

CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASINDA “API ID 32C” VE “RAPID YEAST PLUS” SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Birgül KAÇMAZ*, Ayşe Bilge SİPAHİ**, Altan AKSOY***

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

*** Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE

ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *Candida* suşunun tür düzeyinde tanımlanmasında Rapid Yeast Plus (RYP) (Remel Inc., Lenexa, KS, ABD) sisteminin sonuçları ile standart yöntem olarak API ID 32C (bioMerieux, Fransa) sisteminin sonuçları karşılaştırılmıştır. API ID 32C sistemi ve RYP sistemi ile 92 suş aynı tür olarak tanımlanırken, altı suş farklı isimlendirilmiş, iki suş RYP sistemi ile tanımlanamamıştır. API ID 32C sistemine göre RYP sistemi ile farklı isimlendirilen ve isimlendirilemeyen suşların enfeksiyon etkeni olarak nadiren saptanan izolatlar olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak enfeksiyon etkeni olarak sık izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, dört saat gibi kısa sürede sonuca ulaşılabilmesi için RYP sisteminin kullanılmasının uygun olduğu söylenebilir. Bu sistemle güvenilir sonuca ulaşabilmek için üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygun bulanıklıkta inokulum hazırlanması ve inkübasyon sonrası oluşan renk değişikliklerinin değerlendirilmesinde dikkatli olunması gerektiği vurgulanmalıdır. Bunlara rağmen tanımlanamayan suşlarda ise ek bir sistemin kullanılması uygun olabilir.

Anahtar sözcükler: API ID 32C sistemi, *Candida* türleri, mantar tanımlama metodları, Rapid Yeast Plus sistemi

SUMMARY

Comparison of “API ID 32C” and “Rapid Yeast Plus” Systems for Identification of *Candida* Species

API ID 32C (bioMerieux, France) system were used as the standard system for identifying 100 *Candida* strains to species level which were isolated from various clinical specimens and results were compared with the results of Rapid Yeast Plus (RYP) (Remel Inc., Lenexa, KS, USA) system. Ninety-two strains were identified as the same species with both systems. Six strains were identified as different species and 2 strains remained unidentified with RYP. It was observed that strains which remained unidentified or identified as different species by RYP were uncommon species rarely isolated from clinical specimens.

In conclusion, it could be said that RYP system is acceptable for identifying *Candida* species frequently isolated from clinical specimens for obtaining the results in 4 hours. The turbidity of the inoculum must be prepared as manufacturer's suggestions and colour changes after incubation period should be carefully evaluated to have reliable results with RYP system. It may be suggested that additional systems might be used for strains which remain unidentified.

Keywords: API ID 32C system, *Candida* species, Rapid Yeast Plus system, yeast identification methods

Yazışma adresi: Birgül Kaçmaz, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

Tel.: (0312) 202 40 83, GSM: (0532) 743 72 29

e-posta: kacmazbirgul@mynet.com

Alındığı tarih: 01.11.2006, revizyon kabulü: 23.11.2006

GİRİŞ

İmmün sistemi baskılanmış hastalardaki artış (transplant hastaları, hematolojik tümörlü hastalar ya da kazanılmış immün yetmezlik sendromlu [AIDS]) ve medikal uygulamalardaki gelişmeler (yaygın geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, antikanser ilaçlar ve santral venöz kateterler) yeni fırsatçı mantarların ortaya çıkmasına katkıda bulunan en önemli faktörler arasındadır^(1,3).

