

Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşlarının Genotipik ve Fenotipik Olarak Tanımlanması

Phenotypic and Genotypic Identification of *Candida* Strains Isolated as Nosocomial Pathogens

Fatih ŞAHİNER¹, Koray ERGÜNAY², Mustafa ÖZYURT¹, Nurittin ARDIÇ¹, Tuğrul HOŞBUL¹, Tunçer HAZNEDAROĞLU¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

¹ Gulhane Military Medical Academy, Haydarpaşa Training Hospital, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 27.10.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.05.2011

ÖZET

Son 10 yılda *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve tedavide kullanılan antifungallerle ilgili önemli değişiklikler ortaya çıkmıştır. *Candida* türleri günümüzde özellikle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın temel amaçlarından biri enfeksiyon etkeni *Candida* türlerinin hastanemizdeki dağılımını belirleyerek hastane enfeksiyonlarının önlenmesine katkıda bulunmak, diğeri ise *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan geleneksel ve moleküler yöntemlerin etkinliklerini ve pratik uygulanabilirliklerini değerlendirmektir. Çalışmaya, hastanede yatarak tedavi gören 60 (29 erkek, 24 kadın; 7'si çocuk) hastanın çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 77 *Candida* suşu dahil edilmiştir. "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" kriterlerine göre bu izolatların 57 (%74)'si hastane enfeksiyonu (HE) etkeni olarak kabul edilmiştir. HE etkeni olarak en sık saptanan türler, *C.albicans* (22; %38.6), *C.tropicalis* (14; %24.6), *C.parapsilosis* (13; %22.8), *C.glabrata* (7; %12.3) ve *Candida* spp. (1; %1.75) olmuştur. Çalışmamızda *Candida* türlerinin en sık kan dolaşımı (26; %45.6) ve üriner sistem (24; %42.1) enfeksiyonlarından sorumlu olduğu belirlenmiştir. Kan dolaşımı enfeksiyonuna en sık yol açan tür *C.parapsilosis* (10; %38.5), üriner sistem enfeksiyonuna en sık neden olan tür ise *C.albicans* (12; %50) olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, *Candida* türlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan geleneksel fenotipik yöntemlerin [germ tüp oluşumu, mısır unu agarda klamidospore oluşturma, 45°C'de üreme, CHROMagar *Candida* (CAC) besiyerindeki koloni özellikleri, API ID 32C (BioMerieux, Fransa) sistemi ile karbonhidrat asimilasyon özellikleri] ve bazı moleküler tekniklerin [ITS-1, ITS-3 ve ITS-4 primerleri uygulanan polimeraz zincir re-

İletişim (Correspondence): Dr. Fatih Şahiner, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etlik, 06018 Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 304 3481, E-posta (E-mail): sahinermikro@gmail.com

aksiyonu (PCR), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), ITS1-ITS4 ürünlerinin *Msp I* ve *Bln I* restriksiyon enzimleri ile kesildiği PCR-RFLP] avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasında CHROMagar *Candida* besiyeri ve API ID 32C kiti birlikte kullanıldığında moleküler yöntemlerle elde edilen (%100 uyumlu) benzer sonuçlar alınabildiği bulunmuştur. Ayrıca bu yöntemlerin moleküler yöntemlere göre çok daha düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Hastane enfeksiyonu; *Candida*; fenotipik tanımlama; genotipik tanımlama.

ABSTRACT

Over the last decade, there have been important changes in the epidemiology of *Candida* infections and antifungal agents used to treat these infections. In recent years, *Candida* species have emerged as important causes of invasive infections among patients in intensive care units. One of the main goals of this study was to evaluate the molecular epidemiology of infectious *Candida* species isolated in our hospital and accordingly supply data for hospital infection (HI) control. The other aim of this study was to evaluate effectiveness and practical applicability of traditional and molecular methods used to identify *Candida* isolates to the species level. A total of 77 *Candida* strains that were isolated from various clinical specimens of 60 hospitalized patients (29 male, 24 female; 7 were children) were included in the study. Fifty-seven (74%) of those isolates were defined as HI agents according to Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria. The most common *Candida* species identified as agents of HI were *C.albicans* (22; 38.6%), followed by *C.tropicalis* (14; 24.6%), *C.parapsilosis* (13; 22.8%), *C.glabrata* (7; 12.3%) and *Candida* spp. (1; 1.75%). It was determined that bloodstream (26; 45.6%) and urinary tract infections (24; 42.1%) were the most frequently encountered nosocomial infections caused by *Candida* species. In addition it was detected that the most frequent causative agent of bloodstream infections was *C.parapsilosis* (10; 38.5%) and of urinary tract infections was *C.albicans* (12; 50%). The evaluation of advantages and disadvantages of traditional phenotypic methods [germ tube formation, chlamyospore formation in corn meal agar, growth at 45°C, colony characteristics on CHROMagar *Candida* medium, carbohydrate assimilation properties detected by API ID 32C (BioMerieux, France) system] and some molecular techniques [polymerase chain reaction (PCR) by using ITS-1, ITS-3 and ITS-4 primers, PCR-Restriction fragment length polymorphism (RFLP), PCR-RFLP in which ITS1-ITS4 products cut by *Msp I* ve *Bln I* restriction enzymes] for the identification of *Candida* species revealed that CHROMagar *Candida* medium combined with API ID 32C kit yielded the same results (100% compatible) as molecular techniques for the species identification of *Candida* isolates. Since these phenotypic methods were simple and cost effective when compared to molecular techniques, they should be considered in the identification of *Candida* species.

