

Vinnige identifikasiemetodes van giste tydens fungemie

L. BADENHORST, P. L. BOTHA, M. N. JANSE VAN RENSBURG

Summary

A wet preparation method, modified serum test and a modified disc diffusion method were evaluated in order to identify yeasts more rapidly during fungaemia. A total of 2932 blood cultures were processed, of which 54 (1,8%) yielded yeasts.

By using these methods, *Candida albicans* was identified within 3 hours, after yeast growth in the blood culture was confirmed by Gram stain. The wet preparation examinations were accurate in 60% of cases and the serum test in 95% of cases.

After growth was detected, yeast species other than *C. albicans* were identified within 24 hours using the modified disc diffusion method. *C. albicans* (50%), *C. tropicalis* (22%) and *C. parapsilosis* (22%) were the species most frequently isolated. Fungaemia occurred most often after antimicrobial therapy and abdominal conditions.

S Afr Med J 1991; 79: 304-306.

Van die meer as 600 gisspesies is 25 spesies al as menspatogene uitgeken.¹ *Candida albicans*, die mees algemene opportunistiese gispatogeen, kom in 20 - 40% van asimptomatiese persone as normale flora voor.^{2,3}

Die voorkoms van patogene giste het geweldig toegeneem, veral as gevolg van: (i) toename in gebruik van breë-spektrum antimikrobemiddels (AMM); (ii) verhoogde kortikosteroïed-gebruik; (iii) anti-tumor agense; (iv) langdurige verblyf in intensiewe sorgeenhede; (v) gebruik van die kontraseptiewe pil;⁴⁻⁶ en (vi) verhoogde voorkoms van verwerwe immuun-gebreksindroom.⁷

Die graad van gisinfeksies wissel van minder ernstige lokale aantasting (byvoorbeeld sproei) tot lewensbedreigende sistemiese infeksies. Fungemie kom dikwels voor in immuunonderdrukte pasiënte, pasiënte met inblywende intraveneuse, urien- en ander kateters en kan tot endokarditis, piëlonefritis en soortgelyke toestande aanleiding gee.^{2,3}

Hoë mortaliteit word met fungemie geassosieer. Vroeë isolasie en identifikasie van giste lei tot vroeër behandeling en beter prognose.⁸ Verskeie identifikasiemetodes is ondersoek ten opsigte van spoed en akkuraatheid. Die meeste identifikasiemetodes van fungi, wat giste insluit, is langdurig, en gisidentifikasie kan tans van 1 dag tot 6 weke duur.^{2,5,9}

C. albicans is die enigste gisspesie wat binne 4 uur na isolasie geïdentifiseer kan word, met behulp van die serumtoets van Reynolds en Braude. Die metode behels dat serum ligweg met die geïsoleerde gisspesie geïnkuleer word. Die geïnkuleerde serum word dan vir 2 - 4 uur by 37°C geïnkubeer, waarna die serum vir giste met ontwikkelde kiembuise ondersoek word. Slegs *C. albicans* vorm onder hierdie toestande kiembuise en indien giste met kiembuise waargeneem word, word die gis as *C. albicans* gerapporteer.⁹

Departement Mediese Mikrobiologie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Bloemfontein

L. BADENHORST, M.SC. (AGRIC.), M.B. CH.B.

P. L. BOTHA, M.MED. (PATH.)

M. N. JANSE VAN RENSBURG, M.MED. (CLIN. PATH.)

Aangesien vroeë identifikasie van giste in geval van fungemie belangrik vir die prognose van die pasiënt is, was die oogmerk van hierdie studie om metodes te ondersoek waarvolgens giste in gevalle van fungemie vinniger geïdentifiseer kan word.

Materiaal en metodes

Oor 'n tydperk van 6 maande is 2932 opeenvolgende bloedkultuurmonsters ondersoek. Groei van mikroorganismes is volgens die metode van Prevost en Bannister,¹⁰ met behulp van die Bactec 460-sisteen in die bloedkultuurflles aangedui.

