

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Phoenix™ Yeast ID Panel ile API® ID 32C Ticari Sistemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Phoenix™ Yeast ID Panel and API® ID 32C Commercial Systems for the Identification of *Candida* Species Isolated from Clinical Samples

Ülkü GAYİBOVA, Burcu DALYAN CİLO, Harun AĞCA, Beyza ENER

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 29.04.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 16.06.2014

ÖZET

Fırsatçı mantarlar, nozokomiyal enfeksiyonların önemli nedenlerinden biri olup, başta *Candida* türleri olmak üzere birçok farklı maya mantarı, immün sistemi baskılanmış hastalardan artan sıklıkta izole edilmektedir. Bunlardan bir kısmı yaygın kullanılan antifungallere dirençli olduğundan, uygun tedaviye başlamak için hızlı ve doğru tanımlama gereklidir. Bu çalışmada, *Candida* türlerinin tanımlanmasında API® ID 32C (bioMérieux, Fransa) ve Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, ABD) ticari tanımlama sistemlerinin karşılaştırılması ve morfolojik özelliklerin tanımlamaya etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ekim 2013-Ocak 2014 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezinde yatan 137 hastanın klinik örneklerinden izole edilen toplam 211 (111 idrar, 34 kan/vasküler kateter, 27 üst/alt solunum yolu örneği, 16 apse/püy, 13 boğaz/vajen sürüntüsü ve 10 steril vücut sıvısı) maya suşu alınmıştır. Örnekler kanlı agar, kromojenik agar (CHROMagar *Candida*, BD, ABD) ve Sabouraud dekstroz agara (SDA) ekilmiş ve izole edilen maya kolonileri çimlenme borusu ve mısır unu/Tween-80 agardaki mikroskopik morfolojileri açısından değerlendirilmiştir. Tüm suşlar aynı zamanda her iki ticari sistemle de üretici firmaların önerileri doğrultusunda tanımlanmıştır. Sistemler arasındaki uyumsuz sonuçlar, izolatların morfolojik özellikleri dikkate alınarak çözümlenmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda, izolatların 159'u her iki sistemle de aynı şekilde tanımlanmış ve sistemler arasındaki uyum %75.4 olarak saptanmıştır. Uyumlu tanımlama bulgularına göre en sık izole edilen tür *C.albicans* (%44.1) olmuş, bunu *C.tropicalis* (%9.9), *C.glabrata* (%9.5), *C.parapsilosis* (%8.5) ve *C.kefyr* (%8.1) izlemiştir. Uyum oranı, sık izole edilen türler için (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.kefyr*) %81.7, seyrek izole edilen türler için (*C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.inconspicua/C.norvagensis*, *C.catenulata*) ise %38.7 olarak belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0.034$; χ^2 test). Tanımlamaya,

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Beyza Ener, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 16059 Görükle, Bursa, Türkiye. Tel (Phone): +90 224 295 4113, E-posta (E-mail): bener@uludag.edu.tr

morfolojik bulguların eklenmesiyle uyum oranı artmış (%88.1), ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.31$; χ^2 test). Çalışmada, 211 izolatın 37 (%17.5)'si kromojenik agar, 50 (%23.7)'si kanlı agar ve 124 (%58.8)'ü SDA besiyerlerindeki üremeleriyle tanımlanmış; tanımlama açısından besiyerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p> 0.05$). Maya mantarlarının tanımlanmasında genotipik yöntemler esas olmakla beraber, rutin laboratuvarlarda fenotipik tanımlama daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, genotipik tanımlama yapılmadığı için kullanılan sistemlerden herhangi biri standart kabul edilmemiş ve bu nedenle özgüllük ve duyarlılık hesaplanmamıştır. Buna karşın verilerimiz, çalışılan iki ticari fenotipik tanımlama sisteminin karşılaştırılabilir olduğunu ve maya morfolojisinin dikkatli incelenmesiyle tanımlamanın güvenilirliğinin arttığını göstermiştir. Sonuç olarak, Phoenix™ Yeast ID Panel sisteminin kullanımı ve yorumlanmasının kolay olması ve API® ID 32C sisteminden daha kısa sürede (48 saate karşı 16 saat) sonuç vermesi gibi nedenlerle, bu sistemin rutin laboratuvarlarda kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Ancak yine de hiçbir yöntemin tek başına güvenilirliği tam olmadığından, laboratuvarlarda tür tanımlamasında dikkatli yorumlama şarttır.

