

Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Maya Türlerinin Tanımlanmasında Sık Kullanılan Ticari Sistemlerin Değerlendirilmesi: Çok Merkezli Bir Çalışma

Evaluation of Common Commercial Systems for the Identification of Yeast Isolates in Microbiology Laboratories: A Multicenter Study

Nilgün KARABIÇAK¹, Hatice ULUDAĞ ALTUN^{2,3}, Onur KARATUNA⁴, Gülşen HAZIROLAN⁵, Neriman AKSU⁵, Ali ADİLOĞLU², Işın AKYAR⁴

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ Public Health Institution of Turkey, Mycology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

² Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

² Ankara Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

³ Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Turgut Ozal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

⁴ Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Acıbadem University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁵ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁵ Ankara Numune Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 10.12.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.03.2015

ÖZ

Son yıllarda türe özgü klinik direnç sınır değerlerinin belirlenmesi nedeniyle ve uygun antifungal tedaviye erken başlanması için maya türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması önemlidir. Klinik laboratuvarlarda tanımlama, sıklıkla biyokimyasal özellikleri temel alan çeşitli ticari sistemlerle ve nadiren de fizyolojik ve morfolojik özelliklere göre yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, rutin laboratuvarlarda sık kullanılan Vitek 2 sistemi YST maya tanımlama kartı (Vitek; bioMérieux, Fransa) ve API 20C AUX (API; bioMérieux, Fransa) sisteminin konvansiyonel mikolojik tanı yöntemleriyle karşılaştırılmasıdır. Çalışmamızda, çeşitli üniversite ve eğitim/araştırma hastanelerinde klinik örneklerden izole edilen ve Vitek ile tanımlanan toplam 473 maya izolatu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı'nda, API sistemi ve morfolojik tanımlamayı da içeren konvansiyonel mikolojik yöntemler ile birlikte değerlendirilerek tür düzeyinde tanımlanmıştır. Çalışmada kalite kontrol suşları olarak *Candida dubliniensis* MYA 583, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Cryptococcus neoformans*

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Nilgün Karabiçak, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı, Sıhhiye 06100, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 565 5504, **E-posta (E-mail):** nilgunkarabicak@yahoo.com

ATCC 32268 kullanılmış; standart suşlar her iki sistemle de ardarda 10 gün çalışılmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile tanımlanan 473 klinik maya izolatının [6 cins (*Candida*, *Cryptococcus*, *Blastoschizomyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*), 17 tür (5'i sık, 12'si nadir görülen)] Vitek ve API sonuçları karşılaştırıldığında; sistemlerin performansı, sık görülen türlerin (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.krusei*) tanımlanmasında (Vitek: %95; API: %96), nadir görülen türlerden (Vitek: %78.4; API: %71.6) daha iyi bulunmuştur (p= 0.155). Yanlış tanımlama veya tanımlayamama, her iki sistemle de, sık görülen türlerden en sık *C.parapsilosis* (Vitek: 6/87; API: 7/87) ve *C.glabrata* (Vitek: 9/104; API: 3/104) izolatlarında görülürken, nadir görülen türlerden *C.pelliculosa* (Vitek: 3/11; API: 6/11) ve *C.dubliniensis* (Vitek ve API: 2/5) izolatlarında saptanmıştır. API ile *C.guilliermondii* (API: 2/5) izolatlarının tanısı diğer türlere göre daha problemlidir. *Blastoschizomyces capitatus* ve *Saccharomyces cerevisiae* türleri, Vitek ve API ile tanımlanamamıştır. Sonuç olarak, Vitek ve API testlerinin doğru tanı koyma açısından tutarlılıkları benzer bulunmuş (%86.3); sık karşılaşılan türlerde tanımlama oranları daha yüksekken (en az %95) nadir görülen türlerde azaldığı dikkati çekmiştir. Ticari sistemlere morfolojik tanımlamanın da eklenmesi, tanıyı kolaylaştırmasının yanı sıra birden fazla etkenle meydana gelen enfeksiyonların doğru tanımlanması ve tedavisinde de yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Maya; tanımlama; API® 20 C AUX; VITEK® 2 YST ID kart.