Wanneer daar aanduidings van groei in die bloedkultuurflles was, is 'n Gramkleuring van die vloeistof uit die flles gemaak. In gevalle waar giste op die Gramkleuring waargeneem is, is 'n nat preparaat van die bloedkultuurmedium gemaak en mikroskopies ondersoek vir giste en is daar veral gelet of kiembuise gevorm het al dan nie.

Ten einde 'n geskikte inokulumgrootte te verkry is die serumtoets gedoen deur 1 ml serum direk met 0,5 ml van die bloedkultuurmedium te inokuleer. Na 2½ uur inkubasie by 37°C is die serum ondersoek. Giste met kiembuise is as *C. albicans* gerapporteer.

Vir die finale identifikasie van alle geïsoleerde giste is die kleurskyfiediffusiemetode (SDM) van Sobczak,⁴ soos gewysig deur Skead en Neil,¹¹ gebruik. Om identifikasie te bespoedig is die metode verder aangepas deur in gevalle waar giste op die Gramkleuring waargeneem is die groeibodem (Sabouraud) direk met 0,5 ml bloedkultuurmedium te inokuleer.

In 7 gevalle is groei deur die Bactec 460 aangedui en geen organismes is met die Gramkleuring waargeneem nie. In hierdie gevalle is bloedagar met die groeimedium geïnkuleer en na inkubasie van 24 uur is daar gelet op die voorkoms van giskolonies. Die giskolonies is dan verder deur middel van die serumtoets en die SDM geïdentifiseer. In al die gevalle is *C. albicans* geïsoleer.

Alle waarnemings word in Tabela I - IV aangedui.

TABEL I. IDENTIFIKASIEMETODES VAN GEÏSOLEERDE GISTE

Identifikasie volgens SDM	Aantal isolate (totaal = 47)	Kiembuisvorming	
		Nat preparaat	Serumtoets
<i>C. tropicalis</i>	12	—	—
<i>C. parapsilosis</i>	12	—	—
<i>C. albicans</i>	1	—	—
<i>C. albicans</i>	7	—	+
<i>C. albicans</i>	12	+	+
<i>C. krusei</i>	1	—	—
<i>C. glabrata</i>	1	—	—
<i>Geotrichum candidum</i>	1	—	—

Bespreking

Tydens die studie is 2932 bloedkulture ondersoek. Hiervan het 580 (20%) tekens van groei getoon. In 54 (1,8%) gevalle is

TABEL II. GISTE GEÏSOLEER UIT BLOEDKULTURE

Gisspesie	Aantal geïsoleer	% voorkoms
<i>C. albicans</i>	27	50
<i>C. tropicalis</i>	12	22
<i>C. parapsilosis</i>	12	22
<i>C. krusei</i>	1	2
<i>C. glabrata</i>	1	2
<i>G. candidum</i>	1	2
Totaal	54	100

giste uit die bloed geïsoleer en geïdentifiseer volgens die metodes aangedui. *C. albicans* is in 27 gevalle (20 waargeneem met Gramkleuring en 7 nie met Gramkleuring waargeneem nie) geïsoleer. Dit verteenwoordig 50% van fungemieë wat voorgekom het (Tabel II). In 87% van gevalle (47 uit 54) was giste met die Gramkleuring waarneembaar. Alle giste wat

kiembuise in die nat preparaat gevorm het, is as *C. albicans* gerapporteer en is met die SDM bevestig. Met die nat preparaat ondersoekmetode is *C. albicans* dus in 60% van gevalle korrek geïdentifiseer (Tabelle I en III).

In 8 gevalle het *C. albicans* nie kiembuise in die nat preparaat gevorm nie. Dit het daartoe gelei dat die nat preparaat in 40% van gevalle vals-negatiewe waardes gelewer het. 'n Waarskynlikheid van 23% bestaan dus om *C. albicans* met dié metode as 'n kiembuis-negatiewe gisspesie te identifiseer (negatiewe voorspellingswaarde van 77%) (Tabel III). Giste wat nie kiembuise vorm nie is in alle gevalle met die nat preparaat as spesies anders as *C. albicans* onderskei en met die SDM bevestig (spesifisiteit van 100%) (Tabel III).

