

Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Ticari Sistemler Tek Başına Yeterli mi?: Bir Olgu Sunumu

Are Commercial Systems Used for the Identification of Yeasts Enough Alone?: A Case Report

Yeliz Çetinkol¹, Mustafa Altay Atalay², Arzu Altunçekiç-Yıldırım³, Mustafa Kerem Çalgın¹, Ayşe Nedret Koç²

¹Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

Özet

Trichosporon türlerine bağlı gelişen enfeksiyonlar, özellikle immünoşüpre hastalarda olmak üzere, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artan sıklıkta görülmektedir. Antifungal tedaviye göreceli olarak daha dirençli olan *Trichosporon* türlerinde tanı ve tedavi açısından çeşitli zorluklar dikkati çekmektedir. Bu tür enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak uygun antifungal ilaçların belirlenebilmesi için, maya türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması oldukça önemlidir. Maya türlerinin geleneksel yöntemlerle tanımlanması, uzun zaman ve yoğun emek gerektirdiğinden, son zamanlarda hızlı tanımlama sağlayan ticari sistemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte bu ticari sistemlerin doğru tanımlama oranlarının, sık izole edilen türlerde daha yüksek, nadir türlerde ise daha düşük olduğu bildirilmektedir. Bu yazıda, üriner sistem enfeksiyonu olan ve idrar kültüründe maya üreyen bir olgunun değerlendirilmesiyle, ticari sistemlerin tanımlamada tek başına yeterliliğinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Kanlı agarda ve eozin-metilen mavisi agarında kültürü yapılan bir idrar örneğinde 24 saatte kuru, buruşuk, mumsu, pembe renkli maya benzeri koloniler üremiştir. Bu koloniler VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemiyle *Cryptococcus* sp. olarak tanımlanmıştır. Buna karşılık, mikroskopik ve makroskopik görünimleri, karbonhidrat asimilasyon testi sonuçları ve üreaz pozitifliği, izole edilen suşun *Trichosporon asahii* olduğunu göstermiştir. Suşun Clinical Laboratory Standards Institute M27-A3 standardına göre mikrodilüsyon (amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol) ve Etest® (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemleriyle (kaspofungin, anidulafungin) antifungal duyarlılık çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak bu olgu sunumu göstermiştir ki, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, biyokimyasal özellikleri esas alan ticari sistemlerle nispeten nadir görülen *Trichosporon* spp. gibi maya türleri tanımlandığında, sonuçların geleneksel yöntemlerle de doğrulanması ve antifungal duyarlılık çalışmalarının yapılması gerekmektedir. *Klinik Dergisi* 2016; 29(2): 95-8.

Anahtar Sözcükler: *Cryptococcus* sp., *Trichosporon asahii*, üriner sistem enfeksiyonları, mayalar.

Abstract

Infections developing due to *Trichosporon* species especially in immunosuppressed patients have started to increase also in our country as well as in the world. Some difficulties have been encountered in identification and treatment of *Trichosporon* spp. which are relatively more resistant to antifungal treatment. Accurate and rapid identification of yeast species is very important to ensure determination of the appropriate antifungal agent in treating these infections. Due to long time span and intense effort required, determination using conventional methods has recently been replaced by common use of commercial systems allowing rapid identification. However, the commercial systems used to determine yeasts are reported to have higher correct identification rates for frequently isolated species, whereas lower rates for rarer species. In this report, we aimed to address that the commercial systems are enough alone for identification by evaluating a case of urinary tract infection with a positive urine culture yielding yeasts. A urine culture revealed dry, wrinkled, waxy, pink, yeast-like colonies on blood agar and eosin-methylene blue agar after a 24-hour incubation. These colonies were identified as *Cryptococcus* sp. using VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) system. On the other hand, this isolate had been demonstrated as *Trichosporon asahii* by microscopic and macroscopic appearance, carbohydrate assimilation test results and urease positivity. Additionally, antifungal susceptibility of isolate was determined using microdilution (amphotericin B, voriconazole, fluconazole) and Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden) methods (caspofungin, anidulafungin) according to Clinical Laboratory Standards Institute M27-A3 standard. In conclusion, this case report demonstrated that there is a need for confirmation of results with conventional methods for determination of rare species such as *Trichosporon* spp. identified with commercial systems based on biochemical properties, and antifungal susceptibility tests should be performed in clinical microbiology laboratories. *Klinik Dergisi* 2016; 29(2): 95-8.