Anahtar sözcükler: *Candida*; tür; tanımlama; API® ID 32C; Phoenix™ Yeast ID Panel.

ABSTRACT

Opportunistic fungal pathogens are one of the important causes of nosocomial infections, and several different types of yeasts, especially *Candida* species are increasingly recovered from immunocompromised patients. Since many of the yeasts are resistant to the commonly used antifungal agents, the introduction of appropriate therapy depends on rapid and accurate identification. The aims of this study were to compare the commercial identification systems namely API® ID 32C (bioMérieux, France) and Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, USA) for the identification of *Candida* species and to evaluate the effect of morphological findings in the identification process. A total of 211 yeast strains isolated from different clinical samples (111 urine, 34 blood/vascular catheter, 27 upper/lower respiratory tract, 16 abscess/pus, 13 throat/vagina swabs and 10 sterile body fluids) of 137 patients hospitalized in Uludag University Health and Research Center between October 2013 to January 2014, were included in the study. Samples were cultured on blood agar, chromogenic agar (CHROMagar *Candida*, BD, USA) and Saboraud's dextrose agar (SDA), and isolated yeast colonies were evaluated with germ tube test and morphological examination by microscopy on cornmeal/Tween-80 agar. The isolates were identified as well by two commercial systems according to the manufacturers' recommendations. Discrepant results between the systems were tried to be resolved by using morphological characteristics of the yeasts. Of the isolates 159 were identified identical by both of the systems, and the concordance between those systems were estimated as 75.4%. According to the concordant identification, the most frequently isolated species was *C.albicans* (44.1%) followed by *C.tropicalis* (9.9%), *C.glabrata* (9.5%), *C.parapsilosis* (8.5%) and *C.kefyr* (8.1%). The concordance rate was 81.7% in identification of frequently isolated species (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.kefyr*), however it was 38.7% for the rarely isolated ones (*C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.inconspicua*/*C.norvagensis*, *C.catenulata*), representing statistical significance ($p= 0.034$; χ^2 test). Although not significant ($p= 0.31$; χ^2 test), the rate of concordance was increased (88.1%), when adding the morphological findings to the identification process. Of 211 isolates 37 (17.5%), 50 (23.7%) and 124 (58.8%) were identified according to their growth characteristics on chromogenic agar, blood agar and SDA, respectively, indicating no statistically significant difference between the media ($p> 0.05$). Although genotypic identification is essential, phenotypic methods are more commonly used in routine laboratories for the identification of yeast species. However, since genotypic identification could not be performed in this study, none of the systems were accepted as the standard method and therefore the sensitivity and specificity of the systems were not calculated. On the other hand, our data indicated that the two identification systems were comparable and careful observation of yeast morphology could add confidence to the identification. In conclusion, since the Phoenix™ Yeast ID system was found more practical with easier interpretation, and the results were obtained earlier than those of the API® ID 32C system (16 hours versus 48 hours), it was thought that Phoenix™ Yeast

ID system may be used reliably in the routine laboratories. However, as none of the methods evaluated was completely reliable as a stand-alone, careful evaluation is necessary for species identification.

Key words: *Candida*; species; identification; API® ID 32C; Phoenix™ Yeast ID Panel.

GİRİŞ

Son birkaç dekatta tıp alanında; kemik iliği ve organ nakillerinin yaygınlaşması, yeni ve gelişmiş tedavi olanaklarıyla kanser ve yoğun bakım hastalarının yaşam sürelerinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotik, kortikosteroid, anti-kanser, immün baskılayıcı ilaç ve damar içi kateterlerin sık kullanılması gibi uygulamalar mantar enfeksiyonlarında artışa neden olmuş, saprofit olarak değerlendirilen birçok mantar türü fırsatçı etken olarak karşımıza çıkmıştır¹⁻⁴. Fıratçı etkenlerin başında *Candida albicans* gelmekle birlikte diğer *Candida* türleri ve *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* gibi diğer maya mantarlarıyla oluşan hastalıklar az değildir^{5,6}. Bunun ötesinde bazı *Candida* türleri ve nadir mayalarda ciddi antifungal direnç vardır ve erken tedaviye başlayabilmek için tür düzeyinde belirleme büyük önem taşır⁷⁻¹³. İyileşme ve mortalitenin azalmasında, etkenin tür düzeyinde belirlenmesinin rolü yadsınmaz.