1960'larda yaklaşık beş *Candida* türü olduğu düşünülürken, son yıllarda patojen olduğu bilinen en az 17 *Candida* türü belirlenmiştir⁽⁹⁾. *Candida* türlerinin tanımlanmasında mikroskopik morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve substrat asimilasyonunun değerlendirilmesine dayanan bazı metodlar kullanılır. Bu metodlar oldukça zaman gerektiren ve rutin laboratuvarında iş yükünü arttıran yöntemlerdir. Bu nedenle 4-72 saat içinde sonuç veren, uygulaması daha kolay olan çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir^(6,7,11). Bunlardan bazıları biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonları değerlendirebilen el ve/veya otomatize olarak kullanılabilen sistemlerdir. API ID 32C inkübasyondan 24-48 saat sonra, Rapid Yeast Plus (RYP) ise inkübasyondan 4-5 saat sonra sonuç verebilen sistemlerdir. API ID 32C sistemi çeşitli araştırmacılar tarafından standart tanı yöntemi olarak önerilmiştir⁽⁷⁾.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında standart yöntem olarak API ID 32C sistemi kullanılmış, sonuçları RYP sistem ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden alınmış materyaller kanlı agar, eozin-metilen mavisi agar besiyerlerinin yanı sıra Sabouraud dekstroza agar besiyerine çift tüp olmak üzere ekilmiştir. Bu tüplerden biri oda ısısında, diğeri 37°C'de bir hafta süreyle inkübe edilmiştir. Günlük kontroller sırasında üreme olan besiyerlerinde etken olduğu düşünülen kolonilerden tanımlama yapmak amacıyla direkt mikroskopi ve Gram yöntemi ile boyama yapılmıştır. Gram boyası ile hazırlanan preparatlarda maya saptananlara hayvan serumu kullanılarak 37°C'de üç saat inkübasyonla germ tüp testi uygulanmıştır. Germ tüpü pozitif veya negatif olan maya morfolojisine sahip 100 suşun kolonilerinden hazırlanan inokulumlar RYP (Remel Inc., Lenexa, KS, USA) ve API ID 32C (bioMérieux, France) sistemi ile tanımlanmıştır. Çalışma prosedürü firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Tanımlama çalışmaları sırasında kontrol suş olarak *C.albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 100 *Candida* suşunun 38'inde germ tüpü testi pozitif, 62'sinde negatif olarak saptanmıştır. Germ tüpü testi pozitif olan suşların hepsi API ID32C ile *C.albicans* olarak isimlendirilmiştir. API ID32C ile germ tüpü testi negatif olan 62 suşun 15'i *C.glabrata*, 12'seri *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*, dokuzu *C.lusitaniae*, altısı *C.krusei*, ikişeri *C.stellatoidea* ve *C.guilliermondii*, bireri *C.kefyr*, *C.ingens*, *C.sake* ve *Cryptococcus albidus* olarak tanımlanmıştır. RYP sistemiyle suşların 92'si API ID32C sistemindeki gibi isimlendirilmişken altısı farklı tür olarak tanımlanmış, iki suş ise RYP sistemiyle tanımlanamamıştır.

Her iki sistemle aynı tür olarak tanımlanan suşlar tablo 1'de, farklı tür olarak tanımlanan veya yalnız API ID32C ile tanımlanan suşlar tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 1: API ID 32C ve RYP ile aynı tür olarak tanımlanan türler.

<i>C.albicans</i>	38
<i>C.glabrata</i>	15
<i>C.tropicalis</i>	12
<i>C.parapsilosis</i>	11
<i>C.lusitaniae</i>	8
<i>C.krusei</i>	6
<i>C.stellatoidea</i>	2
Toplam	92

Tablo 2: API ID 32C ve RYP ile farklı tür olarak tanımlanan suşlar.

API ID 32C	RYP
<i>C.lusitaniae</i>	<i>Hansenula wingei</i>
<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.lambica</i>
<i>C.guilliermondii</i>	<i>C.tropicalis</i>
<i>C.guilliermondii</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>C.kefyr</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>C.ingens</i>	<i>C.krusei</i>
<i>C.sake</i>	Tanımlanamadı
<i>Cryptococcus albidus</i>	Tanımlanamadı

TARTIŞMA

Candida türleriyle oluşan mantar infeksiyonları özellikle immün sistemi baskılanmış olan bireylerde önemli hastane kaynaklı infeksiyon etkenleri arasındadır⁽⁸⁾. Mantarların antifungal ajanlara duyarlılığı değişkendir. Bilindiği gibi *C.lusitaniae* suşları amfoterisin B'ye dirençli, *C.krusei* ve *C.glabrata* flukonazole dirençlidir. Mantarların tür düzeyinde hızlı identifikasyonu, antifungal duyarlılıklarına hemen ulaşılamayacağı için, uygun ampirik antifungal tedavi açısından önemlidir. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarı mantarların tanımlanması için güvenilir, ucuz, kolay uygulanabilir ve hızlı bir sistemi seçmelidir⁽⁷⁾.

Rapid Yeast Plus sistemi konvansiyonel ve renk veren substratları içeren 18 kuyucuktan oluşan bir paneldir. Tanımlanması istenen suşun kültürü 3 McFarland standart bulanıklığında hazırlanarak kuyucuklara dağıtılır. Panel 30°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra bazı kuyucuklara reagent damlatılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda oluşan renk değişiklikleri gözle okunur, pozitif ve negatif olarak değerlendirilir⁽⁷⁾.

API ID 32C sistemi ise karbonhidrat, organik asit, aminoasit, eskülin asimilasyonu ve sikloheksimit duyarlılığına dayanan 32 kuyucuktan oluşan bir tanımlama sistemidir. Panel 30°C'de inkübe edilir, 24 ve 48'inci saatlerde reaksiyonlar değerlendirilir. Kuyucuklardaki karbonhidrat asimilasyonu karbonhidrat içermeyen kontrol kuyucuğun bulanıklığına göre pozitif ve negatif olarak değerlendirilir. 63 maya türünü güvenilir bir şekilde tanımlayabildiği için çoğu araştırmacı bu sistemi standart sistem olarak kullanmışlardır⁽⁷⁾.