Key Words: *Cryptococcus* sp., *Trichosporon asahii*, urinary tract infections, yeasts.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Yeliz Çetinkol, Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

E-posta/E-mail: dryelizcetinkol@gmail.com

(Geliş / Received: 22 Şubat / February 2016; Kabul / Accepted: 4 Mayıs / May 2016)

DOI: 10.5152/kd.2016.23



Giriş

Mantarlara bağlı üriner sistem infeksiyonları (ÜSİ) gittikçe artmakta ve özellikle yatan hastalarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (1). Hastalarda, diabetes mellitus, üriner sistem defektleri, kronik böbrek yetmezliği ve nötropenin bulunması, immünoşüpresif ajanların, geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçların, kortikosteroidlerin kullanımı ve uzun süreli üriner kateterizasyon bu artışta önemli rol oynamaktadır (2,3). Mantarlara bağlı ÜSİ veya fungüri gibi terimler kullanıldığında genellikle *Candida* türlerinin neden olduğu ÜSİ ve kandidüri akla gelmektedir. *Cryptococcus neoformans* ve *Trichosporon asahii* gibi mayaların ve *Aspergillus* türleri ve *Mucorales* takımında bulunan küflerin de ÜSİ yapabilecekleri unutulmamalıdır (4). Tıbbi öneme sahip maya türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması, erken ve uygun antifungal tedavinin seçimi, mayalara bağlı infeksiyonların sonuçlarının iyileştirilmesi ve epidemiyolojik açıdan önemlidir (5). Mayaların geleneksel yöntemlerle tanımlanması, zaman alıcı ve emek yoğun olduğu için son zamanlarda birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, hızlı tanımlama sağlayan ticari sistemleri yaygın olarak kullanmaktadır (6). Bu bildiride, idrar kültüründe maya üreyen bir olgunun değerlendirilmesiyle ticari sistemlerin tanımlamada tek başına yeterliliğinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Olgu

Bilinen diabetes mellitus öyküsü bulunan 78 yaşındaki kadın hasta, Alzheimer hastalığı, dekübitus ülseri ve oral alım bozukluğu nedeniyle takip edildiği ikinci basamak yoğun bakım ünitesinden gastrointestinal kanama gelişmesi üzerine hastanemiz gastroenteroloji kliniğine sevk edilmişti. Kanama stabil hale geldikten sonra alta yatan hastalıkları nedeniyle genel durum bozukluğu devam ettiğinden, genel yoğun bakım ünitesinde takibine devam edilmişti. Yatışı sırasında kolistine duyarlı *Klebsiella pneumoniae*'ye bağlı kateter infeksiyonu, ventilatörle ilişkili pnömoni, kolistine duyarlı *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı bakteriyemi ve idrar yolu infeksiyonu gibi çeşitli infeksiyon tanılarıyla kolistin, imipenem, tigesiklin gibi geniş spektrumlu antibiyotik tedavileri almıştı. Hastanın idrar kültüründe 100 000 koloni/ml maya benzeri üreme olması nedeniyle idrar sondası değiştirilerek kontrol kültürü alınmış ve flukonazol tedavisi başlanmıştı. Kontrol kültüründe de aynı üremenin saptanması üzerine kaspofungin tedavisine geçilmişti. Kaspofungin tedavisinin 48. saatinde alınan idrar kültüründe de üreme izlendi. Ancak tedavi değişikliği yapılamadan hasta genel durum bozukluğu ve eşlik eden pnömoni tablosunun kontrol altına alınamaması gibi ek sistemik nedenlerin de etkisiyle kaybedildi.