Başta *Candida* türleri olmak üzere maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanmasında genotipik yöntemler esas olmakla beraber, morfoloji ve biyokimyasal analize dayanan fenotipik yöntemler, rutin laboratuvarlarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Tanımlamada kullanılan klasik karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri zaman alıcı ve aşırı yük getirici olduğundan değişik prensiplere göre çalışan ticari tanımlama sistemleri daha çok tercih edilir. Ticari tanımlama sistemlerinin bir kısmı klasik yöntemle benzer şekilde karbonhidrat asimilasyonuna dayanır ve genellikle 48 saat içinde sonuçlanır. Diğer bir kısmı ise karbonhidrat kullanımının yanı sıra çeşitli substratların enzimatik yıkım reaksiyonlarını da kullanarak daha erken (< 24 saat) sonuçlanabilmektedir¹⁴⁻¹⁶. Erken sonuçlanması bu sistemlere bir avantaj sağlar. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, yeni kullanıma giren Phoenix™ Yeast ID Panel ile uzun süredir kullandığımız API® ID 32C ticari sistemlerin karşılaştırılması amaçlanmış, morfolojik bulguların tanımlamaya etkisi incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ekim 2013-Ocak 2014 tarihleri arasında, Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerde üreyen ve farklı yöntemlerle tanımlanan 211 maya kolonisi dahil edildi. Kanlı agar (Becton Dickinson, ABD) veya kromojenik agar (CHROMagar *Candida*, Becton Dickinson, ABD) veya Sabouraud dekstroz agar (SDA; Becton Dickinson, ABD) besiyerlerinde üreyen şüpheli maya kolonileri saf ise direkt tanımlamaya alındı. Karışık üremelerde ise, her bir farklı maya kolonisi gentamisin/kloramfenikollü SDA besiyerine pasajlandı ve çoğaltıldıktan sonra tanımlamaya alındı. Kalite kontrolü amacıyla; *C.albicans* ATCC 10231, *C.krusei* ATCC 6258, *C.tropicalis* ATCC 1021 *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.neoformans* ATCC 90112 standart suşları kullanıldı.

Koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü ile maya olduğuna karar verilen tüm kolonilerden, çimlenme borusu (germ tube) testi ve mısır unu/tween-80 agara "Dalmau" yöntemiyle ekim yapıldı¹⁷. Ayrıca iki ticari tanımlama sistemi üretici firmaların önerileri doğrultusunda çalışıldı, sonuçların birbirleriyle uyumları karşılaştırıldı ve morfolojik bulguların tanımlamaya etkisi incelendi. Çalışmada değerlendirilen yöntemlerden biri, sadece asimilasyona dayanan ve birçok çalışmada kullanılmış güvenilir bir tanımlama sistemi¹⁴ olan API® ID 32C (bioMerieux, Fransa); diğeri ise asimilasyonun yanı sıra enzimatik reaksiyonları da kullanan, daha yeni ve deneyimin az olduğu tanımlama sistemi¹⁸ olan Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) idi. API ID 32C sistemi 48 saat, Phoenix Yeast ID Panel ise 16 saat sonra okunarak değerlendirildi. Herhangi bir tanımlama yapılmadığı veya iki sistem tarafından farklı tanımlama yapıldığı zaman inkübasyon süreleri, API ID için 72. saate, Phoenix Yeast ID için 32. saate uzatıldı ve tekrar değerlendirildi.