Key words: Hospital infection; *Candida*; phenotypic identification; genotypic identification.

GİRİŞ

Genellikle transplantasyon uygulanan ve immün süpresif ilaçlarla tedavi edilen, nötropenik ve immün yetmezlikli hastalarda daha sık enfeksiyonlara yol açtığı bilinen *Candida* türleri, günümüzde özellikle yoğun bakım ünitesi (YBÜ) hastalarında önemli patojenler durumuna gelmiştir¹. Kandidemiler, tüm hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonları (HKKDE) arasında üçüncü, YBÜ'lerde ise dördüncü sırada yer almaktadır. Bu enfeksiyonların mortalite oranları, modern tanı ve tedavi olanaklarına rağmen %40-60'a ulaşabilmektedir^{1,2}.

Hekimlerin, hastanelerinin baskın florasını oluşturan mikroorganizmalar ile bunların direnç paternlerini, ayrıca klinikler bazında ve zaman içinde bu verilerde oluşan değişimleri bilmeleri etkin ve doğru enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir koşuldur³. Günümüzde, hastane enfeksiyonları (HE)'nin erken saptanabilmesi ve etkenlerin hastalar arasında yayılmasının engellenmesine yönelik gerekli önlemlerin zamanında alınabilmesi için geleneksel yöntemlerin yanında moleküler yöntemlerin kullanılması da önemli bir gereksinim haline gelmiştir.

Bu çalışmada, enfeksiyon etkeni *Candida* türlerinin hastanemizdeki dağılımının belirlenmesi ve izolatların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan geleneksel ve moleküler yöntemlerin etkinlik ve pratik uygulanabilirliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mayıs-Aralık 2007 tarihleri arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatarak tedavi gören yedisi çocuk toplam 60 hastanın (29 erkek, 24 kadın), enfeksiyon şüphesiyle alınan örneklerinden izole edilen 77 *Candida* suşu alındı. Örneklerinde *Candida* izole edilen hastalar takibe alınırken, her yeni üreme HE varlığı yönünden CDC kriterleri⁴ ve klinisyen görüşlerine göre hastanın kliniği ile birlikte ayrıca değerlendirildi. Hastaların benzer klinik örneklerinde aynı türe ait tekrarlayan üremeler olduğunda bunlardan sadece biri istatistiksel değerlendirme ve moleküler tanımlamalara dahil edildi.

Örnekler rutin kullanım besiyerlerine ekilirken, mikroskopik incelemelerinde maya hücreleri görülenler ayrıca Sabouraud dekstroz agar (SDA) (Merck) ve CHROMagar *Candida* (CAC) (BBL, Fransa) besiyerlerine ekildi. Kan örnekleri için BACTEC 9240 (Becton Dickinson, USA) kültür sistemi kullanıldı. Geleneksel yöntemlerle tanımlanan ve tek koloni ekimi ile saflaştırılan tüm suşlar %15 gliserinli buyyon içinde -80°C'de saklandı. Moleküler çalışmalar öncesi bu stoklardan SDA ve uygun sıvı besiyerlerine pasajlar yapılarak suşlar canlandırıldı ve testler uygulandı⁵⁻⁸. Kontrol suşu olarak *C.albicans* ATCC 14053, *C.parapsilosis* ATCC 90018 ve *C.dubliniensis* CBS 7987 kullanıldı.

İzolatların germ tüp ve klamidospore oluşturma, 45°C'de üreme, CAC besiyerindeki koloni özellikleri standart protokollere uygun olarak değerlendirildi^{5,6,9}. Karbonhidrat asimilasyon özellikleri ise API ID 32C (BioMerieux, Fransa) kitiyle üretici firmanın önerilerine göre değerlendirildi. CAC besiyerinde parlak yeşil kolonileri olan, mısır unu agar (MUA)'da klamidospore oluşturan ve germ tüp pozitif olup 45°C'de üreyebilen izolatların tamamı *C.albicans* olarak kabul edildi ve API ID 32C kiti ile tanımlamaya gereksinim duyulmadı. API ID 32C kiti, randomize olarak seçilen üç *C.albicans* izolatu ve albicans-dışı tüm izolatların tür düzeyindeki tanımlanması için kullanıldı.