ABSTRACT

Accurate and rapid identification of yeast isolates have become important in recent years for not only antifungal susceptibility testing due to the species-specific clinical resistance breakpoints but also early initiation of appropriate antifungal therapy. In clinical microbiology laboratories species identification of yeasts is often performed with several commercial systems based on biochemical properties and rarely according to the physiological and morphological characteristics. The aim of this study was to compare the two common commercial systems, VITEK 2 YST ID Card (Vitek; bioMérieux, France) and API 20C AUX (API; bioMérieux, France) with conventional mycological methods. A total of 473 clinical yeast strains isolated from clinical specimens in different university and training/research hospitals and identified by Vitek system were included in the study. The isolates were re-identified with API and conventional methods including morphological identification in the Mycology Reference Laboratory of the Public Health Institute of Turkey. *Candida dubliniensis* MYA 583, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 32268 were used as quality control strains and those standard strains were studied consecutively 10 days with both of the methods. The results of identification by Vitek and API were compared with the results of conventional methods for those 473 yeast isolates [6 genus (*Candida*, *Cryptococcus*, *Blastoschizomyces*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*), 17 species (5 common and 12 rarely isolated)]. The performances of the systems were better (Vitek: 95%; API: 96%) for the commonly detected species (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* and *C.krusei*) than those for rarely detected species (Vitek: 78.4%; API: 71.6%) (p= 0.155). Misidentification or unidentification were mostly detected for *C.parapsilosis* (Vitek: 6/87; API: 7/87) and *C.glabrata* (Vitek: 9/104; API: 3/104) by both of the systems. For rarely detected yeast isolates, misidentification or unidentification were most frequently observed in species of *C.pelliculosa* (Vitek: 3/11; API: 6/11) and *C.dubliniensis* (API and Vitek: 2/5) isolates. *Candida guilliermondii* (API: 2/5) isolates had lower rate of identification with API compared to other species. *Blastoschizomyces capitatus* and *Saccharomyces cerevisiae* isolates could not be identified by both of the systems. As a result, the accurate diagnosis of Vitek and API systems were similar in terms of consistency (86.3%). Two systems performed well in correct identification of common clinical yeast species (at least 95%), while the identification of rare species was more challenging indicating that they require further morphological and physiological testing. The addition of morphological identification to commercial systems will be useful for accurate diagnosis and treatment of mixed infections.

Keywords: Yeast; identification; API® 20C AUX; VITEK® 2 YST ID card.

GİRİŞ

Candida spp. ve diğer maya mantarlarının neden olduğu invazif mantar enfeksiyonları, son yıllarda giderek artan sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. Bu enfeksiyonlar altta yatan ciddi hastalığı olan hastalar için mortalite ve morbiditenin önemli nedenleri arasında yer almaktadır¹⁻⁶. Amerika'da hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri dördüncü sırada saptanmakta ve nötropenik olmayan hasta grubunda da tüm sepsis ataklarının yarısından fazlasına neden olmaktadır³. Hastane kökenli mantar enfeksiyonlarında *Candida albicans* hala en sık karşılaşılan etken olmakla birlikte, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* ve *C.krusei* gibi diğer *Candida* türlerine ve *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* gibi diğer maya türlerine giderek artan sıklıkta rastlanmaktadır¹⁻⁵.

Maya türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması, uygun antifungal tedavinin seçimi, duyarlı hastalara yayılma riskinin izlenmesi ve epidemiyolojik yönden önemlidir³. Antifungal duyarlılık ve direncin gösterilmesinde kullanılan direnç sınır değerleri, son yıllarda Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından güncellenmiş ve yeni türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerleri belirlenmiştir⁷. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda sık karşılaşılan başta *Candida* spp. olmak üzere maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanması daha da önemli bir hale gelmiştir. Günümüzde klinik laboratuvarlarda maya tanımlaması biyokimyasal özellikleri temel alan çeşitli ticari sistemlerle ve nadiren de fizyolojik ve morfolojik özellikleriyle yapılmaktadır^{5,8,9}. Bu sistemlerin performansı, tanısı güç veya değişik patojen mayaların ortaya çıkması, taksonomideki gelişmeler ve olası coğrafi tür varyasyonları nedeniyle sürekli izlenmelidir^{2,10}. Bu çalışmada, mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan Vitek 2 otomatize sistemi YST maya tanımlama kartı ve API 20C AUX sisteminin konvansiyonel mikolojik yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik İzolatlar

Bu çalışmada, Acıbadem Üniversitesi'nin afiliye laboratuvarları olan Acıbadem Lab-med Klinik Laboratuvarları (n= 229), Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarları (n= 149) ve Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında (n= 95), çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 473 maya suşu, YST maya tanımlama kartı ile Vitek 2 sisteminde tanımlandı. Klinik izolatlar, Sabouraud dekstroz agar (SDA; Oxoid, İngiltere) besiyerinde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarına gönderildi.