Alle giste wat kiembuise in die serumtoets gevorm het is as *C. albicans* gerapporteer en is met die SDM bevestig. In 95% van gevalle is *C. albicans* met die serumtoets (binne 3 uur) korrek geïdentifiseer. In slegs 1 geval het kiembuise nie met die serumtoets gevorm nie. Hierdie pasiënt is vooraf vir 9 maande met die antifungusmiddels amfoterisien B en keto-

TABEL III. GEBEURLIKHEIDSTABELLE VAN NAT PREPARAAT EN SERUMTOETS

	Skyfiediffusiemetode			Vals		Voorspellingswaarde	
	<i>C. albicans</i>	Ander	Totaal	(+)	(-)	Positief	Negatief
	Sensitiwiteit (%)	Spesifisiteit (%)		(%)	(%)	(%)	(%)
Kiembuise in nat preparaat							
Teenwoordig	12	0	12	0	40	100	77
Afwesig	8	27	35	0	5	100	96
Totaal	20	27	47				
Kiembuise in serumtoets							
Teenwoordig	19	0	19	0	40	100	77
Afwesig	1	27	28	0	5	100	96
Totaal	20	27	47				
Nat preparaat	60	100		0	40	100	77
Serumtoets	95	100		0	5	100	96

TABEL IV. PREDISPONERENDE TOESTAND VAN PASIËNT, AMM TOEGEDIEN EN GISSPESIE GEÏSOLEER

Predisponerende toestand	Aantal pasiënte	% voorkoms	Aantal op AMM			Giste geïsoleer
			Geen	Nou	Breë	
Buikoperasie	28	52	0	0	28	<i>C. albicans</i> (16) <i>C. tropicalis</i> (9) <i>C. parapsilosis</i> (3)
Pankreatitis	5	8	0	1	4	<i>C. albicans</i> (4) <i>C. glabrata</i> (1)
Buiksepsis	2	4	1	0	1	<i>C. albicans</i> (2)
Septisemie	4	8	0	1	3	<i>C. albicans</i> (2) <i>C. parapsilosis</i> (2)
Pneumonie	4	8	0	1	3	<i>C. parapsilosis</i> (3) <i>C. tropicalis</i> (1)
Kwasjorkor	3	6	0	0	3	<i>C. albicans</i> (2) <i>C. tropicalis</i> (1)
Prematuur	5	8	2	0	3	<i>C. parapsilosis</i> (4) <i>C. albicans</i> (1)
Leukemie	1	2	0	0	1	<i>C. tropicalis</i> (1)
Rumatiekkors	1	2	0	0	1	<i>C. krusei</i> (1)
Brandwonde	1	2	0	0	1	<i>G. candidum</i> (1)
Totaal	54	100	3	3	48	
% AMM toegedien			6	6	88	

konasool vir 'n sistemiese *Histoplasma capsulatum*-infeksie behandel (Tabel I).

Die vooraf toediening van antifungusmiddels aan sommige pasiënte kan ook verklaar waarom giste soms swak in die bloedkultuurmedium gegroei het en dus nie op die Gramkleuring waargeneem is nie.

Dit is bekend dat *C. tropicalis* ook kiembuise na lang inkubasiëperiodes in serum vorm.¹² Alle giste wat kiembuise tydens die ondersoek in die nat preparaat en serumtoets gevorm het, is egter as *C. albicans* bevestig. Spesies anders as *C. albicans* (kiembuis-afwesige giste) is in alle gevalle met die serumtoets korrek van *C. albicans* onderskei (spesifisiteit 100%) (Tabelle I en III).

Die metodes lei dus daartoe dat sodra groei by 'n bloedkultuur aangedui word (wat gewoonlik binne 1 - 2 dae na die neem van die bloed is) en giste met Gramkleuring waargeneem word, *C. albicans* feitlik dadelik met die voorgestelde prosedures (deur kiembuise waar te neem in nat preparaat of met die gewysigde serumtoets) geïdentifiseer kan word. Die serumtoets is meer akkuraat maar neem 3 uur langer.