Stoklardan çoğaltılan mayaların DNA'ları standart fenol-kloroform izoamilalkol metodu ile ekstrakte edildi^{10,11}. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), daha önce tanımlanmış bir yöntem temel alınarak; ITS1 (ileri) 5'-tccgtaggtgaacctgagg-3', ITS3 (ileri) 5'-gcatcgatgagaacgcagc-3' ve ITS4 (ters) 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (Iontek, Türkiye) primerleri ile gerçekleştirildi¹². Reaksiyon 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben

95°C'de 30 saniye, 54°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika olarak 30 döngü ve 72°C'de 7 dakika son döngü şeklinde ısı döngü cihazında (Icycler-BioRad, İtalya) gerçekleştirildi ve amplifikasyon ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülendi. Ek olarak, ITS1-ITS4 ürünleri *Msp* I (SibEnzyme®, Rusya) ve *Bln* I (Roche Diagnostics®, Almanya) restriksiyon enzimleri ile kesildi ve sırasıyla %1.8 ve %2'lik agaroz jellerde yürütülerek UV ışık altında görüntülendi^{10,13}.

BULGULAR

Çalışmanın verileri, aktif süreyans ile toplanan klinik ağırlıklı bulgular (Tablo I) ve izole edilen suşların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerin etkinlik, hız ve maliyetlerinin karşılaştırılması ile elde edilen laboratuvar ağırlıklı bulgular (Tablo II) olmak üzere iki ana bölümde değerlendirilmiştir.

CDC kriterleri ve klinisyen kararlarına göre 77 izolatin 57 (%74)'si HE etkeni olarak belirlenirken, en sık görülen enfeksiyon tipleri sırasıyla kan dolaşımı 26 (%45.6) ve asemptomatik kandidürler de dahil olmak üzere üriner sistem enfeksiyonları 24 (%42.1) olarak saptanmıştır (Tablo I). Altmış hastadan elde edilen 72 klinik örneğin 69 (%95.8)'unda

Tablo I. CDC Kriterlerine Göre Tanımlanan Hastane Enfeksiyonları (HE) ve Tür Dağılımları

	Klinik sınıflandırma	CDC tanımları	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>Candida</i> spp.	Toplam
HE olanlar	Kan dolaşımı ve kateter enfeksiyonları (KDE)	Laboratuvar olarak kanıtlanmış KDE	5	6	10		1	22
		Katetere bağlı KDE (kateter izolatları)	1	1	2			4
		Sekonder KDE	2	2				4
	Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE)	Semptomatik ÜSE	4	1		2		7
		Asemptomatik kandidüri	8	3	1	5		17
Pnömoni	Pnömoni		1				1	
Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu (YDE)	Deri ve YDE		2				2	
	Toplam HE		22	14	13	7	1	57
HE olmayanlar	Kolonizasyon	Solunum yolları kolonizasyonu	6			1		7
		Vasküler kateter kolonizasyonu	3		2			5
		Yara kolonizasyonu	2		1	1		4
	Kontaminasyon	Apse, gastrointestinal sistem kontaminasyonu				1		1
		Oral flora kontaminasyonu	1					1
Yatıştan sonraki ilk 24 saat içinde alınan örnekte üreme		1		1			2	
	Toplam HE olmayan		13	4	3			20
	Tüm klinik örneklerden izole edilen türlerin toplam sayıları		35	14	17	10	1	77

Tablo II. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlere Ait Bazı Özelliklerin Karşılaştırması

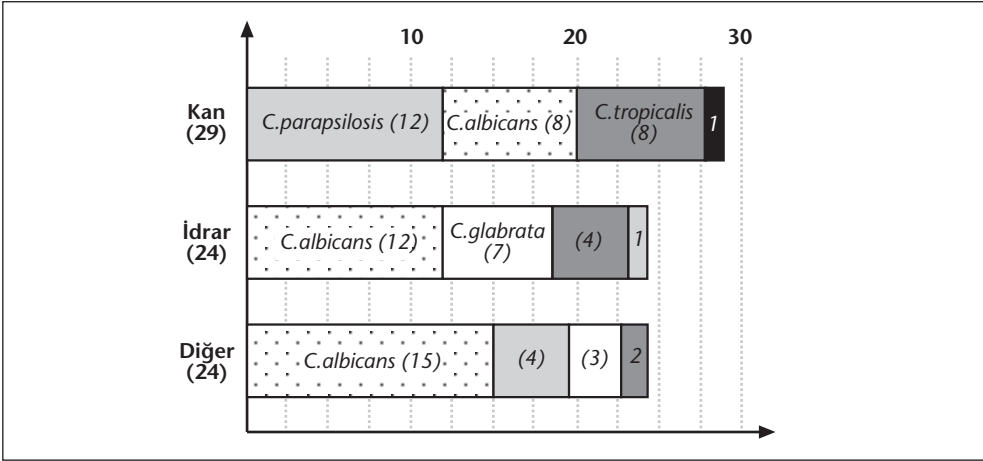
Yöntem	İzolatların tür düzeyinde tanımlanabilme oranı (%)	İlk izolasyon sonrası gereken süre* (saat)	Kan kültürleri için gereken 24-36 saat ek süre ilave edildiğinde (saat)	Yaklaşık test maliyeti (TL)	Uygulama ve değerlendirme zorluk derecesi
Germ tüp	45**	2	26-38	< 0.5	x
Mısır unu agar	58**	48	72-96	< 1	xxx
API ID 32C kiti	96	48	72-96	12	xx
CAC besiyeri	76.6	24-36	48-72	< 1	x
45°C'de üreme	45	48	72-96	< 1	x
PCR	13	24	48-60	35	xxxx
PCR-RFLP	98	27	51-63	40	xxxx
CAC besiyeri ve gerektiğinde ek olarak API ID 32C kiti	98	24-72	48-96	3	x-xx