Tanımlama Prosedürü ve Sonuçların Yorumlanması

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarına (THSK-MRL) kabul edilen klinik izolatların saf kültür olduklarını doğrulamak için tüm izolatlar (n= 473) laboratuvarımızın "maya izolatları standart tanımlama prosedürüne" göre, sikloheksimid içeren ve içermeyen kloramfenikollü SDA (Oxoid, İngiltere) ve kromojenik besiyerine (CHRO-Magar *Candida*, Becton Dickinson, ABD) ekildi. Kromojenik besiyerinde farklı renk ve

morfolojide maya kolonileri görüldüğünde birden fazla maya türünün varlığı düşünüldü ve saf kültür elde edebilmek için, kromojenik besiyerindeki farklı renklerdeki kolonilerin herbirinden tekrar kromojenik besiyerine tek koloni pasajları yapıldı. Ardından mayaların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi ve tür tanımlamasına katkı sağlamak amacıyla mısır unu/Tween-80 besiyerine "Dalmau" yöntemiyle ekildi¹¹. İzolatların kromojenik besiyerinde oluşturduğu renk, koloni morfolojisi ve mısır unu/Tween-80 besiyerindeki hif, yalancı hif, klamidospore, blastokonidyum veya artrokonidyum gibi mikroskopik morfolojileri değerlendirildi. Ayrıca bu izolatlara, çimlenme borusu (germ tüp) testi ve API 20C AUX testi (bioMérieux, Fransa) uygulandı.

Testlerin sonucunda saptanan fizyolojik ve morfolojik özelliklerin birlikte değerlendirilmesi ile izolat tür düzeyinde tanımlandı. Bu prosedüre göre tanımlanamayan, nadir görülen maya türlerinin tanımlanması için, karbonhidrat fermentasyonu (glukoz, maltoz, sükröz, laktoz, galaktoz ve trehaloz), API ID32C sistemi (bioMérieux, Fransa), pigment üretimi, nitrat asimilasyonu, üre hidrolizi ve çeşitli ısılarda üremeyi (25°C, 37°C ve 42°C) içeren diğer mikolojik tanımlama yöntemleri standart tanımlama prosedürüne ilave edildi^{5,11,12}.

Vitek 2 Sistemi YST Maya Tanımlama Kartı (Vitek, bioMérieux, Fransa)

YST maya tanımlama kartı, 46 biyokimyasal test içeren, 64 kuyucuklu tek kullanımlık plastik bir karttan oluşur ve 53 maya türü tanımlanabilir. Değerlendirme Vitek 2 sistemi ile yapılır. Çalışmaya katılan hastanelerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, kalite kontrol suşları ve klinik izolatlardan elde edilen saf kültürlerin süspansiyonları, NaCl içerisinde McFarland 2 standardında türbidimetre ile hazırlandı. Bu kültür süspansiyonları ile hazırlanan test kartları, Vitek 2 sisteminde 35.5°C'de 18 saat süre ile her 15 dakikada bir otomatik olarak okunarak inkübe edildi. Okuma sonuçları, veritabanı ile karşılaştırılarak mayalar değerlendirildi ve son tanımlamalar, "tanımlandı", "tanımlanamadı" ve "yanlış tanımlandı" şeklinde sınıflandırıldı.

