

Candida suşlarının identifikasyonunda farklı yöntemlerin karşılaştırılması

Comparison of different systems for identification of Candida strains

Nimet Yiğit¹, Ayşe Esin Aktaş², Hakan Uslu²

¹Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü ²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD

İletişim / Correspondence: Nimet Yiğit Adres / Address: Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü Aziziye Araştırma Hastanesi Yenişehir/ Erzurum Tel: 0442 3166333/2430 Faks: 04423156044 e-mail: nimyigit@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 118 Candida suşu rutin yöntemler ve ticari bir yöntem olan API20C ile identifiye edilmiş ve sonuçlar MIS yöntemiyle elde edilen hücresel yağ asitlerinin profili ile karşılaştırılmıştır. Candida suşları, Candida albicans (n=74), Candida tropicalis (n=28), Candida glabrata (n=7), Candida parapsilosis (n=3), Candida krusei (n=4) and Candida guilliermondii (n=2) olarak tanımlanmıştır. Yağ asiti analizinde, maya izolatlarının sabouraud dextrose agarda 28°C de 24 saatlik kültürü hazırlanmıştır. Parçalanmış koloniler, metillenmiş, ekstrakte edilmiş ve kromatografik analizleri sistem kılavuzuna göre yapıldı. 118 izolatin 79 (%66,9)'u tür düzeyinde doğru, 27 (%22,8)'i yanlış tiplendirilmiş ve 12 (%10,1)'i tiplendirilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Candida Türleri, Tiplendirme, Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi

SUMMARY

Chromatographically analyzes cellular fatty acids and compares the results with the fatty acid profiles in its database. Candida strains were identified as and included Candida albicans (n=74), Candida tropicalis (n=28), Candida glabrata (n=7), Candida parapsilosis (n=3), Candida krusei (n=4) and Candida guilliermondii (n=2). In preparation for fatty acid analysis, yeast isolates were subcultured onto sabouraud dextrose agar and were incubated at 28 °C for 24h. The colonies of yeast were saponified, methylated, extracted, and chromatographically analyzed according manufacturer's instructions. Of the 118 isolates tested, 79 (66,9%) were correctly identified to the species level, with 27 (22,8%) being incorrectly identified and 12 (10,1%) giving no identification.

Key Words: Candida Species, Identification, Microbial Identification System

GİRİŞ

Son yıllarda mantar infeksiyonlarının sıklığı kanser, AIDS, organ transplantasyonu, kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli nedenlere bağlı immün yetmezlikli hasta sayısının artması, invazif girişimlerin yaygınlaşması, geniş spektrumlu antibakteriyel ve kortikosteroid ilaç tedavileri gibi nedenlere bağlı olarak artış göstermektedir. Yüksek morbidite ve mortalite sebebi olan invazif mantar infeksiyonlarının tedavisindeki başarı oranı etken türlerin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlan-

masına bağlıdır (1).

Günümüzde patojen olduğu düşünülen Candida türlerinin sayısı artmaktadır. Candida türlerinin tiplendirilmesi, fenotipik identifikasyona dayalı mikroskopik morfoloji, germ tüp oluşturma, klamidiospor oluşumu, kromojenik besiyerlerinde koloni rengi değerlendirilmesi gibi metodlar ile başlamıştır. Daha kısa sürede sonuç veren biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonların değerlendirilmesine dayalı manuel olarak yada otomatize olarak kullanılabilen API 20C, API Candida, Ra-

pID Yeast Plus, MicroScan Yeast Identification Panel, VITEK Yeast Biochemical Card gibi sistemler rutin kullanıma girmeye başlamıştır. Son yıllarda, PCR temelli moleküler tanı yöntemleri *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasında önem kazanmaktadır (2).

Hücre sel yağ asitlerinin belirlendiği gaz-sıvı kromatografisi metodu çevre ve klinik kökenli bakterilerin, mikobakterilerin ve mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS=Microbial Identification System, MIDI, INC, Newark, DE, USA) türlere özgü olan tüm yağ asiti metil esterleri, dimetil asetil, aldehid gibi bileşikler yüksek ayırıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MIS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvar da izole edilen bir çok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır (3-7).