* Genel besiyerlerinde ilk izolasyon sonrası (algoritmik bir sıra izlenmeden) tür düzeyinde tanımlama için gereken ek süre.
** *C.albicans-C.dubliniensis* tanımlanması için ek yöntemlere ve yanlış negatif sonuçlar için dikkatli değerlendirilmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

tek *Candida* türü izole edilirken, bir kan kültüründe üç (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*), bir yara kültüründe üç (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*) ve bir aspirasyon kateter ucu kültüründe iki farklı tür (*C.albicans*, *C.glabrata*) izole edilmiştir. Tüm izolatların 35 (%45.5)'i *C.albicans*, 17 (%22)'si *C.parapsilosis*, 14 (%18.2)'ü *C.tropicalis*, 10 (%13)'ü *C.glabrata* olarak tanımlanırken, bir tür (%1.3) hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerle eksik (incomplete) olarak (*C.lusitaniae* veya *C.intermedia* şeklinde) tanımlanabilmiştir.

Çalışmamızda etkenlerin çoğu kan ve idrar örneklerinden izole edilirken, kan kültürlerinden albicans-dışı türler daha sık izole edilmiştir (Şekil 1). Üreme saptanan örnekler toplam 15 farklı klinik veya üniteden elde edilirken, bu örneklerin %44 (32/72)'ü Genel Cerrahi ve İç Hastalıkları YBÜ'lerinde yatan hastalara aittir.

MUA'da yalancı hif yapıları ve klamidospor oluşturmayan 10 izolat morfolojik olarak *C.glabrata*, klamidospor oluşturan 35 izolat *C.albicans* veya *C.dubliniensis* şeklinde tanımlanırken, diğer izolatların tür düzeyinde tanısı için MUA tek başına yeterli olmamıştır. CAC besiyeri ile izolatların 35 (%45.5)'i *C.albicans*, 14 (%18.2)'ü *C.tropicalis* ve 10 (%13)'ü *C.glabrata* olarak tanımlanmış, diğer 18 (%23.4) izolat ise CAC'da tür düzeyinde tanımlanamamıştır. *C.dubliniensis* standart suşunun CAC besiyerinde, 24. ve 36. saatlerde *C.albicans* kolonilerinden tam olarak ayırt edilemeyen yeşil renkli parlak koloniler oluşturduğu, inkübasyon süresi uzatıldıkça bunların koyu-yeşil renkte, mat görümlü kolonilere dönüştüğü gözlenirken⁶, hastanemiz izolatları içinde benzer özellik gösteren başka bir suş rastlanmamıştır. Tüm yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen son tanımlamalar stan-

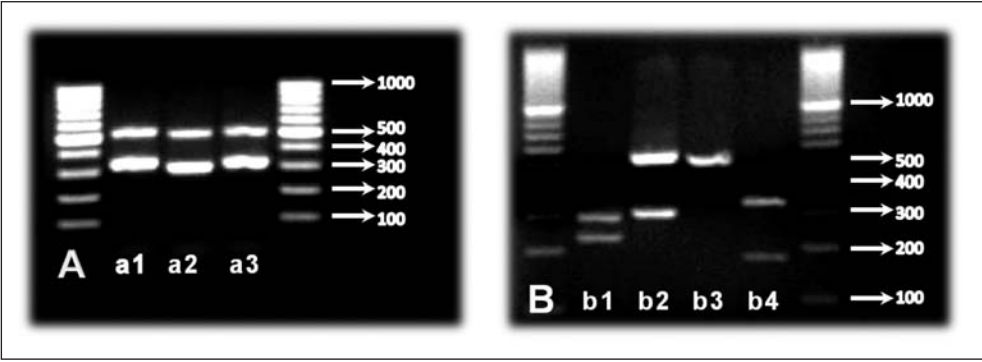


Şekil 1. Klinik örneklerle göre en sık izole edilen *Candida* türleri.

