

## GERM TÜP TESTİNİN MÜELLER HİNTON AGAR VE SERUMDA KARŞILAŞTIRILMASI

### EVALUATION OF MUELLER-HINTON AGAR FOR GERM TUBE TEST

Doğanhan Kadir ER<sup>1</sup>, Hüseyin UZUNER<sup>1</sup>, Serpil GENÇ<sup>1</sup>, Sema KEÇELİ<sup>\*1</sup>

\* Sorumlu Yazar

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe, 41380, Kocaeli, TÜRKİYE  
E-posta: sema.keceli@yahoo.com.tr

#### ÖZET

#### Anahtar Kelimeler:

*Candida albicans*,  
Germ tüp testi,  
Mueller-Hinton  
Agar, non-albicans  
*Candida*

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı basit bir besiyeri olan Mueller-Hinton agar (MHA)'ın germ tüp testinde (GTT) kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen toplam 86 *Candida* suşu çalışmaya alındı. Tüm isolatlar Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Salubris, Türkiye)'a pasajlanarak, 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İzolatlar VITEK-MS (Biomérieux, Fransa) cihazı ile tanımlandı. Serum GTT için tek bir *Candida* kolonisi 0.5 ml taze insan serumuna inoküle edildi. MHA GTT için tek koloniden MHA yüzeyine Dalmau tekniği ile çizgi ekimi yapıldı ve üzeri steril lamel ile kapatıldı. 37°C'de 1.5 ve 3 saat inkübasyon sonrasında tüm serumlar ve MHA plakları ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Duyarlılık ve özgüllük değerlendirmesinde serum GTT altın standart yöntem olarak kabul edildi.

**Bulgular:** Tanımlama sonuçları şöyledi: 51 *C. albicans*, bir *C. dubliniensis*, 12 *C. parapsilosis*, 12 *C. glabrata*, 4 *C. kefir*, 3 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*. Serum GTT'nde 1.5 saat sonunda 30 (%58.8), 3 saat sonunda ise 36 (%70.6) *C. albicans* izolatu pozitif olarak bulundu. MHA GTT'nde ise 1.5 saat sonunda 21 (%41.2), 3 saat sonunda ise 40 (%78.4) *C. albicans* izolatu pozitif olarak saptandı. *C. dubliniensis* dışındaki tüm non-albicans türleri her iki testte de negatif olarak bulundu. *C. dubliniensis* her iki testte de 1.5 ve 3 saatte GTT pozitif olarak saptandı. MHA'ın 1.5 saatte duyarlılığı %58, özgüllüğü %92; 3 saatte ise duyarlılığı %86, özgüllüğü %81 olarak hesaplandı.

**Sonuç:** MHA, GTT için güvenli ve kolay bulunabilen bir besiyeridir ve serum GTT'ne alternatif olarak kullanılabilir. MHA'da GTT araştırılması esnasında, daha yüksek duyarlılığa sahip olduğundan dolayı, 1.5 saat yerine 3 saatlik inkübasyon önerilmektedir.

#### ABSTRACT

#### Keywords:

*Candida albicans*,  
Germ tube test,  
Mueller-Hinton  
Agar, non-  
albicans *Candida*

**Aims:** The aim of this study is to evaluate Mueller-Hinton Agar (MHA) as a simple medium for the determination of germ tube test (GTT).

**Methods:** A total of 86 *Candida* species isolated from different clinical specimens were included. All isolates were cultured onto Sabouraud Dextrose Agar (Salubris, Turkey) and incubated at 37°C for 24-48 hours. They were identified by VITEK MS (Biomérieux, France). For serum GTT, a single *Candida* colony was inoculated into 0.5 ml freshly obtained human serum. For MHA GTT, an inoculum of single colony was streaked by Dalmau technique onto MHA and covered by a sterile coverslip. After incubation at 37°C for 1.5 h and 3 h, all sera and MHA plates were examined using a light microscope. Serum GTT was accepted as gold standard method for the determination of sensitivity and specificity values.