Bu çalışmada MIS sistemi değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Candida suşları. Atatürk Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji rutin laboratuvarına değişik klinik ve polikliniklerden gönderilen 40'ı kan, 35'i idrar, 16'sı yara, 10'u boğaz salgısı 17'si vajina örneğinden izole edilen ve infeksiyon etkeni olduğu düşünülen toplam 118 *Candida* suşu incelenmiştir. Bu suşlar laboratuvarımızda germ tüp oluşturma, tween 80'li corn meal agarda mikromorfoloji incelenmesi, kromojenik besiyerinde koloni renk ve morfolojilerinin değerlendirilmesi ve API 20C sistemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Çalışmamızda standart suş olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.glabrata* ATCC 90030 kullanılmıştır. İdentifikasyonu yapılan bu suşlar Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde MIS sistemi ile yeniden değerlendirilmiştir.

MIS. MIS sistemi dört ana parçadan oluşan ve bilgisayar kontrolünde çalışan bir sistemdir: 1-Gaz kromatografisi 2-Kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen,azot ve hava) 3-Bilgisayar sistemi 4-Database'ler (Sherlock system software, library generation software, bakteri ve mantar için hazırlanmış kütüphaneler) (8).

MIS sistemi ile değerlendirilecek *Candida* suşlarının Sabouraud dextrose agarda 28 °C de 24 saatlik kültürü hazırlanmıştır. Besiyerinde üreyen mayalardan bir öze dolusu alınarak steril 5ml lik cam tüpe aktarılarak üzerlerine 1ml saponifikasyon çözeltisi (hücre parçalayıcı [NaOH 45 gr, metil alkol 150ml, saf su 150 ml]) eklenmiş 5-10 saniye çalkalanmış ve 25 dakika süre ile 100°C lik su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır. Bu işlem birinci basamak olup hücrelerin parçalanıp yağ asitlerinin serbest kalmasına neden olmaktadır.

İkinci basamakta tüplere 2 ml metilasyon çözeltisi (HCL₂ 325 ml, metil alkol 275ml) eklenerek 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 10 dakika 80°C'de daha sonra 2 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Bu aşamada serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş olur ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri oluşur ve yüksek sıcaklıkta uçucu özellik kazanır.

Üçüncü basamakta soğutulmuş tüplere 1,25 ml saflaştırma çözeltisi (hekzan 200 ml, meti-tert-butil eter 200 ml) eklenerek 10 dakika çalkalanmıştır. Bu süre sonunda tüpte iki faz oluşmuştur. Alt faz asidik, üstte organik sıvı faz oluşup Pasteur pipeti ile asidik faz toplanmıştır.

Son aşama bazik yıkama aşamasıdır. Bu aşamada tüplere 3ml yıkama çözeltisi (NaOH 10,8 gr, saf su 900 ml) eklenip 5 dakika çalkalanıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bazik yıkama aşamasında yağ asit metil esterleri daha saf olarak elde edilmiştir. Süre sonunda tüpün üst kısmında kalan yağ asitlerinin saf metil esterleri Pasteur pipeti ile toplanıp 2 ml lik gaz kromatografisi tüplerine aktarılmıştır. Tüpler MIS cihazı üzerindeki örnek toplama tepsisine yerleştiril-

miş ve sistem kılavuzuna uygun olarak tek tek analiz edilmiştir. Sonuçlar cihazın bilgisayarı tarafından YST 28 ve YSTCLN kütüphanelerine göre değerlendirilmiştir (8).

BULGULAR

Çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen 118 candida suşu klasik rutin yöntemler ile *C.albicans* (n=74), *C.tropicalis* (n=28), *C.glabrata* (n=7), *C.parapsilosis* (n=3), *C.krusei* (n=4) ve *C.guilliermondii* (n=2) olarak tanımlanmıştır. MIS sistemi ile tekrar değerlendirilen bu suşların 79 (%66,9)'u klasik identifikasyon sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Doğru olarak tanımlanan suşların 58'inin *C.albicans*, 13'ünün *C.tropicalis*, 3'ünün *C.glabrata*, 2'sinin *C.parapsilosis*, 2'sinin *C.krusei*, 1'inin *C.guilliermondii* türüne ait oldukları saptanmıştır. Çalışmada MIS sistemi ile yeniden değerlendirilen 118 Candida suşununun 27 (%22,8)'isi klasik tanı yöntemleri ile elde edilen sonuçlarına uygunluk göstermemiştir. Klasik yöntemler ile *C.albicans* olarak tanımlanan 10 Candida suşu MIS ile *C.lusitaniae* (n=4), *C.kefyr* (n=3), *C.glabrata* (n=1), *Zygosaccharomyces* (n=1) ve *C.tropicalis* (n=1) olarak tanımlanmıştır. *C.tropicalis* suşlarının 12'si, *C.glabrata* suşlarının 3'ü, *C.krusei* suşlarının 1'i ve *C.guilliermondii* suşlarının 1'i MIS ile yanlış tanımlanmıştır. Toplam 12 (%10,1) suş ise tanımlanamamıştır. MIS ile doğru ve yanlış tanımlanan ve tanımlanamayan suşların klasik yöntemler ile identifiye edilenlerle karşılaştırılması Tablo 1 ve yanlış tanımlanan suşların sonuçları Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 1. . MIS ile tanımlanan suşların klasik yöntemler ile identifiye edilen suşlar ile karşılaştırılması.