Gönderilen idrarın kanlı agar ve eozin-metilen mavisi agarındaki kültüründe 24 saatte kuru, buruşuk, mumsu, pembe renkli maya benzeri koloniler üredi. Tekrar edilen idrar kültüründe yine aynı etken üredi ve VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile *Cryptococcus* sp. olarak tanımlandı. Ancak kolonilerin kuru olması nedeniyle *Cryptococcus* sp. olamayacağı düşünülerek, Sabouraud dekstroza agarına (SDA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Birleşik Krallık) pasaj yapıldı. SDA'da 24 saatte kuru, buruşuk, mumsu, krem renginde maya benzeri koloniler üredi (Resim 1A). Germ tüp

testi negatifti. Mısır unlu Tween® 80 agarında lam kültüründe gerçek hifler ve tek hücreli, kübik görümlü artrokonidyumlar görüldü (Resim 1B). Üreaz testi pozitif sonuç verdi. API® 20 C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile glikoz, 2-keto-D-glukonat, arabinoz, ksiloz, N-asetil-D-glikozamin ve selobiyozun pozitif, diğer karbonhidrat testlerinin negatif olduğu görüldü. Mikroskopik ve makroskopik görünümüne, karbonhidrat asimilasyon testlerine ve üreaz pozitifliğine göre suş *T. asahii* olarak tanımlandı. Suşun DNA dizi analizleri özel bir laboratuvarında (RefGen, Ankara, Türkiye) çalışıldı. Dizi analizi verileri, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) sistemi (7) kullanılarak analiz edildi ve *T. asahii* ile %100 uyumlu bulundu. Suşun antifungal duyarlılığı, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 standardına (8) göre mikrodilüsyon (amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol) ve Etest® (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemleriyle (kaspofungin, anidulafungin) belirlendi. Kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 90028 kullanıldı. Amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve anidulafungin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sırasıyla 0.25 µg/ml, 0.125 µg/ml, 8 µg/ml, >32 µg/ml ve >32 µg/ml olarak bulundu.

İrdeleme

ÜSİ, hastanede yatan hastalarda en sık görülen infeksiyondur. ÜSİ'den genellikle bakteriler sorumlu olmakla birlikte, infeksiyonların %10'unda fungal etkenler saptanmaktadır (9). Bunlar arasında, ilk sırada *Candida* türleri yer almakla birlikte; *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., *T. asahii*, *Saprochaete capitata* ve nadiren de *Blastomyces dermatitidis*, *C. neoformans* gibi türler de etken olabilmektedir (10). Yapılan çalışmalar; yoğun bakım ünitesinde yatış, diabetes mellitus, nörojenik mesane, böbrek nakli, malnütrisyon, immünoşüpresif ajan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı öyküsünün, üriner sonda varlığının ve kadın cinsiyetin mantarlara bağlı ÜSİ ile ilişkili olduğunu göstermektedir (9,11). Yetmiş sekiz yaşındaki kadın olgumuzda da risk faktörleri olarak; yoğun bakım ünitesinde uzun süre yatış, diabetes mellitus, malnütrisyon ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı öyküsü vardı.

Mayaların antifungal ajanlara duyarlılıkları değişkendir. Antifungal duyarlılık sonuçları zaman gerektiren testler olduğu için, mayaların tür düzeyinde doğru ve hızlı tanımlanması, hastaya klinik yaklaşımı etkilemektedir (12). Mayaların geleneksel yöntemlerle tanımlanması, zaman, yoğun emek, eğitimli personel ve donanımlı laboratuvar gerektirdiği için, günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların tanımlanmasında genellikle hızlı tanımlama sağlayan ticari sistemler kullanılmaktadır (5,13). Bu amaçla en yaygın kullanılan sistemler, VITEK® 2 otomatize sistemi YST maya tanımlama kartı ve API® 20 C AUX sistemidir (14). VITEK® 2 sisteminin kullanımının basit olması, mikolojiye özgü deneyim gerektirmemesi ve 18 saat gibi bir sürede hızlı sonuç vermesi avantajlı yönleridir. Ticari sistemler arasında referans yöntemi olarak kabul edilen API® ile sonuçların alınması daha uzun (48-72 saat) sürmektedir. API® sistemini değerlendiren bulanıklığa ilaveten hif oluşturma özelliklerinin de değerlendirilmesi nedeniyle, *Candida glabrata* başta olmak üzere, tür tanımlanmasında VITEK® sistemine göre daha başarılı bu-