**Results:** The identification results were as follows: 51 *Candida albicans*, one *C. dubliniensis*, 12 *C. parapsilosis*, 12 *C. glabrata*, 4 *C. kefir*, 3 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*. Serum GTT was positive in 30 (58.8%) and 36 (70.6%) of *C. albicans* isolates at 1.5 h and 3 h, respectively. MHA GTT was positive in 21 (41.2%) and 40 (78.4%) of *C. albicans* isolates at 1.5 h and 3 h, respectively. All non-albicans species except *C. dubliniensis* were found as negative using both tests. Both GTTs were positive for *C. dubliniensis* at 1.5 h and 3 h. MHA sensitivity and specificity was determined as 58% and 92% at 1.5 h; 86% and 81% at 3 h, respectively.

**Conclusions:** MHA is safer and easier medium for GTT that may be used as alternative to serum GTT. The evaluation of GTT on MHA after 3 h incubation is recommended since it has higher sensitivity compared to 1.5 h.

## GİRİŞ

Kandidalar insanların sindirim sistemlerinde ve mukoz membranlarında normal flora üyesi olarak bulunan maya türü mantarlardır<sup>1</sup>. Kandidaların 150'den fazla türü bulunmasına rağmen bunların çok küçük bir kısmı insanlardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilirler. Klinik örneklerden sıklıkla izole edilen *Candida* türleri *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitanae*, *C.*

*dubliniensis* ve *C. glabrata*'dır<sup>2</sup>. Günümüzde, *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonların prevalansının giderek artmasına rağmen, kandidiyaz olgularının çoğu *C. albicans* tarafından oluşturulmaktadır<sup>3</sup>.

Germ tüp testi (GTT), *C. albicans*'ın non-*albicans* türlerinden ayırımında kullanılan bir testtir<sup>4</sup>. Non-*albicans Candida* türleri arasında germ tüp oluşturabilen tek tür *C. dubliniensis*'tir<sup>5</sup>. Bu test insan veya tavşan serumu içerisine bir miktar maya kolonisi eklenmesi ve 37 °C'de 2-3 saat inkübe edilerek germ tüp oluşumunun incelenmesi esasına dayanır<sup>4</sup>. Serum kullanımı esnasında meydana gelebilecek bulaş riski ve taze serum bulunmadığı zorluk nedeniyle, GTT için insan serumu yerine agar temelli besiyerleri kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır<sup>6-10</sup>.

Bu çalışmanın amacı, *C. albicans* ve non-*albicans* türlerinin GTT ile ayırımında insan serumu ve Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerinin etkinliklerinin karşılaştırılmasıdır.

## YÖNTEM

### *Candida* suşları ve identifikasyon

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi merkez laboratuvarına 2014 yılında gönderilen çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen toplam 86 *Candida* suşu çalışmaya alındı. Referans suş olarak *C. albicans* ATCC 90028 kullanıldı.

Daha önce serum germ tüp testi ve VITEK-MS (Biomérieux, Fransa) cihazı ile tür tanımlaması yapılmış olan suşlar -80 °C stoktan çıkarılıp, %2 glukoz içeren Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Salubris, Türkiye)'a iki kez pasajlanarak, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Tür identifikasyonu için VITEK-MS (Biomérieux, Fransa) cihazı kullanıldı.

### Serum germ tüp testinin değerlendirilmesi

Test günü elde edilen, steril şartlarda alınan kandan hazırlanan taze insan serumuna (0.5 ml) saf maya kolonisi inoküle edilip 37°C'de inkübe edildi. Serumlardan 1,5 saat ve 3 saatlik inkübasyon sonrası örnek alınarak lamel arası 40X'lik objektif ile germ tüp oluşumu incelendi. Blastosporadan boğum yapmadan uzayan ve uzunluğu blastosporun 2-3 katı olan boru şeklinde yapıların varlığı germ tüp pozitif olarak değerlendirildi<sup>4</sup>. Duyarlılık ve özgüllük değerlendirmesinde, bu yöntem altın standart yöntem olarak kabul edildi.