dart olarak kabul edilmek üzere API ID 32C kitinin duyarlılığı; 24. saatte %72.9 (35/48), 48. saatte %95.8 (46/48) ve 72. saatte %87.5 (42/48) olarak saptanmıştır. Bir *Candida* türü API ID 32C kiti ile düşük düzeyde ve eksik olarak *C.intermedia* veya *C.lusitaniae* şeklinde tanımlanabilmıştır. Bu türün dışında API ID 32C testi bir *C.tropicalis* türünü ikinci olasılık olarak tanımlayabilmemiş; 24. ve 72. saatlerde yapılan hatalı değerlendirmelerin birçoğu (%55.5) da yine diğer yöntemlerle *C.tropicalis* olarak tanımlanmıştır.

Çalışma sonunda doğrulama amaçlı test tekrarları yapılmış; kör değerlendirmelerde tek değişken kullanılan hasta serumu olmak üzere, germ tüp oluşturduğu daha önceden saptanmış olan *C.albicans* türlerinin %8.6-14.3 oranları arasında yanlış negatif olarak değerlendirilebileceği saptanmıştır. Yine, daha önce tümünün MUA'da klamidospore oluşturduğu belirlendiği halde bazı *C.albicans* türlerinin kontrol amaçlı yapılan testlerde klamidospore oluşturmadığı gözlenmiştir.

ITS-1, ITS-3 ve ITS-4 primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin büyüklük farklılıklarına göre yapılan tanımlamada ise, *C.glabrata*'nın kolaylıkla tanımlanabildiği ancak izolatların büyük çoğunluğunu (> %85) oluşturan üç *Candida* türünün (*C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*) birbirlerinden tam olarak ayırt edilemediği görülmüştür. Bu üç türün daha kolay ayırt edilebilmesi için daha önce bildirilen bir PCR-RFLP yöntemi¹⁰ uygulanmıştır (Şekil 2). *C.glabrata*'nın amplikonları diğer tüm *Candida* türlerine göre daha büyük olduğundan ikinci bir yöntem gereksinim kalmadan tanımlanmıştır. Çalışmada izole edilen türlerden biri daha önceden tanımlanmış olan paternlere¹² göre *C.lusitaniae* veya *C.intermedia* şeklinde eksik olarak tanımlanabilmıştır. Her iki yöntem de *C.dublinskiensis*, *C.albicans* ayırımını yapamadığı için, bu iki türün birbirinden ayırt edilmesinde *Bln I* (Avr II) enziminin kullanıldığı farklı bir PCR-RFLP yöntemi¹³ uygulanmış ve izolatlarımız arasında *C.dublinskiensis* süşunun olmadığı moleküler yöntemlerle de doğrulanmıştır.



Şekil 2. A. Bazı *Candida* suşlarının türe özgül uzun ve kısa ampliconları. a1: *C.albicans* (yaklaşık 532 ve 339 bp), a2: *C.parapsilosis* (yaklaşık 516 ve 311 bp), a3: *C.tropicalis* (yaklaşık 521 ve 329 bp). B. Uzun ürünlerin *Msp I* ile kesilmesi sonrası oluşan bantlar. b1: *C.albicans* (yaklaşık 238 ve 297 bp), b2: *C.glabrata* (yaklaşık 314 ve 557 bp), b3: *C.parapsilosis* (yaklaşık 516 bp), b4: *C.tropicalis* (yaklaşık 184 ve 340 bp).