Resim 1. A. *Trichosporon asahii*'nin krem renginde, kuru, mumsu, maya benzeri kolonileri. **B.** *T. asahii*'nin lam kültüründeki görünümü.

lunmuştur (5,13,14). Bu bildiride de VITEK® 2 otomatize sistemiyle *Cryptococcus* sp. olarak tanımlanan izolat, geleneksel yöntemler ve API® 20 C AUX sistemiyle *T. asahii* olarak tanımlanmıştır. Olgumuzda etken tanımlanmasındaki güçlükler ve sürecin uzaması optimal tedavi yaklaşımı önünde engel oluşturmuştur.

Karabıçak ve arkadaşları (5), VITEK® ve API® sistemlerinin, sık karşılaşılan türlerde doğru tanımlama oranlarının daha yüksek (en az %95), nadir görülen türlerde ise daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Morfolojik ve fizyolojik tanımlamanın referans alındığı aynı çalışmada, *C. neoformans* olarak tanımlanan bir suş, VITEK® sistemiyle *C. neoformans* olarak doğru tanımlanmış, API® sistemiyle tanımlanamamış, diğer bir *C. neoformans* suşu; VITEK® sistemiyle *Cryptococcus albidus* olarak yanlış, API® sistemiyle *C. neoformans* olarak doğru tanımlanmıştır. Meletiadis ve arkadaşları (15), üç ticari maya tanımlama sistemini karşılaştırdıkları çalışmada, ticari sistemlerin performansının sık görülen türlerde VITEK® ile %92, API® ID32C ile %94, Auxacolor® (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ile %95 olmak üzere daha yüksek, nadir görülen türlerde ise daha düşük (VITEK® %64, API® ID32C %56, Auxacolor® %43) olduğunu bildirmişlerdir. Moleküler yöntemlerle *Cryptococcus gattii* olarak tanımlanan üç suş, her üç sistemle de yanlış (*C. neoformans*) olarak tanımlanmıştır. *C. neoformans* olarak tanımlanan 28 suşun değerlendirmesinde, VITEK® sistemi bir izolatı tanımlayamamış, API® ID32C sistemi iki suşu *C. albidus* olarak yanlış tanımlamış, fakat Auxacolor® sistemiyle tüm suşlar doğru olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada *T. asahii* olarak tanımlanan iki suş, her üç ticari sistemle de doğru olarak saptanmıştır. Bizim olgumuzda ise VITEK® sistemiyle *Cryptococcus* sp. olarak tanımlanan maya türü geleneksel yöntemlerle *T. asahii* olarak belirlenmiştir.

Trichosporon türleri antifungal tedaviye göreceli olarak dirençli mantarlar olduğu için doğru tanımlanmaları önemlidir ve *in vitro* amfoterisin B'ye direnç gösterebilirler (16). Girmenia ve arkadaşları (17) *Trichosporon* infeksiyonu olan 55 hastanın, amfoterisin B ile tedavi sonuçlarını değerlendirmişler; hastaların sadece 13 (%23.6)'ünde tedavide başarı