İstatistiksel analiz için, yöntemler arasındaki uyumun değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 137 hastaya ait, 111'i idrar, 34'ü kan/vasküler kateter, 27'si üst/alt solunum yolu örneği, 16'sı apse/püye, 13'ü boğaz/vajen sürüntüsü ve 10'u steril vücut sıvısı (beyin omurilik sıvısı, plevra, periton) örneklerinde üreyen toplam 211 maya kolonisi değerlendirilmiştir. Serumda çimlenme borusu oluşturan ve oluşturmayan tüm izolatlar, mısır unu/tween-80 (MT₈₀) agara ekilmiş ve 48 saat sonra incelenmiştir. İzolatların 94 (%44.5)'ü çimlenme borusu oluşturarak *C.albicans* veya *C.dubliniensis* olarak değerlendirilmiş ve bunların tümünün klamidospore oluşturduğu saptanmıştır.

Candida spp. tanımlamasında, izolatların %75.4 (159/211)'ü her iki ticari sistemle de aynı tür olarak tanımlanmıştır (Tablo I). İki tanımlama sistemi arasındaki uyum, çalışmamızda en sık izole edilen ilk beş tür (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.kefyr*) için %81.7 (147/180); nadir rastlanan diğer türler için ise %38.7 (12/31) olarak bulunmuş, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.034$). Çimlenme borusu ve klamidospore oluşturan 94 *C.albicans/C.dubliniensis* izolatının üçü API ID ile, yedisi ise Phoenix Yeast ID ile farklı ya da hiç tanımlanamamıştır (Tablo I). Dolayısıyla morfolojik tanımlamaya göre Phoenix Yeast ID Panel %92.5, API ID 32C %96.8 doğrulukta sonuç vermiş ve aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.835$).

Her iki sistemle farklı sonuç veren 27 izolatın tanımlanmasında, MT₈₀ agardaki morfolojik özellikleri yardımcı olmuş ve böylece toplam 186 (%88.1) izolat tür düzeyinde tanımlanmıştır. Morfolojik bulguların tanımlamaya eklenmesi, oranın %75.4'ten %88.1'e yükselmesini sağlamış; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.31$). En az iki sistemle (iki ticari sistemle aynı veya morfoloji ile desteklenen bir ticari sistem) doğrulanan türlerin dağılımı Tablo II'de görülmektedir. İzolatların %44.1'ini *C.albicans* oluşturmuş; izolatların %11.8'i ise en az iki sistemle doğrulanmamıştır.

Phoenix Yeast ID Panel

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>Cryptococcus neo-</i> <i>formans</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. melibiosica</i>	<i>C. sake</i>	<i>C. apicola</i>	<i>C. inconspicua/</i> <i>C. norvagensis</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. catenulata</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>cereviciae</i>	<i>Trichosporon</i> <i>mucoides</i>	Tanımlanamayan	Toplam
API ID 32C	84	20	17	15	11	7	2	2	1											91	
<i>C. albicans</i>	1			1						1*									4	24	
<i>C. tropicalis</i>		1									1*									21	
<i>C. parapsilosis</i>			1					1	1										3*	16	
<i>C. glabrata</i>				1																18	
<i>C. kefyr</i>					1														1*	12	
<i>C. krusei</i>						1		1	1			2*					1		1*	5	
<i>C. lusitanae</i>							2													2	
<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>								2												1	
<i>Geotrichum</i> <i>capitatum</i>									1											1	
<i>C. dublinensis</i>																					
<i>C. melibiosica</i>																					
<i>C. sake</i>																					
<i>C. apicola</i>																					
<i>C. inconspicua/</i> <i>C. norvagensis</i>																				5	
<i>C. famata</i>			1*																	1	
<i>C. utilis</i>								1												1	

Tablo 1. Candida türlerinin tanımlanmasında iki ticari sistemin karşılaştırılması (Devamı)

Phoenix Yeast ID Panel

API ID 32C	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyri</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. melibiosica</i>	<i>C. sake</i>	<i>C. plicola</i>	<i>C. inconspicua/norvagensis</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. uttilis</i>	<i>C. catenulata</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>	Tanımlanamayan	Toplam	
<i>C. catenulata</i>																	1*				1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>																						
<i>Trichosporon mucoides</i>								1													1	
Tanımlanamadı	3		1*	4				3*										1*			12	
Toplam	87	20	21	21	11	7	4	9	3	1	1	2	2					9		13	211	

Altı çizgili sayılar: Her iki sistemle farklı tanımlanan, ancak MT₈₀ morfolojisi ile birinin lehine bulgu saptanan izolatlar (n=27); Yıldızlı sayılar: MT₈₀ agarda morfolojik tanımlama yapılamayan izolatlar (n=25), MT₈₀: Mısır unu/Tween-80 agar.