Klasik yöntemler ile tanımlanan suşlar	MIS ile tanımlanan suşlar		
	Doğru tanımlanan suşlar	Yanlış tanımlanan suşlar	Tanımlanamayan suşlar
<i>C.albicans</i> (n=74)	58	10	6
<i>C.tropicalis</i> (n=28)	13	12	3
<i>C.glabrata</i> (n=7)	3	3	1
<i>C.parapsilosis</i> (n=3)	2	-	1
<i>C.krusei</i> (n=4)	2	1	1
<i>C.guilliermondii</i> (n=2)	1	1	-
Toplam (n=118)	79	27	12

Tablo 2. . MIS ile yanlış tanımlanan suşlar ve tanı sonuçları

MIS ile yanlış tanımlanan suşlar	Tanı sonuçları
<i>C.albicans</i> (n=10)	<i>C.lusitaniae</i> (n=4), <i>C.kefyr</i> (n=3), <i>C.glabrata</i> (n=1), <i>Zygosaccharomyces</i> (n=1), <i>C.tropicalis</i> (n=1)
<i>C.tropicalis</i> (n=12)	<i>C.albicans</i> (n=10), <i>C.aaseri</i> (n=1), <i>C.polymorpha</i> (n=1)
<i>C.glabrata</i> (n=3)	<i>C.albicans</i> (n=1), <i>C.kefyr</i> (n=1), <i>S.cerevisiae</i> (1)
<i>C.krusei</i> (n=1)	<i>Zygosaccharomyces</i> (n=1)
<i>C.guilliermondii</i> (n=1)	<i>C.apis</i> (n=1)
Toplam (n=27)	

TARTIŞMA

Candida cinsi içinde yaklaşık 200 tür bulunmaktadır ve bunların 20'si insan ve hayvanlarda infeksiyon etkenidir. *C.albicans* önceleri daha sıklıkla izole edilirken son yıllarda diğer candida türleri artış göstermektedir. Klinik örneklerden izole edilen Candida türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması, antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde ve tedavi başarısının artmasında önemlidir (9).

MIS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvarında izole edilen birçok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır. Değişik çalışmalarda araştırmacılar klinik örneklerden izole ettikleri Gram negatif anaerob bakterilerin (10), Gram negatif nonfermentatif bakterilerin (11), stafilokokların (7) ve mikobakterilerin (12) tanımlanmasında kullanmışlardır. Sistemin bilgisayar kütüphane verilerinin geliştirilmesi ile bu sistem mayaların tür düzeyinde identifikasyonu için de kullanılmaya başlamıştır (3-6).

C.albicans ve diğer türlerin identifikasyonları klasik ve ticari biyokimyasal sistemler ile 24 ile 72 saat sürede yapılmaktadır. MIS sistemi ile kültürde üreyen koloniler aynı gün tanımlandığı için diğer yöntemlere göre daha hızlı sonuç alınmaktadır. Fakat değişik çalışmalarda sistemin doğru sonuç oranları ve güvenilirliği hakkında farklı değerlendirmeler yapılmıştır. Arthur ve ark. (3) 550

klirik maya izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada suşların MIS ile %68,0'inin doğru, %15,8'inin yanlış tanımlandığını, %16,2'sinin ise tanımlanamadığını bildirmişler, James ve ark (6) MIS ile identifikasyonunda klinik *Candida* izolatlarının %74'ünü doğru, %16'sını yanlış tanımlamışlar ve %28'ini ise identifiye edememişlerdir. James ve ark (5) 477 maya suşu ile yaptıkları bir diğer çalışmalarında MIS'in doğru tanımlama oranını %70,2, yanlış tanımlama oranını %14,3 ve tanımlayamama oranını %6,1 olarak belirlemişlerdir.