sağlanabildiğini belirtmişlerdir. Yıldırım ve arkadaşları (18) 27 haftalık prematüre bir yenidoğanın kan ve idrar kültürlerinden *T. asahii*'yi izole etmişler ve hastanın amfoterisin B ile başarılı bir şekilde tedavi edildiğini bildirmişlerdir. Triazol grubu antifungaller, *Trichosporon* infeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen ilaçlardır. *T. asahii* suşlarında, flukonazolün *in vitro* en düşük, vorikonazolün de *in vitro* en yüksek aktivite gösteren ve en düşük MİK değerlerine sahip triazol grubu antifungaller olduğu bildirilmektedir (16,19). Ekinokandin grubu antifungal ilaçların, *Trichosporon* türlerinde *in vitro* sınırlı ve yetersiz aktivite gösterdiği ve bu ilaç grubuyla tedavi altındayken *Trichosporon* infeksiyonlarının gelişebildiği bildirilmiştir (16,20). Olgumuzda da kaspofungin tedavisine rağmen *T. asahii* üremesi saptanmış ve bu suşun amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve anidulafungin için MİK değerleri sırasıyla 0.25 µg/ml, 0.125 µg/ml, 8 µg/ml, >32 µg/ml ve >32 µg/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, mayaların tanımlanmasında kullanılan ticari sistemlerin tanımlama oranlarının sık izole edilen türlerde daha yüksek, nadir türlerde daha düşük olduğu bildirilmektedir. Bu olgu sunumuyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, biyokimyasal özellikleri esas alan ticari sistemlerle nadir görülen türler tanımlandığında, sonuçların geleneksel yöntemlerle doğrulanması ve antifungal duyarlılık çalışmalarının da yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Sun W, Su J, Xu S, Yan D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol.* 2012; 61(Pt 12): 1750-7. [CrossRef]
2. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(2): 253-73. [CrossRef]
3. Atalay MA, Koç AN, Sav H, Demir G. Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Hijyen Den Biyol Derg.* 2013; 70(4): 185-90. [CrossRef]

4. Kaufmann CA. Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2014; 28(1): 61-74. [\[CrossRef\]](#)
5. Karabıçak N, Uludağ Altun H, Karatuna O, *et al*. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında maya türlerinin tanımlanmasında sık kullanılan ticari sistemlerin değerlendirilmesi: çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bül*. 2015; 49(2): 210-20. [\[CrossRef\]](#)
6. 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.
7. Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Bethesda MD, USA: National Center for Biotechnology Information [erişim 20 Şubat 2016]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
8. Clinical Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard*. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: CLSI, 2008.
9. Nayman Alpat S, Özgüneş İ, Ertem OT, *et al*. Kandidürisi olan hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bül*. 2011; 45(2): 318-24.
10. Kauffman CA1, Fisher JF, Sobel JD, Newman CA. Candida urinary tract infections--diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(Suppl. 6): S452-6. [\[CrossRef\]](#)
11. Paul N, Mathai E, Abraham OC, Michael JS, Mathai D. Factors associated with candiduria and related mortality. *J Infect*. 2007; 55(5): 450-5. [\[CrossRef\]](#)
12. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*. 2001; 39(1): 9-33. [\[CrossRef\]](#)
13. Borman AM, Szekely A, Palmer MD, Johnson EM. Assessment of accuracy of identification of pathogenic yeasts in microbiology laboratories in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(8): 2639-44. [\[CrossRef\]](#)
14. 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. [\[CrossRef\]](#)
15. Meletiadis 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. [\[CrossRef\]](#)
16. Hazırolan G. Trichosporon asahii ve enfeksiyonlarına genel bakış. *Mikrobiyol Bül*. 2012; 46(4): 707-15.
17. Girmenia C, Pagano L, Martino B, *et al*. Invasive infections caused by Trichosporon species and Geotrichum capitatum in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4): 1818-28. [\[CrossRef\]](#)
18. Yıldıran A, Küçüködük S, Saniç A, Belet N, Güvenli A. Disseminated Trichosporon asahii infection in a preterm. *Am J Perinatol*. 2003; 20(5): 269-71. [\[CrossRef\]](#)
19. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of Trichosporon spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(4): 682-700. [\[CrossRef\]](#)
20. Bayramoğlu G, Sonmez M, Tosun I, Aydın K, Aydın F. Breakthrough Trichosporon asahii fungemia in neutropenic patient with acute leukemia while receiving caspofungin. *Infection*. 2008; 36(1): 68-70. [\[CrossRef\]](#)