TARTIŞMA

Günümüzde invazif fungal enfeksiyonlar için risk altındaki popülasyon giderek artmakta ve buna paralel olarak hastane kökenli fungal enfeksiyonların %80'inden fazlasından sorumlu olan ve HKKDE etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan *Candida* türleri her geçen gün önem kazanmaktadır. Son yıllarda özellikle albicans-dışı *Candida* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlarda dikkat çekici artışlar göze çarpmaktadır^{14,15}. Kandidemilerin %95'inden fazlasında etken olarak beş tür (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*) izole edilmekte, en sık saptanan tür *C.albicans* olmakla birlikte bazı çalışmalarda ilk sırayı *C.parapsilosis* almaktadır¹⁵⁻¹⁷. Kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) etkeni olan *Candida* türlerinin görülme sıklıkları coğrafi bölgelere ve ülkelere göre değişiklik göstermektedir¹⁵⁻¹⁹. Çalışmamızda, *Candida* kaynaklı 26 KDE epizodu tespit edilmiş ve sık görülen etkenler sırasıyla *C.parapsilosis* (%38.5), *C.tropicalis* (%30.8) ve *C.albicans* (%26.9) olarak tanımlanmıştır. Bu durum, tüm dünyada olduğu gibi hastanemizde de albicans-dışı *Candida* türlerinin giderek daha da önem kazanacağını bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Kandidemi tedavisinde tercih edilen flukonazol, *Candida* türlerinin çoğuna karşı etkili olup, yan etkileri görece olarak azdır ve maliyeti düşüktür¹. Ancak flukonazol nadir izole edilen bir tür olan *C.krusei*'ye karşı etkisizken *C.glabrata*'ya karşı da sınırlı etki göstermektedir¹. Eğer bir hastanede kandidemiye neden olan en sık etkenler *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* ise kandidemi tedavisinde flukonazol tercih edilirken, eğer izolatların %15-20'den fazlası *C.glabrata* ise ilk tercihin kaspofungin olması önerilmektedir¹. Kandidemi tedavisi için daha uygun olan ve daha az yan etkiye sahip ekinokandinler, flukonazol grubu ilaçlara göre hala çok pahalı olduğundan birçok hastanede kullanımları kısıtlıdır. Bu nedenle hekimler hastanelerinde kan dolaşımı invazyonuna neden olan en yaygın *Candida* türlerini bilmelidirler. Çalışma süresince *C.glabrata* ve *C.krusei* türlerinin etken olduğu HKKDE saptayamamış olmamızda, HEKK kararları gereği hastanemizde profilaktik flukonazol kullanımının kısıtlanmasının rolü olabilir. Ayrıca bu durum flukona-

zolün hastanemizde kandidemi olgularında ampirik tedavi için iyi bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

Genel Cerrahi YBÜ'de dört *C.parapsilosis* ve İç Hastalıkları YBÜ'de yedi *C.albicans* suşu aynı tarihlerde aynı ünitelerde yatan hastalardan izole edilmiştir. Bunun nedeni, yetersiz koruyucu önlemlere bağlı hastalar arası bulaş olabileceği gibi, benzer risk faktörlerine sahip hastalarda aynı türlerin saptanmış olması da olabilir. Bu olasılıkların açıklanabilmesi için klonal ilişkinin araştırıldığı epidemiyolojik moleküler çalışmalara gereksinim olduğuna düşünmekteyiz.

Kandidemiler sırasında tekrarlayan negatif kan kültürlerine rastlanabileceğinden, kolonizasyonu olan hastalarda invazif kandidiyazis varlığı klinik ile paralel olarak dikkatle araştırılmalıdır. Çalışmamızda takip edilen 30 hastanın çeşitli vücut bölgelerinde kolonizasyonu saptanırken, özellikle üriner sistem ve vasküler kateter ucu kolonizasyonlarının ilerleyen dönemlerde invazif enfeksiyonlara neden olabildiği (sekonder KDE ve katetere bağlı KDE gibi, Tablo I) saptanmış ve HE kontrolünde kültür pozitifliği olan her hastanın aktif olarak takip edilmesinin önemi bir kez daha gösterilmiştir. Vasküler kateter kolonizasyonu olan hastalarda, kateterlerin çıkarılmasıyla mayaların kandan temizlenmesi hızlanmaktadır. Kandidemi ortadan kalkıncaya kadar günlük kan kültürlerinin alınması ve ilk negatif kan kültüründen iki hafta sonraya kadar antifungal tedaviye devam edilmesi önerilmektedir¹.

Candida türlerinin tanımlanmasında en sık ve ilk basamakta kullanılan ve duyarlılığı %95-98 arasında raporlanan germ tüp testi, insan serumunun kullanılması gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir^{7,20,21}. *C.tropicalis* germ tüp benzeri yalancı hifler oluşturabilir; ancak bu yapıların ana hücreden uzadığı noktada daralma göstermesi ayırıcı tanıda yararlıdır^{20,22}. *C.dubliniensis*'in de germ tüp testi pozitif olan diğer bir tür olduğu hatırdta tutulmalıdır²³. Özellikle polimikrobiyal üremenin olduğu durumlarda sadece germ tüp testi ile tanımlamaya gidildiğinde, germ tüp oluşturanların yanında oluşturmayan diğer türler gözden kaçabilir.