In die gevalle van die kiembuis-afwesige giste (wat in 50% van gevalle voorgekom het) het albei metodes (nat preparaat en serumtoets) in geen geval vals resultate gelewer nie (Tabel III). Hierdie metodes kan dus aangewend word as 'n vinnige sifting om *C. albicans* van ander gisspesies te onderskei. In gevalle waar dit bekend is dat antifungusmiddels aan pasiënte toegedien word, moet in ag geneem word dat vals-negatiewe resultate kan voorkom.

Vir die finale diagnose van die kiembuis-afwesige giste is die gewysigde SDM gebruik. Giste is gewoonlik binne 24 uur met dié metode geïdentifiseer. In geval van ander laboratorium-monsters (byvoorbeeld uriene, etter en ander) waar giste voorkom, word *C. albicans* as die etiologiese agens in ongeveer 80% van gevalle geïsoleer.^{2,3} Tydens die studie was *C. albicans* in slegs 50% van gevalle die oorsaak van die fungemie. Die hoë voorkoms van *C. tropicalis* (22%) en *C. parapsilosis* (22%) is in ooreenstemming met die bevindings van ander outeurs.^{6,10,13}

Dit is bekend dat hierdie giste, veral *C. tropicalis*, plastiese kannules koloniseer as gevolg van hul vermoë om aan plastiek te adsorbeer.¹⁴

In 88% van gevalle van pasiënte met fungemie is breëspektrum AMM aan die pasiënte toegedien. Dit het moontlik

daartoe gelei dat giste in alle gevalle as die enigste organisme uit die bloedkulture geïsoleer is (Tabel IV). In die spysverteringskanaal kom giste as deel van die normale flora voor.^{2,3} Van die 54 pasiënte met fungemie het 35 (65%) met 'n buiktoestand (buikoperasie, pankreatitis en ander) gepresenteer. In 63% van hierdie gevalle is *C. albicans* geïsoleer (Tabel IV). In gevalle waar AMM gebruik word en buiktoestande voorkom moet fungemie dus as komplikasie in gedagte gehou word.

'n Spesiale woord van dank aan die tegnoloë verbonde aan die Departement Mediese Mikrobiologie, UOVS, vir hulp verleen. Veral dank aan mev. M. Snyman en R. Neethling vir hul nougesette waarnemings en notulering van data. Ook 'n woord van dank aan die Superintendent van die Universitas-hospitaal vir die toestemming om die gegewens te publiseer.

VERWYSINGS

1. Blinkhorn RJ, Adelstein D, Spagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 236-240.
2. Cooper BH, Silva-Hutner M. Yeasts of medical importance. In: Lynette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadonay HJ, reds. *Manual of Clinical Microbiology*. 4de uitg. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985: 526-539.
3. Odd FC. *Candida and Candidosis: A Review and Bibliography*. 2de uitg. Londen: Baillière Tindall, 1988.
4. Sobczak H. A simple disc-diffusion test for differentiation of yeast species. *J Med Microbiol* 1985; 20: 307-316.
5. Qadri SMH, Flournoy DJ, Qadri SGM *et al*. Rapid identification of yeasts by semi-automated and conventional methods. *Med Microbiol Immunol* 1986; 175: 307-316.
6. Horn R, Wong B, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 646-655.
7. Hunter PR. Nosocomial infections due to *Candida albicans*. *Br Soc Multi-Tech* 1988; 9: 3-10.
8. Kraus WE, Valenstein PN, Corey GR. Purulent pericarditis caused by *Candida*: report of three cases and identification of high risk population as an aid to early diagnosis. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 34-41.
9. Rippon JW. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomyces*. 2de uitg. Londen: WB Saunders, 1982: 516-518.
10. Prevost E, Bannister E. Detection of yeast septicemia by biphasic and radiometric methods. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 655-660.
11. Skead KJ, Neil G. Evaluation of a disc diffusion system for the identification of routine yeast isolates. *Med Technol SA* 1988; 2: 125-127.
12. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR *et al*. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1979.
13. Hopfer RL, Orengo A, Chesnut S *et al*. Radiometric detection of yeasts of blood cultures of cancer patients. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 329-331.
14. Douglas LJ. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. *Microbiol Sci* 1985; 2: 243-247.