API 20C AUX (bioMérieux, Fransa)

API 20C AUX, 20 kuyucuklu tek kullanımlık plastik bir şeritten oluşur. Birinci kuyucuk, negatif kontrol; ikinci kuyucuk, içerdiği glukoz nedeniyle pozitif kontrol olarak değerlendirilir; diğer 18 kuyucuk ise farklı dehidrate karbonhidratları içerir ve 43 maya türü tanımlanabilir. Çalışmamızda, kuyucuklara, mikroorganizmanın McFarland 2 standardında hazırlanan süspansiyonlarının 1:70 dilüsyonu ekildi ve üreticinin önerileri doğrultusunda 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karbonhidrat asimilasyonunun göstergesi olan bulanıklık, araştırmacılar tarafından gözle değerlendirildi. İlaveten mikroorganizma süspansiyonundan 100 µl mısır unu (Oxoid, İngiltere)/Tween-80 (Sigma-Aldrich, ABD) besiyerine "Dalmau" yöntemiyle¹¹ ekildi ve 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası plaklar, hif veya yalancı hif varlığı açısından mikroskopik olarak incelendi. Bulanıklık ve hif oluşturma özellikleriyle elde edilen profil numaraları, API web sistemine girildi ve APILAB V4.0 programı ile değerlendirildi. Tanımlama sonuçları, "tanımlandı", "tanımlanamadı" ve "yanlış tanımlandı" şeklinde sınıflandırıldı.

Tüm maya izolatlarının, ilave konvansiyonel yöntemler uygulanmadan, sadece “API profil numaralarına göre tanımlama sonuçları” ayrıca kaydedildi. İzolatların Vitek ve API tanımlama profilleri, THSK-MRL’nda morfolojik ve fizyolojik özelliklerini içeren konvansiyonel yöntemlerle tanımlama sonuçları ile karşılaştırıldı ve aşağıdaki gibi sınıflandırıldı:

- (i) Doğru tanımlanan: Tür tanımlaması konvansiyonel yöntemlerle aynı ise veya Vitek/API birden fazla tür sonucu vermesi durumunda ilk verdiği sonucun konvansiyonel yöntem sonucu ile uyumlu olması,
- (ii) Yanlış tanımlanan: Konvansiyonel yöntemlere göre farklı bir tür tanımlanması veya Vitek/API birden fazla tür sonucu vermesi durumunda aralarında doğru tür tanısını içermemesi,
- (iii) Tanımlanamayan: Vitek/API sistemlerinin izolatu tanımlamada yetersiz kalması; bilinmeyen profil, vb.

Konvansiyonel tanımlama yöntemleri bu çalışma için referans yöntem olarak kabul edildi. Vitek ve API arasındaki uyumsuz sonuçlarda konvansiyonel tanımlama sonucu esas alındı.

Standart Suşlar

Çalışmada standart suşlar olarak; *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida dubliniensis* MYA 583, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Cryptococcus neoformans* ATCC 32268 kullanıldı. Bu suşlar, tekrarlanabilirlik ve kalite kontrol testleri için her iki sistemle de ardarda 10 gün çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmede, Ki-kare (X^2) ve Fisher’in kesin ki-kare testi kullanıldı; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Tüm analizler SPSS version 15.0.A. kullanılarak, THSK Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı’nda yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, konvansiyonel yöntemlerle 473 klinik maya izolatının, 6 cins içinde yer alan 17 türden oluştuğu saptanmıştır. Klinik izolatlara ilaveten beş standart ATCC suşunun tür düzeyinde tanımlama sonuçları, Vitek ve API ile karşılaştırılmıştır. Standart suşlar ile ardarda 10 gün boyunca yapılan testlerde, her iki sistemle de tüm suşlar için ilk tercih olarak tanımlama sağlanabilmiştir.

Sık görülen türlerde (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*), Vitek ile izolatların %95’i doğru tanımlanırken, %4.7’si yanlış tanımlanmış, %0.3’ü ise tanımlanamamıştır. API ile doğru tanımlama oranı %96, yanlış tanımlama oranı %3.5 olarak bulunmuş ve izolatların %0.5’i tanımlanamamıştır. Nadir görülen türlerde, Vitek ile izolatların %78.4’ü API ile %71.6’sı doğru tanımlanırken, her iki sistemle de izolatların %21.6’sı yanlış tanımlanmış ve API ile %6.8’i tanımlanamamıştır (Tablo I). Vitek ve API testleri, sık veya nadir görülen türleri tanımlama yönünden karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.155$).