### Mueller Hinton Agar germ tüp testi değerlendirmesi

MHA'da germ tüp oluşumunun değerlendirilmesi için, SDA'da üremiş olan kolonilerden MHA yüzeyine Dalmau tekniği ile dört farklı alana çizgi ekimi yapıldı. Ekim çizgileri üzerine steril lamel kapatılarak, plaklar 37 °C'de inkübasyona kaldırıldı. MHA plaklarındaki çizgi ekim alanlarının ikisi 1,5 saatlik ve diğer iki çizgi ekim alanı da 3 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirildi. Lamel ile kapalı agar parçası kesilip, lam üzerine konarak 40X'lik objektif ile incelendi. Bu değerlendirmeler, serum GTT ile eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

### İstatistiksel analiz

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif prediktivite değerleri hesaplanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan *Candida* suşlarının tür dağılımı sırası ile şöyle idi: 51 *C. albicans*, bir *C. dubliniensis*, 12 *C. parapsilosis*, 12 *C. glabrata*, 4 *C. kefyr*, 3 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*.

Pozitif kontrol olarak kullanılan *C. albicans* suşu serum ve MHA'daki GTT'nin her 1,5 ve 3. saatinde pozitif olarak saptandı. *C. albicans* izolatlarının 5'inde, her iki testte ve her iki saatte GTT negatif, 17'sinde ise her iki saatte her iki yöntemle de GTT pozitif olarak saptandı (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** *C. albicans* izolatlarının MHA ve serum GTT testi sonuçları.

MHA		Serum		<i>C. albicans</i> sayısı
1,5 Saat	3 Saat	1,5 Saat	3 Saat	
-	-	-	+	1
+	+	-	-	1
+	+	-	+	2
-	+	-	+	4
-	-	+	+	5
-	-	-	-	5
-	+	+	+	8
-	+	-	-	8
+	+	+	+	17
<b>TOPLAM</b>				51

*C. dubliniensis* dışındaki diğer tüm non-albicans türlerinde her iki saatte ve her iki testte GTT negatif olarak bulundu. *C. dubliniensis* suşu ise her iki saatte de her iki testle pozitif saptandı.

MHA'da 1,5 ve 3 saatlik inkübasyonda negatif, serumda her iki saatte de pozitif olan 5 izolat belirlendi. Sekiz *C. albicans* izolatında, MHA'da 1,5 saatte GTT negatifken, 3. saatte GTT pozitif ve serumda ise her iki saatte negatif sonuçlar elde edildi (Çizelge 1). MHA ve serumda GTT, 1,5. saatte negatif olup, 3. saatte pozitif olan 4 izolat tanımlandı. Serum GTT' de her iki saatte negatif olup, MHA'nın her iki saatinde de pozitif olan sadece bir izolat saptandı. MHA'da 1,5 ve 3 saatlik inkübasyonda pozitif olup, serumda 3 saatlik inkübasyonda pozitif olarak dönen 2 *C. albicans* izolatı belirlendi (Çizelge 1).

Serumda *C. albicans* suşlarında, 1,5 saatlik inkübasyonda GTT pozitif olan suş sayısı 20 (%39,2), 3 saatlik inkübasyonda ise 40 (%78,4) olarak belirlendi (Çizelge 2). Serumda ve MHA'da 3. saatte GTT pozitifliği 31/51 (%60,8) olarak saptandı. Bir buçuk saatlik inkübasyonda MHA negatif, serum GTT pozitif olan 13 *C. albicans* izolatı tanımlandı. Bu 13 izolatın 8'i, MHA'da 3 saatlik inkübasyonun sonunda germ tüp oluşturdu (Çizelge 3).

**Çizelge 2.** *C. albicans*'ın Serum ve MHA GTT'nde 1.5 ve 3 saatteki pozitif ve negatif sonuç sayıları.

Serum				MHA			
1.5 saat		3 saat		1.5 saat		3 saat	
Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
30	21	36	15	21	30	40	11

**Çizelge 3.** *C. albicans* suşlarında serum GTT ve MHA test sonuçlarının saatlere göre karşılaştırılması.

MHA	Serum			
	1,5 Saat		3 Saat	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<b>Pozitif</b>	17	3	31	9
<b>Negatif</b>	13	18	5	6

Yapılan istatistik analiz sonucunda, MHA'da GTT'nin serum GTT'ye göre duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif (PPD) ve negatif prediktif (NPD) değerleri Çizelge 4'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.** MHA'da pozitif olan suşların 1,5 ve 3 saat inkübasyon sonrasında, duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri.