Tablo II. Her İki Ticari Sistemle veya Bir Sisteme Morfolojik Tanımlamanın Eklenmesiyle Saptanan Türlerin Dağılımı

Tür	Sayı (%)
<i>C.albicans</i>	93* (44.1)
<i>C.tropicalis</i>	21 (9.9)
<i>C.glabrata</i>	20 (9.5)
<i>C.parapsilosis</i>	18 (8.5)
<i>C.kefyr</i>	17 (8.1)
<i>C.krusei</i>	9 (4.3)
<i>C.lusitaniae</i>	3 (1.4)
<i>C.neoformans</i>	4 (1.9)
<i>G.capitatum</i>	1 (0.5)
Doğrulanamayan	25 (11.8)
Toplam	211 (100)

* Çimlenme borusu ve klamidospore oluşturan bir izolat, Phoenix™ Yeast ID Panel ile *C.dubliniensis* olarak tanımlandığından toplam sayı 94 yerine 93 olarak alınmıştır.

Üretici firmalar tarafından önerilen inkübasyon süresi sonunda, iki sistemle farklı tanımlanan veya tanımlanamayan 52 izolat için inkübasyon süresi uzatıldığında, API ID 32C tanımlamalarında bir değişiklik olmamış, Phoenix Yeast ID Panel tanımlamalarının ise sadece 5 (%9.6)'inde değişiklik olmuştur (Tablo III). API ID 32C ile *C.kefyr* ancak Phoenix Yeast ID Panel ile *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanan 6 izolatın 3'ü inkübasyonun uzatılması sonucu *C.kefyr*'e dönmüştür. Buna göre iki ticari sistem arasındaki toplam uyum %77.7 (164/211)'ye yükselmiş, ancak bu artış oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.88$).

Çalışmamızda, izolatların %17.5 (37/211)'i kromojenik agar, %23.7 (50/211)'si kanlı agar ve %58.8 (124/211)'i SDA besiyerlerindeki üremeleriyle tanımlanmış; en yüksek oranın SDA ile alınmasına karşın besiyerleri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (Tablo IV). Kromojenik besiyerinde koloni renklerine göre tanımlanan 37 izolatın, API ID 32C ve Phoenix ID Yeast Panel tanımlama sonuçları Tablo V'te verilmiştir. Buna göre, *C.albicans*

Tablo III. Uzatılmış İnkübasyonun Tanımlamada Oluşturduğu Değişiklikler

API ID 32C		Phoenix Yeast ID Panel	
48 saat	72 saat	16 saat	32 saat
<i>C.krusei</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.apicola</i>	<i>C.krusei</i>
<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>	Tanımlamadı	<i>C.albicans</i>
<i>C.kefyr</i>	<i>C.kefyr</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.kefyr</i>
<i>C.kefyr</i>	<i>C.kefyr</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.kefyr</i>
<i>C.kefyr</i>	<i>C.kefyr</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.kefyr</i>

Tablo IV. Candida Türlerinin Farklı Besiyerlerinde Tanımlanma Oranları

Besiyeri (Sayı)	Aynı tanımlanan tür sayısı (%)
Sabouraud dekstroz agar-SDA (124)	101 (81)
Kanlı agar (50)	37 (74)
Kromojenik besiyeri (37)	21 (57)
Toplam (211)	159 (75)

İstatistiksel analiz: SDA/Kanlı agar p= 0.799; SDA/Kromojenik agar p= 0.298; Kanlı agar/Kromojenik agar p= 0.492.