Tablo I. Morfolojik ve Fizyolojik Tanımlama Referans Alındığında Vitek 2 Sistemi YST Maya Tanımlama Kartı ve API 20C AUX Sistemi Tanımlama Sonuçları

Maya türleri	Suş sayısı	Doğru tanımlanan		Yanlış tanımlanan		Tanımlanamayan	
		Vitek	API	Vitek	API	Vitek	API
Sık görülen türler							
<i>Candida albicans</i>	126	123	123	3	3	0	0
<i>Candida glabrata</i>	104	95	101	9	3	0	0
<i>Candida krusei</i>	38	38	37	0	1	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	87	81	80	6	5	0	2
<i>Candida tropicalis</i>	44	42	42	1	2	1	0
Toplam (%)	399	379 (95)	383 (96)	19 (4.7)	14 (3.5)	1 (0.3)	2 (0.5)
Nadir görülen türler							
<i>Candida kefyr</i>	26	24	23	2	3	0	0
<i>Candida lusitanae</i>	16	13	12	3	3	0	1
<i>Candida pelliculosa</i>	11	8	5	3	6	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	5	4	3	1	1	0	1
<i>Candida dubliniensis</i>	5	3	3	2	2	0	0
<i>Candida zeylanoides</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	1	1	1	0	0	1
<i>Blastoshizomyces capitatus</i>	2	0	0	2	1	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	1	1	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0	0	1	0	0	1
<i>Trichosporon asahii</i>	2	2	2	0	0	0	0
<i>Trichosporon mucoides</i>	2	2	2	0	0	0	0
Toplam (%)	74	58 (78.4)	53 (71.6)	16 (21.6)	16 (21.6)	0	5 (6.8)
Genel toplam (%)	473	437 (92.4)	436 (92.2)	35 (7.4)	30 (6.3)	1 (0.2)	7 (1.5)

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlamaya göre Vitek ve API ile farklı tanımlanan 47 suşun ticari sistemlere göre dağılımı sırasıyla %7.6 (36/473) ve %7.8 (37/473) olarak saptanmıştır (Tablo I ve II). Yanlış tanımlama veya tanımlayamama, her iki sistemle de, sık görülen türlerden en sık *C.parapsilosis* (Vitek: 6/87; API: 7/87) ve *C.glabrata* (Vitek: 9/104; API: 3/104) için, nadir görülen türlerden ise *C.pelliculosa* (Vitek: 3/11; API: 6/11) ve *C.dubliniensis* (Vitek ve API: 2/5) için tespit edilmiştir (Tablo II). API ile *C. guilliermondii* (API: 2/5) izolatlarının tanısı diğer türlere göre daha problemlidir. *B. capitatus* ve *S. cerevisiae* her iki sistemle de tanımlanamamıştır (Tablo I ve II).

Sık ve nadir görülen tüm türler birlikte değerlendirildiğinde, Vitek ve API ile doğru tanımlama oranı sırasıyla %92.4 (437/473) ve %92.2 (436/473) bulunmuştur. Vitek ile tüm suşların %7.4 (35/473)'ü yanlış tanımlanmış ve %0.2 (1/473)'si tanımlanamamıştır; API ile bu oranlar sırasıyla %6.3 (30/473) ve %1.5 (7/473) olarak saptanmıştır (Tablo I).

Tablo II. Morfolojik ve Fizyolojik Tanımlama Referans Alındığında Vitek 2 Sistemi YST Maya Tanımlama kartı ve API 20C AUX Sistemi ile Farklı Tanımlanan Türlerin Dağılımı

Maya türleri (Sayı)	Ticari sistemlerle tanımlama	
	Vitek 2	API
Sık görülen türler (23)		
<i>Candida albicans</i> (4)	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida lusitanae</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Candida famata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida glabrata</i> (9)	<i>Candida lipolytica</i> <i>Candida sake</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida norvegensis</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Candida utilis</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida colliculosa</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i>
<i>Candida parapsilosis</i> (7)	<i>Candida sake</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i>	Tanımlayamadı <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida lusitanae</i> <i>Candida famata</i> Tanımlayamadı
<i>Candida tropicalis</i> (2)	<i>Candida famata</i> Tanımlayamadı	<i>Candida albicans</i> <i>Candida albicans</i>
<i>Candida krusei</i> (1)	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida famata</i>
Nadir görülen türler (24)		
<i>Candida kefyi</i> (3)	<i>Candida sphaerica</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida kefyi</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida sphaerica</i>
<i>Candida pelliculosa</i> (6)	<i>Candida glabrata</i> <i>Candida ciferii</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida pelliculosa</i> <i>Candida pelliculosa</i> <i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida sphaerica</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida lusitanae</i> (4)	<i>Candida glabrata</i> <i>Candida sake</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida krusei</i> Tanımlayamadı
<i>Candida dubliniensis</i> (3)	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida albicans</i>

