dışı *Candida* suşlarının tanısı, API 20 CAUX (BioMerieux, Fransa) kiti ile doğrulandı. Suşların 86 (%50)'sı *C.glabrata*, 48 (%28)'i *C.albicans*, 17 (%10)'si *C.krusei*, 13 (%8)'ü *C.tropicalis*, 5 (%3)'i *C.papansilosis*, 3 (%2)'ü *C. keyfr* ve 1 (%1)'i *C.utilis* olarak tanımlandı. Kalite kontrol suşları olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.tropicalis* ATCC 750, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.glabrata* ATCC 90030 suşları kullanıldı.

Tüm izolatlar, %4 glukoz içeren Sabouraud dekstroz agar (SDA Oxoid, ABD) besiyerine pasajlandı ve besiyerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Besiyerindeki *Candida* kolonilerinden, 50 µl %4 trehaloz (Merck, Almanya) içeren sitrat tampon (0.1 M, pH: 5.0) içinde yoğun bir süspansiyon hazırlandı ve 37°C'de 3 saat bekletildi. Bu süre sonunda trehalaz enziminin trehalozu parçalaması sonucunda ortaya çıkan glukoz, ticari "idrar glukoz stripleri" (Spinreacta, İspanya) kullanılarak gösterildi. Bu stripler üzerinde glukoz araştırılan bölüme test süspansiyonundan 10 µl damlatıldı ve 2 dakika içinde renk değişimi olup olmadığı izlendi. Kahverengi-turuncu renk oluşumu glukoz varlığını ve dolayısıyla trehalaz enzim aktivitesini gösterirken, renk değişiminin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi¹¹. Tüm izolatlar ikiye kez çalışıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 86 *C.glabrata* suşunun tümü hızlı trehalaz testi ile pozitif bulunmuş; bir *C.glabrata* suşu ilk çalışmada negatif iken, ikinci tekrarda pozitif sonuç vermiştir. *C.tropicalis* izolatlarının birisinde trehalaz testi pozitif olarak saptanmış ve bu sonuç yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Diğer izolatların tümünden ise negatif sonuç alınmıştır. Bu bulgulara göre hızlı trehalaz testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %98.9 olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

İnvazif *Candida* enfeksiyonlarının hızlı seyretmesi nedeniyle tanısının kısa süre içinde yapılması önem taşımaktadır. Sistemik olarak kullanılan antifungallerden flukonazole karşı *C.glabrata* suşlarının doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi tür tayininin önemini artırmaktadır⁶. Çalışmamızda, izolatların laboratuvar tanısının hızlı yapılabilmesi için geliştirilen yöntemlerden trehalaz testi kullanılmıştır. Test edilen 86 *C.glabrata* suşunun 85'i ilk çalışmada pozitif bulunurken, biri ilk çalışmada negatif, ikinci tekrarda pozitif olarak sonuç vermiştir. Bu durumun ilk testte kullanılan inokulum miktarının yetersiz olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Testin duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olup (sırasıyla; %100 ve %98.9), benzer prensiple yapılan araştırmalarda belirtilen duyarlılık ve özgüllük sonuçları (duyarlılık %96-100, özgüllük %96-100) ile paralellik göstermektedir¹¹⁻¹³.

Hızlı trehalaz aktivitesini temel alan testlerde, en önemli dezavantajlardan biri yalnızca pozitif sonuçların alınabilmesidir⁷⁻⁹. Çalışmamızda yalnızca pozitiflik 5 *C.tropicalis* suşunun birinde saptanmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda, *C.tropicalis* suşlarında yalnızca pozitiflik oranı %1.4-8.8 olarak bildirilmektedir^{10,11,13}. *C.tropicalis* dışında *C.famata* ve *C.lusitaniae* suşlarında da yalnızca pozitiflik görülebilmektedir¹³. Bundan dolayı hızlı trehalaz testi pozitifliğinde, suşun doğrulanması için diğer testlerin eklenmesi gerekli olabilmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından *Candida* suşlarının koloni görünüşleri ve germ tüp testi sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi önerilirken, bazıları trehalaz testi ile birlikte maltoz ya da sukroz asimilasyon testinin uygulanmasının yararlı olacağını öne sürmektedirler^{11,13-15}. Diğer taraftan taniya yardımcı olarak CHROMagar kullanılımasının da hızlı trehalaz testinde yalnızca pozitiflik oranlarını azaltacağı bildirilmektedir¹⁶.

Hızlı trehalaz testinde yalnızca pozitiflik, besiyelerine bağlı olarak değişebilmektedir. *Candida* suşları; kanlı agar, Candida ID, %2 glukozlu SDA (pH 5.6) ve %4 glukozlu SDA (pH 5.6) besiyelerinde üretildiğinde trehalaz testi *C.tropicalis* için sırasıyla %68.5, %77.5, %23.6 ve %8.8 oranlarında yanlış pozitiflikler verebilmektedir^{10,11}. Çalışmamızda *Candida* suşlarının %4 glukozlu SDA'da üretilmesi, *C.tropicalis* izolatlarındaki yanlış pozitiflik oranının düşük bulunmasını sağlamış olabilir.

Sonuç olarak, hızlı trehalaz testinin kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç veren bir yöntem olduğu ve klinik mikoloji laboratuvarlarında *C.glabrata* klinik izolatlarının tanısında kullanılabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 2002, 11th ed. Mosby Inc. Missouri.
2. Fidel P, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C.albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 80-96.
3. Nucci M, Colombo AL. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. Braz J Infect Dis 2002; 6: 124-8.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 133-63.
5. Ergon MC, Yucesoy M. Evaluation of species distribution of yeasts isolated from intensive care units during the four years period. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 309-18.
6. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2000; 30: 662-78.
7. Gültekin B, Yazici V, Aydın N. Distribution of *Candida* species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar *Candida* medium. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 319-24.
8. 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.
9. 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: 4768-70.
10. Willinger B, Wein S, Hirschl MA, Rotter ML, Manafi M. Comparison of a new commercial test, GLABRATA RTT, with a dipstick test for rapid identification of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2005; 43: 499-500.

11. Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lütticken R, Haase G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. J Clin Microbiol 1999; 37: 202-5.
12. Piens MA, Perry JD, Raberin H, Parant F, Freydière AM. Routine use of a one minute trehalase and maltase test for the identification of *Candida glabrata* in four laboratories. J Clin Pathol 2003; 56: 687-9.
13. Freydière AM, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, Monerau F, Vandenesch F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. J Clin Microbiol 2003; 41: 3861-3.
14. Lopez J, Dalle F, Mantelin P, et al. Rapid identification of *C. glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco diagnostic tablets. J Clin Microbiol 2001; 39: 1172-4.
15. Freydière AM, Parant F, Baron F, et al. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. J Clin Microbiol 2002; 40: 3602-5.
16. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol 2007; 103: 2046-55.