Tablo V. Candida Türlerinin Kromojenik Besiyerindeki Koloni Rengi ve Ticari Sistemlerin Tanımlaması

Koloni rengi (n)	API ID 32C (Sayı)	Phoenix Years + ID Panel (Sayı)
Yeşil (7)	<i>C. albicans</i> (5) Tanımlamadı (2)	<i>C. albicans</i> (7)
Mavi (2)	<i>C. tropicalis</i> (2)	<i>C. tropicalis</i> (2)
Düzyün-pembe (8)	<i>C. glabrata</i> (4) Tanımlamadı (4)	<i>C. glabrata</i> (7) <i>C. neoformans</i> (1)
Beyaz-buruşuk (7)	<i>C. krusei</i> (4) <i>C. lusitaniae</i> (1) Okumadı (2)	<i>C. krusei</i> (4) <i>C. inconspicua</i> ve <i>C. norvegensis</i> (3)
Beyaz-düzyün (13)	Çeşitli türler*	Çeşitli türler*

* *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. catenulata*.

için yeşil, *C. tropicalis* içinse mavi rengin oldukça özgül olduğu saptanmıştır. Beyaz-buruşuk koloni yapısı *C. krusei* için oldukça özgül olmakla beraber, bu kolonilerden yapılan tanımlamada, 3 suş API ID 32C tarafından, *C. krusei*'ye çok benzeyen *C. inconspicua*/*C. norvegensis* olarak tanımlanmıştır. Pembe-beyaz düzyün koloni yapısı ise çeşitli türler tarafından oluşturulduğundan tanımlamada yararlı olmamıştır (Tablo V).

TARTIŞMA

Candida türleri ve diğer maya mantarlarının tanımlanmasında genotipik yöntemler esas olmakla birlikte, rutin laboratuvarlarda morfoloji ve biyokimyasal temele dayanan fenotipik tanımlama yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, biyokimyasal analizle tanımlama yapan birçok ticari sistemin cins ve tür düzeyindeki tanımlama yetenekleri, kullandıkları substrat sayısı, veri tabanları ve algoritmalarla ilişkilidir. Substratların kullanılması sonucu bulanıklık, enzimatik yıkılmaları sonucu ise renk değişimi gözlenmektedir. Bir kısmı manuel olarak okunurken, bir kısmı otomatik olarak cihaz yardımıyla okunur ve değerlendirilir. Kolay uygulanabilirlik, hızlı sonuç verme ve maliyet, bu sistemlerin seçiminde rol oynayan en önemli parametrelerdir¹⁴. Bu çalışmanın amacı, fenotipik tanımlama yapan iki ticari sistemin karşılaştırılmasıdır. Genotipik tanımlama yapılmadığı için kullanılan ticari sistemlerden herhangi biri standart kabul edilmemiş ve bu nedenle özgülük ve duyarlılık hesaplanmamıştır. Sadece iki sistemin uyumuna bakılmış, morfolojik bulguların tanımlama etkisi değerlendirilmiştir.

API ID 32C, deneyimizin fazla olduğu ve uzun süredir laboratuvarımızda kullanılan bir sistem olup, 48 saatte sonuçlanmaktadır. Veri tabanı 63 farklı tür tanımlayabilecek şekilde programlanmıştır ve bu çalışmada, çimlenme borusu ve klamidospore pozitif izolatları %97 oranında *C.albicans* olarak tanımlayarak literatürle uyumlu bulunmuştur^{19,20}. Phoenix Yeast ID Panelin *C.albicans*'ı tanımlama oranı, API ID 32C'den biraz düşük (%92) olsa da aralarında anlamlı bir fark yoktur. Bu sistemin, Vitek 2 kolorimetrik YST kart ile karşılaştırıldığı benzer bir çalışmada, *C.albicans* suşları için %98 oranında uyumluluk saptanmıştır¹⁸.

API ID 32C ile *C.kefyr* olarak tanımlanan ve morfolojik incelemeyle desteklenen altı izolat, Phoenix Yeast ID Panel tarafından *S.cerevisiae* olarak tanımlanmıştır (Tablo I). Ancak Phoenix Yeast ID Panel ileri inkübasyona alındığında bunlardan üçü *C.kefyr* olarak değişmiştir (Tablo III). Morfolojik uyumsuzluk olduğu zaman Phoenix Yeast ID Panelin ileri inkübasyona alınabilmesi büyük bir avantajdır ve yaygın kullanılan ticari sistemlerin bir kısmında bu özellik yoktur¹⁴. Bu çalışmada her ne kadar inkübasyonun uzatılmasının sonuçlara anlamlı bir etkisi olmasa da, beşinci sıklıkta saptadığımız *C.kefyr* için önemli bir bulgudur.