Kümeler halinde ikili veya üçlü klamidospore oluşturma özelliği *C.dubliniensis*'te daha sık görülmeyle beraber bu durumun türe özgü olmadığı, bazı *C.albicans* suşlarında da görülebildiği bildirilmiştir²⁴. Zaman alıcı olmasının yanı sıra, çalışmamızda klamidospore saptanmayan durumlarda doğrulama amaçlı yapılan test tekrarlarında klamidospore varlığının görülmesi, yöntemin duyarlılığı konusunda çekinceler oluşturmuştur. Yüksek ısıda üreme özelliği, *C.dubliniensis* ve *C.albicans* türlerinin ayırımında kullanılan diğer bir metod olup, ayırım için en uygun ısının 45°C olduğu bildirilmiştir²⁵. Çalışmamızda bu yöntem ile 35 *C.albicans* ve pozitif kontrol olarak kullanılan bir *C.dubliniensis* suşu doğru olarak tanımlanmıştır. Biyokimyasal özellikleri birbirine benzeyen bu iki türün ayırılmasında ticari kitler de kullanılmakla birlikte bu kitlerin de yetersiz kalabileceği unutulmalıdır²⁶. CAC besiyerinde iki tür için en iyi ayırımın inkübasyon süresinin 72 saate uzatılmasıyla mümkün olabileceği, bu durumun ise tanıda gecikmelere neden olabileceği bildirilmektedir⁶. Tüm bu bilgiler ışığında, *C.albicans*'a göre azollere dirençli olma olasılığı daha yüksek olan *C.dubliniensis* suşlarının tanımlanmasında en güvenilir sonuçların moleküler çalışmalar ile elde edilebileceği ifade edilmektedir¹³.

Kromojenik substrat içeren CAC besiyerinin *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* türlerinin tanımlanmasında duyarlılığı %94-100, özgüllüğü ise %99-100 olarak bildirilmektedir^{8,27}. CAC besiyeri ile *C.glabrata*'yı tanımlamada güvenilir sonuçlar elde ettiklerini bildiren araştırmacılar bulunmakla beraber, bazı araştırmacılar daha az izole edilen bazı türlerin ayırımında güçlükler yaşandığını bildirmişlerdir^{6,27,28}. Çalışmamızda bu besiyeri ile 24-36 saat içinde, *C.albicans* ve *C.tropicalis* izolatlarının tamamı kolaylıkla tanımlanmış; ayrıca 10 (%13) *C.glabrata* suşunun tamamı gerek saf olarak gerekse çoklu üremelerin bir parçası olduğunda zamanla koyu menekşe rengine dönüşen pembe mor kolonileri ile diğer türlerden kolaylıkla ayırt edilebilmiştir⁶. Nadiren izole edilen diğer *Candida* türlerinin çoğu ve *C.parapsilosis* suşları CAC besiyerinde konveks, krem gibi, pembenin çeşitli tonlarından açık mora ve fildişi rengine kadar değişebilen renklerde birbirinden ayırt edilemeyen koloniler oluşturmaktadır⁶. Bu çalışmada, çoğu daha sonra *C.parapsilosis* olarak tanımlanan 18 suş CAC besiyeri ile tür düzeyinde tanımlanamadığından ek yöntemlere gereksinim duyulmuştur.

Çoklu etkene bağlı kandidemi sıklığı %3-10 arasında değişmekte olup, polimikrobiyal enfeksiyonlarda antifungal tedavinin geniş spektrumlu olması hayati önem taşımaktadır²⁷⁻²⁹. CAC besiyeri polimikrobiyal üremeyi erken dönemde saptayabildiğinden bu amaçla tarama testi şeklinde kullanımı kabul görmüştür^{9,27}. CAC besiyeri ile ilgili bulgularımız, tür tanımlamasında *C.albicans* için germ tüp testinden (sırasıyla %100 ve %85.7), *C.tropicalis* için API ID 32C testinden (sırasıyla %100 ve %92.8) daha duyarlı olduğunu ve daha kolay uygulanabildiğini göstermektedir. Ayrıca yöntem, *C.glabrata* ve *C.krusei* tanısında da etkin olarak kullanılabilir. Çalışmamızda kullandığımız PCR temelli yöntemler polimikrobiyal etkenleri saptamada yetersiz kaldığından¹² CAC besiyerinin çoklu üremeleri kolayca saptayabilmesi yöntemin diğer bir avantajı olarak değerlendirilmiştir. Diğer taraftan CAC besiyerinde kolonilerin renk ve morfolojik görünümüne göre tam olarak adlandırılmayan *Candida* türlerinin tanımlanmasında API ID 32C sisteminden yararlanılabileceği düşüncesindeyiz.

Candida türlerinin hızlı tanısı için geliştirilen ticari sistemlerden olan API ID 32C, 60'dan fazla maya türünü güvenilir bir şekilde tanımlayabildiği için çoğu araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Ancak bu ve benzeri yöntemlerin tanıda yetersiz kaldığı durumlar da vardır²⁰. Çalışmamızda, testin duyarlılığı %95.8 olarak bulunurken en iyi sonuçlar 48. saatte elde edilmiş, bu sürenin kısa veya daha uzun olmasının sonuçları olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir.