Tablo II. Morfolojik ve Fizyolojik Tanımlama Referans Alındığında Vitek 2 Sistemi YST Maya Tanımlama Kartı ve API 20C AUX Sistemi ile Farklı Tanımlanan Türlerin Dağılımı (Devamı)

Maya türleri (Sayı)	Ticari sistemlerle tanımlama	
	Vitek 2	API
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	<i>Candida sake</i> <i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida famata</i> Tanımlayamadı
<i>Blastoshizomyces capitatus</i> (2)	<i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i>	Tanımlayamadı <i>Candida krusei</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> (2)	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus albidus</i>	Tanımlayamadı <i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1)	<i>Candida famata</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	<i>Candida robusta</i>	Tanımlayamadı

Vitek ve API sonuçları %86.3 oranında birbiriyle tutarlı bulunmuş ve her iki testin tanı koyma kapasitelerinin istatistiksel olarak benzer olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA

Maya türlerinin tanımlamasında kullanılan başlıca özellikler, mayaların karbon ve ni-trojen kaynaklarındaki farklılıklar olmakla beraber, hücre morfolojileri ve eşeyli üreme yapılarının değerlendirilmesi de ayırıcı tanıda çok önemlidir^{5,11,12}. Günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması zaman alıcı ve emek yoğun olduğu için, *Candida* spp. ve diğer maya mantarlarının tanımlanmasında hızlı tanımlama sağlayan ticari sistemler yaygın olarak kullanılmaktadır^{9,13}. Bunlardan biri, ince plastik kartlarda bulunan mikro-kuyucuklardaki üreme ve metabolik değişiklikleri kolorimetrik bir yöntem ile saptayan Vitek 2 otomotize sistemi YST maya tanımlama kartı¹³⁻¹⁷, diğeri de API 20C AUX sistemidir^{9,13,17}. Çalışmadaki amacımız; türe özgü direnç sınır değerlerinin belirlenmesi sonucu doğru tanımlamanın daha da önemli bir hale gelmesi ile birlikte klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan Vitek ve API sistemlerinin sık görülen *Candida* spp. ve nadir görülen tanımlanması güç olan diğer mayaların, tür düzeyinde tanımlama performansının izlenmesidir.

Sık görülen türlerin (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.krusei*) tanımlanmasında her iki sistemin performansı yüksek ve tanımlama oranları birbirine yakın (Vitek: %95; API: %96) bulunmuştur. Nadir görülen türlerin tanımlanmasında Vitek'in performansı (%78.4) API'den (%71.6) daha yüksek olarak saptanmıştır. Her iki sistemle de izolatların %21.6'sı yanlış tanımlanmış ve API ile %6.8'i tanımlanamamıştır (Tablo I). Meletiadis ve arkadaşları¹⁸ üç ticari maya tanımlama sistemini karşılaştırdıkları çalışmada; bulgularımıza benzer şekilde, Vitek ve diğer ticari sistemlerin performansını sık görülen türlerde daha yüksek (Vitek %92, Api ID32C %94, Auxacolor %95), nadir türlerde daha düşük ve üç sistem arasında Vitek'in performansının daha iyi olduğunu saptamışlardır (Vitek %64, Api ID 32C %56, Auxacolor %43).

Vitek ve API ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda farklı oranlar bildirilmektedir. Çok merkezli bir çalışmada, 660 maya izolatu Vitek ve API ID 32C ile tanımlanmış ve duyarlılık

oranları sırasıyla %92.6 ve %98.3 olarak bulunmuştur¹⁹. Yine bu çalışmada, sadece bir metod ile tüm maya türlerinin doğru tanımlanamayacağı en az iki metodun kullanılmasının uygun olacağı belirtilmiştir¹⁹. Vitek, API ID 32C, API 20C AUX, Yeast Star, Auxacolor, Rapid Yeast Plus, API Candida sistemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; sistemlerin doğru tanımlama oranları %59.6 ile %80.8 arasında raporlanmıştır²⁰. Yine aynı çalışmada API ID 32C ve Vitek ile mayaların doğru tanımlanma oranları sırasıyla %63.5 ve %59.6 olarak bulunmuş ve germ tüp negatif olan 29 izolatın doğru tanımlanma oranları sırasıyla %72.4 ve %62.1 olarak belirtilmiştir²⁰. Çalışmamızda nadir türlerin tanımlanmasındaki sorunlar (Vitek: %78.4; API: %71.6) morfolojik değerlendirme de içeren testlerin ilave edilmesi ile çözümlenmiştir.