Sistemin doğru sonuç oranı %74'ün üzerine çıkmamıştır. Bizim çalışmamızda MIS'in doğru sonuç oranı %66,9 olarak belirlenmiştir.

Klasik yöntemler ile tanımladığımız *C.albicans* suşlarından 10'u MIS tarafından *C.lusitanae* (n=4), *C.kefyr* (n=3), *C.glabrata* (n=1), *Zygosaccharomyces* (n=1), *C.tropicalis* (n=1) olarak tanımlanmıştır. *C.albicans* suşlarında yanlış değerlendirme oranı %13,5 dir. *C.tropicalis* suşlarından 10'u *C.albicans*, 1'i *C.aaseri*, 1'i *C.poly-morpha* olarak, *C.glabrata* suşlarından 1'i *C.albicans*, 1'i *C.kefyr*, 1'i *S.cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. Yanlış değerlendirme oranı *C.tropicalis* suşlarında (%42,8), *C.glabrata* suşlarında (%42,8), *C.krusei* suşlarında (%25), *C.guilliermondii* suşlarında (%50) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda klasik yöntemler ile tanımlanan 74 *C.albicans* suşundan 6'sı, 28 *C.tropicalis* suşundan 3'ü, 7 *C.glabrata* suşundan 1'i, 4 *C.krusei* suşundan 1'i ve 3 *C.parapsilosis* suşundan 1'i MIS ile tanımlanamamıştır. Çalışmalarda sistemin tanımlayamama nedeni olarak bilgisayar değerlendirme kütüphanelerinde maya türlerine ait yağ asiti profil verilerindeki eksiklik gösterilmektedir (3-6).

Çalışmamızda standart suş olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.glabrata* ATCC 90030 kullanılmıştır. Bu suşlar MIS ile doğru tanımlanmıştır.

Mikrobiyal İdentifikasyon Sisteminin sadece hızlı sonuç vermesi yeterli değildir. Doğru tanımla-

ma oranlarının düşük olmasından dolayı tek başına mayaların identifikasyonunda kullanılması uygun değildir. Diğer klasik yöntemler ile desteklenmesi ve sistemin yağ asiti profil verilerinin geliştirilmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrob Chemother 2005; 56 (suppl 1):i5-i11
2. Pincus DH, Orena S, Chatellier S. Yeast identification-past, present and future methods. Med Mycol 2007; 45: 97-121
3. Crist AE, Johnson LM, Burke PJ. Evaluation of the microbial identification system for identification of clinically isolated yeast. J Clin Microbiol 1996; 34: 2408-2410
4. Goldenberg O, Herrmann S, Adam T, Marjoram G, Hong G, Göbel UB & Graf B. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven candida species. J Clin Microbiol 2005 ; 43:5912-5915
5. Kellogg J, Bankert DA & Chaturvedi V. Limitations of the current microbial identification system for identification of clinical yeast isolated. J Clin Microbiol 1998 ;36: 1197-1200
6. Kellogg J, Bankert DA & Chaturvedi V. Variation in microbial identification system accuracy for yeast identification depending on commercial source of sabouraud dextrose agar. J Clin Microbiol 1999;37: 2080-2083
7. Kireççi E, Aktaş AE. Stafilokok suşlarının gaz kromatografisi ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34: 215-219
8. Miller I, Berger T. Bacteria identification by gase chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard gase chromatography application note, Hewlett-Packard Co.,Alto, CA, 8, 1985
9. Segal E. Candida, still number one- what do we know and where are we going from there? Mycoses 2005;48: 3-11
10. Stoakes L, Kelly T, Schieven D, Harley D, Ramos M, Lannigan R, Groves D & Hussian Z. Gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid for identification of gram-negative anaerobic bacilli. J Clin Microbiol 1991;29: 2636-2638
11. Osterhout GJ, Shull VH & Dick JD. Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. J Clin Microbiol 1991;29: 1822-1830
12. Smid I & Salfinger M. Mycobacterial identification by computer-aided gas-liquid chromatography. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;19: 81-88.