Günümüzde *Candida* türlerinin hızlı tanısına yönelik PCR temelli yöntemler de geliştirilmiştir³⁰. Fujita ve arkadaşları¹², hem ITS1 hem de ITS2 bölgelerini PCR ile çoğaltarak 30 maya türüne ait 29 farklı patern rapor etmişlerdir. Ancak bu yöntemin *C.albicans* ve *C.dubliniensis* türlerini ayırt edememesi ve karışık florası olan klinik örneklerden mantarların direkt tanısında bazı sorunların olması en önemli dezavantajlar olarak değerlendirilmiştir. PCR ile elde edilen ürünlerin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ya da dizi analizi, tür düzeyinde tanımlama amacıyla kullanılabilir; ancak kesin sonuca iki basamakta ulaşılabilmesi maliyeti daha da artırmaktadır^{10,12,13}.

Sonuç olarak, germ tüp testi erken dönemde sonuç vermesi nedeniyle önemini korumaktadır. Tek başlarına kullanıldıklarında bazı eksik yönleri olan CAC besiyeri ve API ID 32C sistemi, birlikte kullanıldığında moleküler test sonuçları ile %100 uyumlu sonuç vermektedir. Öncelikle CAC besiyeri ve daha sonra (gerekirse) API ID 32C sisteminin kullanılmasıyla maliyet önemli ölçüde azalmaktadır (Tablo II). Bu çalışmada, fenotipik yöntemlerle elde edilen sonuçların doğrulanmasında kullandığımız moleküler yöntemler yüksek maliyetli olup rutinde uygulamaları efektif bulunmamıştır (Tablo II). Hastaların hastanede yatış süresi ve tedavileri sırasında uygulanan tanısıl amaçlı testlerin maliyet-etkinlik durumları dikkate alındığında, moleküler yöntemlerin özellikle epidemiyolojik araştırmalarda ve doğrudan klinik örneklerde etkeni saptayabilen standardize edilmiş yöntemler geliştirildiğinde tercih edilebilir olduklarını düşünmekteyiz. Günümüzde fungal (kandida) enfeksiyonların tanısına yönelik olarak geliştirilen moleküler ticari sistemlerin halen araştırma aşamasında olduğu ve henüz tam anlamı ile standardize edilmemiş oldukları da göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kauffman CA. Fungal Infections. Proc Am Thorac Soc 2006; 3(1): 35-40.
2. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43(Spec No): 65-84.
3. Uzun Ö. Hastane İnfeksiyonları: Tanımlar, s: 35-57. Doğanay M, Ünal S (ed), Hastane İnfeksiyonları. 2003, 1. baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
4. Horan TC, Gaynes RP. Surveillance of nosocomial infections, pp: 1659-702. In: Mayhall CG (ed), Hospital Epidemiology and Infection Control. 2004, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
5. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Laboratory methods in basic mycology, pp: 629-713. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 2007, 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis.
6. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C.albicans*, *C.krusei*, and *C.tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5: 1.
7. Larone DH. Yeast and yeastlike organisms, pp: 61-90. In: Medical Important Fungi. 1995, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
8. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1923-9.
9. Otağ F, Aslan G, Şen S, Emekdaş G. Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar Candida besiyerinin kullanımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36(4): 200-4.
10. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Jpn J Med Mycol 2006; 47(3): 225-9.
11. Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. Jpn J Infect Dis 2002; 55: 122-5.
12. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3617-22.
13. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis 2005; 58(4): 235-7.
14. Akalin H. Nozokomiyal *Candida* İnfeksiyonları, s: 67-9. Özsüt H (ed), Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabı. 24-25 Mart 2007, İstanbul.

15. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2007; 48(1): 1-12.
16. Durán MT, Velasco D, Canle D, Moure R, Villanueva R. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001). Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(9): 488-92.
17. Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48(1): 17-20.
18. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. J Clin Microbiol 2001; 39(3): 949-53.
19. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. Braz J Infect Dis 2005; 9(5): 411-8.
20. Lo HJ, Ho YA, Ho M. Factors accounting for misidentification of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2001; 34(3): 171-7.
21. Yücesoy M, Esen N, Yuluğ N. Use of chromogenic tube and methyl blue-sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. Kobe J Med Sci 2001; 47(4): 161-7.
22. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. Cerrahpaşa Tıp Derg 1999; 30(3): 236-46.
23. Davis LE, Shields CE, Merz WG. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2465-6.
24. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1599-608.
25. 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 1998; 36(7): 2093-5.
26. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification system. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3533-9.
27. Ülger Toprak N, Erdoğan S, Çelik C, Johansson C. Kandidemi olgularında etken mayaların hızlı tanısında CHROMagar *Candida*'nın yeri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33(3): 262-5.
28. 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(1): 58-61.
29. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. Am J Med 1996; 100(6): 617-23.
30. Saraçlı MA. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler ve Genetik Tanı Yöntemleri, s: 133-44. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (ed), *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabı. TMC Yayını No: 43. 21-22 Haziran 2002, Eskişehir.