Candida famata (Vitek n= 4, API n= 7), *C.sake* (Vitek n= 2) ve *C.utilis* (API n= 1) gibi epidemiyolojik olarak nadir görülen türlerin, konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında yanlış tanımlandığı tespit edilmiştir (Tablo II). Bu nedenle sadece ticari sistemlerle maya tanımlaması yapılan laboratuvarlarda; hastaneler, ülkeler ve dünyadaki en sık etken olan maya tür dağılımlarını bilerek tanımlama sonuçlarının yorumlanması önemlidir. Ticari sistemlerle yanlış tanımlanan türlerin çoğunluğu THSK-MRL'ında, mısır unu/Tween-80 besiyeri plaklarının 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında mikroskopik olarak değerlendirilmesi ile yalancı hif, gerçek hif, artrospor, klamidospore veya kapsül varlığının gösterilmesi sonucu kolayca tanımlanabilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da morfolojik tanımlamanın önemi vurgulanmaktadır^{9,20-22}.

Tür tanımlamasının doğru yapılabilmesi için, klinik örneklerde üreyen izolatların öncelikle saf kültürlerinin elde edilmesi önemlidir. Bu nedenle kromojenik besiyerlerinin kullanımının karışık kültürlerin ayırımında kullanılmasının yararlı olduğu çeşitli çalışmalarla da desteklenmektedir^{8,9,23}. Benzer şekilde, ticari sistemlerle yanlış tanımlanan [Vitek: 35/473 (%7.4); API: 30/473 (%6.3)] veya tanımlanamayan [Vitek: 1/473 (%0.2); API: 7/473 (%1.5)] türler, antifungal duyarlılık test sonuçlarının yanlış yorumlanmasına ve olasılıkla hasta tedavisinin yanlış yönlendirilmesine neden olması yönünden önemlidir.

Maya tanımlamasında Vitek ID-YST ve API 20C AUX sistemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; suşların %92.1'i (222/241) kesin olarak tanımlanırken, %4.6 (11/241)'i düşük oranda tanımlanmıştır¹⁵. İnci ve arkadaşları²⁴ tarafından ülkemizde yapılan bir çalışmada, 41 *C.albicans* dışı maya izolatı Vitek 2 YST kart ve API 20C AUX ile tanımlanmış olup, her iki sistemle izolatların 34 (%82.9)'ü aynı tür olarak tanımlanırken, yedisinde (%17.1) farklı sonuçlar elde edilmiştir. Tüm klinik izolatlar birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızdaki doğru tanımlanma oranları (Vitek: %92.4; API: %92.2) Graf ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmalarıyla uyumlu bulunurken, İnci ve arkadaşlarının²⁴ çalışmalarından daha yüksek olarak saptanmıştır. Ticari sistemlerle izolatların tür tanımlamalarında özellikle *C.glabrata* başta olmak üzere *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* türlerinin tanımlanmasında dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir²²⁻²⁴. Bu çalışmada da, her iki sistemle de türlerin yanlış tanımlanması/tanımlanamaması, sık rastlanan türlerden *C.parapsilosis* (Vitek: 6/87; API: 7/87) ve *C.glabrata* (Vitek: 9/104; API: 3/104) için, nadir rastlanan türlerden ise *C.lusitanae* (Vitek: 3/16; API: 4/16), *C.pelliculosa* (Vitek: 3/11; API: 6/11) ve *C.guilliermondii* (Vitek: 1/5; API: 2/5) için saptanmıştır (Tablo II). *Blastoschizomyces capitatus* ve *S.cerevisiae* her iki sistemle

de tanımlanamamıştır. Çeşitli çalışmalarda da benzer türlerde tanımlama sorunlarından bahsedilmektedir^{15,18}.