Bu çalışmada 100 *Candida* suşu bu iki sistemle tanımlanmıştır. Bu suşların çoğu infeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan türlerdir. Hastane kaynaklı infeksiyon etkeni olarak ilk sırayı *C.albicans* almakla birlikte antifungal direnci olduğu bilinen albicans-dışı türlerle karşılaşma oranı hızla artmaktadır. Ülkemizde en sık görülen *C.albicans* dışı *Candida* türleri sırasıyla *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei* olarak bildirilmiştir^(4,13).

API ID 32C ile tanımlanan suşların % 92'si RYP sistemi ile aynı tür olarak tanımlanırken bu suşların infeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan suşlar olduğu görülmektedir. RYP ile API ID 32°C'ye göre farklı tanımlanan veya tanımlanamayan suşların ise genel olarak infeksiyonlardan daha nadir izole edilen suşlar olduğu dikkati çekmektedir. Kitch ve ark.⁽¹¹⁾, Heelan ve ark.⁽¹⁰⁾, Wadlin ve ark.⁽¹⁴⁾ klinik olarak önemli mantarların tanımlanmasında aynı gün içinde güvenli sonuçlar elde ettiklerinden RYP sisteminin rutin laboratuvarında kullanımını önermişlerdir. Aynı şekilde Espinel-Ingroff ve ark.⁽⁵⁾ da sık görülen mantar türlerinin bu sistemle % 95 oranında, nadir görülen türlerin ise ancak % 75-79 oranında doğru olarak tanımlanabildiğini bildirmişlerdir. Bu sistemle tanımlamadaki hatalar uygun şekilde inokulum bulanıklığının hazırlanmamasından, inkübasyon bitiminde oluşan renk değişikliklerinin değerlendirilmesindeki zorluklardan kaynaklanabileceği gibi suşların üremeleri için kullanılan besiyerinin de etkisinden olabilir⁽⁷⁾. Odds⁽¹²⁾ Sabouraud agar'da kullanılan peptonun tipine bağlı olarak mantarlarda asit fosfataz üretiminin saptanmasının değişebileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak sıklıkla infeksiyon etkeni olan mantar türlerinin tanımlanmasında, API ID 32C sistemine göre RYP sistemi ile 100 suşun 92'si doğru olarak isimlendirilmiştir. Aynı gün içerisinde dört saat gibi kısa sürede tanımlama yapabildiği için RYP sisteminin kullanılmasının uygun olacağı söylenebilir. Bu tanımlama sisteminin

güvenilirliğini artırmak için uygun şekilde inokulum hazırlanması ve inkübasyon bitimindeki renk değişikliklerinin değerlendirilmesinde dikkatli davranılması gerektiği unutulmamalıdır. Aynı zamanda ökaryotik olan mantarların ve özellikle *Candida*'ların ileri derecede fenotipik varyasyon göstermeleri nedeniyle bu sistemle tam olarak tanımlanamayan veya hiç tanımlanamayan suşların da olabileceği unutulmamalıdır⁽²⁾. Bu suşlar için ek bir sistemin kullanılması uygun olabilir.

KAYNAKLAR

1. Anaissie E: Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer and review, Clin Infect Dis 1992;14(Suppl 1):43-51.
2. Bruun B, Westh H, Stenderup J: Evaluation of the ATB32 C system for identification of clinical yeast isolates, Clin Microbiol Infect 1995;1(2):134-8.
3. Coleman D, Rinaldi MG, Haynes KA et al: Importance of Candida species other than C.albicans as opportunistic pathogens, Med Mycol 1998;36(Suppl 1):156-65.
4. Ener B, Heper Y, Akçağlar S ve ark.: Bir üniversite hastanesinde beş yıllık süreç içinde gelişen fungemiler, Flora 2003;8(2):138-43.
5. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J: Comparison of Rapid Yeast Plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens, J Clin Microbiol 1998;36(4):883-6.
6. 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.
7. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P: Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods, Med Mycol 2001;39(1):9-33.
8. Fridkin SK, Jarvis WR: Epidemiology of nosocomial fungal infections, Clin Microbiol Rev 1996;9(4):499-511.
9. Hazen KC: New and emerging yeast pathogens, Clin Microbiol Rev 1995;8(4):462-78.
10. Heelan JS, Sotomayor E, Coon K, D'Arezzo JB: Comparison of the Rapid Yeast Plus panel with the API 20C yeast system for identification of clinically significant isolates of Candida species, J Clin Microbiol 1998;36(5):1443-5.
11. Kitch TT, Jacobs MR, McGinnis MR, Applebaum PC: Ability of Rapid Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeast within 5 hours, J Clin Microbiol 1996;34(5):1069-71.
12. Odds FC: Sabouraud('s) agar, J Med Vet Mycol 1991;29(6):355-9.
13. Otağ F, Ersöz G, Doruk N, Erköse G, Erturan Z, Kaya A: Yoğun bakım ünitesi hastalarından kolonizasyon veya infeksiyon etkeni olarak soyutlanan Candida cinsi mantarlar, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34(2):91-7.
14. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin J: Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory, J Clin Microbiol 1999;37(6):1967-70.