Çalışmamızda izolatların %75.4'ü iki ticari sistemle aynı sonucu vermişken; uyumsuz tanımlamalarda bir sistemin sonucu morfolojiyle desteklendiği zaman tanımlama oranı, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da %88.1'e çıkmıştır. Morfolojinin desteklediği API ID 32C ile yapılan bir çalışmada tanımlama oranı %98 olarak bulunmuştur¹⁹. Bizim saptadığımız oran biraz daha düşük görünmekle beraber, bu çalışmada tanımlama kanlı agar, kromojenik agar ve SDA gibi farklı besiyerlerinden yapılmıştır ve besiyeri farklılığının sonuçları etkileyebileceği literatürde vurgulanmaktadır²¹. Her ne kadar doğru olan, tek koloninin pasajlandıktan sonra tanımlamaya alınması ise de, bu durum gecikmeye yol açmaktadır. Bu çalışmada besiyerleri arasındaki fark anlamlı olmadığından, özellikle kan kültür sonucu gibi hızlı sonuç verilmesi gerektiği zaman, primer izolasyon besiyerlerinden de tanımlama yapılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Kromojenik besiyeri olarak bu çalışmada CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, ABD) kullanılmıştır. Her ne kadar sayı az olsa da (suşların sadece 37'si bu besiyerinde tanımlanmıştır), oluşan koloni renklerinden *C.albicans* ve *C.tropicalis* tanımlaması literatürle uyumlu olarak rahat yapılmıştır²². Ancak bu besiyerinde buruşuk pembe kolonilerin *C.krusei* için tipik olduğu söylenmesine rağmen, çalışmamızda üç suş API ID 32C tarafından *C.krusei*'ye çok benzeyen *C.inconspicua*/*C.norvagensis* olarak tanımlanmıştır²²⁻²⁴. Bu bulgu, seyrek rastlanan türlerin de artık karşımıza çıkabildiğini ve kromojenik besiyerinde de olsa hataların olabileceğini göstermek açısından anlamlı bulunmuştur.

Bu çalışmada, yaklaşık üç aylık bir süreçte bütün klinik örneklerden izole edilen maya mantarlarının tanımlanması yapılmıştır. En sık saptanan tür *C.albicans* (%44.1) olmuş ve literatürle uyumlu olarak diğer *Candida* ve maya türlerine bir kayma olduğu izlenmiştir. Pfaller ve arkadaşları²⁵ tarafından 6.5 yıl boyunca yapılan global bir çalışmada, *C.albicans* dışı türlere kaymanın olduğu çok net olarak vurgulanmış, özellikle seyrek rastlanan türlerde artışın %50'ye ulaştığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ikinci sıklıkta saptanan tür *C.tropicalis* (%9.9) olmuş, onu *C.glabrata* (%9.5) izlemiştir. En sık saptanan

ilk beş içine *C.krusei*'nin değil, *C.kefyr*'in girmesi ve *C.glabrata*'nın üçüncü sırayı alması önemli bir bulgu olup, nadir görülen türlerdeki artışın göstergesidir. Hastanemizde yapılan bir başka çalışmada, yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen *Candida* türleri arasında *C.parapsilosis* ikinci sırada yer almaktadır²⁶. Ancak bu çalışmada sadece kan kültürleri değil tüm örneklerdeki üremeler tanımlanmıştır. Örneklerin yarısının idrar olması, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.kefyr* üremelerinin sıklığını açıklamaktadır; zira gastrointestinal sistemde kolonize olabilen bu türler, sondalı hastalarda sıklıkla üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olmaktadır²⁷.