Vitek ile aynı gün içinde (18 saat) hızlı sonuç alınabilmesi, kullanımının basit olması ve mikolojiye özgü deneyim gerektirmemesi sistemin avantajlı yönleridir. Bu sistemler arasında referans yöntem olarak kabul edilen API ile sonuçların alınması uzun (48-72 saat) sürmektedir¹³. API profil numaralarında, bulanıklığa ilaveten hif oluşturma özelliklerinin de değerlendirmeye dahil edilmesi, *C.glabrata* suşları başta olmak üzere, tür tanımlamasında Vitek'e göre daha başarılı bulunmuştur. Diğer çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir^{9,13}.

Sonuç olarak, Vitek ve API sistemlerinin performansı birbirine yakındır ($p= 0.155$). İki sistemde de sık karşılaşılan türlerde tanımlama oranları daha yüksek olup, nadir görülen türlerde oranlar düşmektedir. Biyokimyasal özellikleri esas alan bu ticari sistemlerle nadir görülen türler tanımlandığında, tanımlama sonuçları, hastane, ülke ve dünyadaki mayaların tür dağılımı epidemiyolojik verileri doğrultusunda yorumlanmalı ve morfolojik tanımlama ile birlikte değerlendirilmelidir. İlaveten rutin laboratuvarlarda mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında ticari sistemlerin beraberinde morfolojik bulguların ve kromojenik besiyerlerinin kullanımının, birden fazla mayanın etken olduğu karışık enfeksiyonların doğru tanımlanması ve tedavisinde de önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Laboratuvardaki titiz çalışmaları için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı çalışanları Orhan Danışmaz, Nihal Alem'e ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesindeki destekleri için Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanı Dr. Selmur Topal ve Erken Uyarı Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı'ndan Uzm. Dr. Fehminaz Temel'e çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(7): 1163-9.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-63.
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48(5): 503-35.
4. Berdal JE, Haagenen R, Ranheim T, Bjørnholt JV. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a norwegian secondary hospital. *PLoS One* 2014; 9(7): e103916.
5. Brandt ME, Johnson EM. Mycology, pp: 1744-992. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2011, 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.
6. Yenigün Koçak B, Kuloğlu F, Doğan Çelik A, Akata F. Evaluation of epidemiological characteristics and risk factors of candidemia in adult patients in a tertiary-care hospital. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 489-503.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. CLSI Document M27-S4, 2012. CLSI, Wayne, PA.

8. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39(1): 9-33.
9. Borman AM, Szekeley A, Palmer MD, et al. Assessment of accuracy of identification of pathogenic yeasts in microbiology laboratories in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2012; 50(8): 2639-44.
10. Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(Suppl 2): 8-24.
11. Larone DH (ed). *Medically Important Fungi: A Guide To Identification*. 2002, 4th ed. ASM Press, Washington, D.C.
12. Hazen KC, Howell SA. Full identification of yeasts, pp: 8.8. In: Garcia LS, Isenberg HD, Jorgensen JH, Pfaller M, Landry ML (eds), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2007, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
13. Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1087-92.
14. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39(1): 9-33.
15. Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1782-5.
16. Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A. Evaluation of Vitek 2 for the identification of *Candida* yeasts. *Rev Argent Microbiol* 2014; 46(2): 107-10.
17. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol* 2006; 44(1): 227-8.
18. Meletiadiis J, Arabatzis M, Bompola M, et al. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49(7): 2722-7.
19. Lo HJ, Ho YA, Ho M. Factors accounting for misidentification of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34(3): 171-7.
20. Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, Meis JF. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 1999; 52(4): 271-3.
21. Fenn JP, Segal H, Barland B, et al. Comparison of updated Vitek yeast biochemical card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994; 32(5): 1184-7.
22. Massonet C, Van Eldere J, Vaneechoutte M. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2209-11.
23. Coignard C, Hurst SF, Benjamin LE, Brandt ME, Warnock DW, Morrison CJ. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 858-61.
24. İnci M, Atalay MA, Koç AN, Özer B, Kılınç Ç, Durmaz S. Comparison of VITEK 2 YST Card and API 20C AUX system in identification of nonalbicans *Candida* species. *Dicle Med J* 2012; 39(1): 80-2.