Sunduğumuz bu çalışmada, dünyada ve ülkemizde yeni kullanıma giren Phoenix Yeast ID Panel sisteminin, uzun süredir kullanılan API ID 32C ile uyumuna bakılmıştır. Phoenix Yeast ID Panel yeni olduğu için bu sistemin incelendiği çalışma sayısı azdır; sadece bir makale ve iki kongre bildirisine ulaşılmıştır^{18,28,29}. Bu üç çalışmada da sistem, genotipik olarak doğrulanmış suşlarla denenmiş ve > %90 doğruluk ile tanımlama yaptığı bulunmuştur^{18,28,29}. Ülkemizde ise bu sistemin denendiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, önceden vurgulandığı gibi genotipik bir tanımlama yapılmadığından, sistemin kesin saptama oranları verilememiştir. Ancak kullanılan standart suşlar her iki sistem ile doğru olarak tanımlanmıştır. İki ticari sistem arasında tespit edilen %75.4 oranındaki uyum, düşük gibi görünse de, hiçbir ticari sistemin birbiriyle ve klasik yöntemlerle tamamen uyumlu olması beklenemez¹⁵⁻¹⁷. Üstelik bu iki ticari sistem, prensip olarak birbirinden oldukça farklıdır. API ID 32C substratları sadece asimilasyonla kullanırken, Phoenix Yeast ID Panel substratların enzimatik yıkımını da uyguladığından daha hızlı sonuç vermektedir. Çalışmamızın verileri, Phoenix Yeast ID Panel sisteminin API ID 32C'ye göre daha kısa sürede sonuçlanması, sık izole edilen türlerde uyumun yüksek olması, sistemin ileri inkübasyona olanak vermesi ve maliyetinin daha düşük olması gibi nedenlerle rutin laboratuvarlarda kullanılmasının uygun olacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol 2010; 36(1): 1-53.
2. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, et al. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 73(4): 293-300.
3. Eggiman P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species: infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 2003; 3(11): 685-702.
4. Diekema DJ, Messer RJ, Hollis R, Jones N, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. Infect Cont Hosp Epidemiol 2004; 25(8): 624-6.
5. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *Candida albicans* and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. Int J Infect Dis 2010; 14(11): e954-66.
6. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis 2011; 11(2): 142-51.
7. Merz WG. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. J Clin Microbiol 1984; 20(6): 1194-5.
8. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. and the 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(1): 78-83.

9. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, et al. *Trichosporon beigelii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1616-22.
10. Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(9): 1962-5.
11. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1): 1-8.
12. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 617-23.
13. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, et al. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5425-7.
14. Pincus DH, Orega S, Chatellier S. Yeast identification past, present, and future methods. *Med Mycol* 2007; 45(2): 97-121.
15. Reis E, Shadomy HJ, Lyon GH (eds). *Fundamental Medical Mycology*. 2012, Wiley-Blackwell, New Jersey.
16. Hazen CK, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance, pp: 1762-88. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington DC.
17. Larone DH (ed). *Medically Important Fungi*. 2011, 5th ed. ASM Press, Washington DC.
18. Posteraro B, Ruggeri A, Carolis E, et al. Comparative evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 systems for species identification of common and uncommon pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol* 2013; 51(11): 3841-5.
19. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3396-8.
20. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, et al. Comparison of the new API *Candida* System to the ID 32 C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 1996; 34(7): 1846-8.
21. Odds FC. Sabouraud's agar. *J Med Vet Mycol* 1991; 29(6): 355-9.
22. 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(2): 454-6.
23. 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.
24. 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.
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, et al. Results from the ARTEMIS disk global antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 5848-59.
26. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalin H, et al. Epidemiology of nosocomial candidemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiol Infect* 2010; 138(9): 1328-35.
27. Kauffman CA. Overview of *Candida* infections. UpToDate 2013. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-candida-infections>
28. Morgan M, Urquiza Y, Tracey J, Nwosu O. Comparative evaluation of the BD Phoenix yeast ID panel and the Vitek2 colorimetric yeast identification card for identification of yeast isolated from clinical samples. American Society for Microbiology 112th General Meeting. June 16-19 2012, San Francisco. Abstract Book, P-1220. ASM Press, Washington DC.
29. Majors ML, Robinson A. Evaluation of the Phoenix yeast ID for the automated identification of yeast isolates. American Society for Microbiology 112th General Meeting. June 16-19 2012, San Francisco. Abstract Book, P-1221. ASM Press, Washington DC.