	1,5 Saat		PPD	NPD	3 Saat		PPD	NPD
	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)		
<i>C. albicans</i> (n=51)	56	86	85	58	86	40	78	55
Non-albicans <i>Candida</i> (n=33)*	-	100			-	100		
<i>C. albicans</i> ve non-albicans <i>Candida</i> (n=86)	58	92	82	80	86	81	78	89

\**C. dubliniensis* dışındaki non-albicans suşları dahil edilmiştir. PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Germ tüp testinde, insan serumu kullanımının çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar; insan serumu kullanımının hepatit virüsü ve HIV riski taşıması, serumun taze olması veya derin dondurucuda saklanmış olması, germ tüp üretiminin inhibe olmaması için inokulumun  $10^7$  hücre/ml'den az olmasının gerekliliği ve serumlar arasında performans farklılıklarının bulunmasıdır<sup>4,9</sup>.

Daha önceki bir çalışmada, biyokimyasal tanımlama testi olan API/ID 32C (BioMérieux, Fransa) kiti referans alındığında, serum GTT'nin duyarlılığı %99, özgüllüğü %98,5, pozitif prediktif değeri (PPD) %99,4 ve negatif prediktif değeri (NPD) %99,3 olarak belirlenmiştir<sup>11</sup>.

Germ tüp oluşumu için en sık kullanılan insan serumu dışında, farklı serum tipleri ve besiyerleri araştırılmıştır. At, tavşan, koyun, keçi, domuz ve fetal sığır serumu, peptonlu su, triptik soy buyyon, beyin kalp infüzyon buyyonu, Sabouraud glukoz buyyon, Mueller-Hinton buyyon (MHB), Mueller-Hinton agar, pirinç oğall-tween 80 agar ve RPMI besiyeri gibi çok sayıda serum ve besiyeri çeşidi, optimum GTT için araştırılmıştır<sup>6,10,12,13</sup>.

Mueller-Hinton Agar üzerine 10 µl 0.5 McFarland *Candida* süspansiyonu damlatılıp, üzerine lamel kapatılarak inkübasyon sonrası incelendiği ve 135 *C. albicans*, 24 *C. tropicalis* ve bir *C. dubliniensis* izolatının dahil edildiği bir çalışmada, MHA'nın duyarlılığı %92, özgüllüğü ise %100 olarak belirlenmiştir<sup>10</sup>. Benzer bir şekilde, Rimek ve diğerlerinin çalışmasında da, MHA'nın duyarlılığı %91, özgüllüğü ise %100 olarak tanımlanmıştır<sup>9</sup>.

Bu çalışmada, 1,5 saatlik inkübasyonda, duyarlılık %58, özgüllük %92 olarak; 3 saatlik inkübasyonda ise duyarlılıkta artış (%86), özgüllükte ise düşüş (%81) belirlenmiştir. Ayrıca, tüm suşlar içerisinde 3. saatte NPD'nin %80'den %89'a yükseldiği gözlenmiştir. Üç saatlik inkübasyon, 1,5 saate göre kıyaslandığında, duyarlılık ve NPD'deki artışın sebebinin pozitif olan suş sayısındaki iki kat artışa bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, GTT'ni MHA ve insan serumunda 1,5 ve 3 saatlik inkübasyon sonunda karşılaştıran ilk çalışmadır. Bizim çalışmamıza benzer olarak, Atalay ve diğerlerinin çalışmasında, MHA ve serum GTT'i 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 3 saat inkübasyon sonrasında değerlendirilmiştir. Bu çalışmada zaman açısından en iyi sonuçların 3. saatte olduğu gösterilmiştir<sup>14</sup>. Bizim çalışmamızda, 1,5 saatlik süre sonunda her iki testte de GTT pozitif olan 17 suş bulunurken, 3 saatlik inkübasyon sonunda bu sayı 31'e yükselmiştir. Benzer şekilde, 1,5. saatte GTT sonucu serumda pozitif olup MHA'da negatif çıkan suş sayısı 13 olup, 3. saatte bu sayı 5'e düşmüştür. Bu veriler dikkate alındığında, *C. albicans* olduğu bilinen suşların MHA ve serum GTT test sonuçlarının saatlere göre karşılaştırılması göz önüne alındığında, 3. saatteki sonuçların 1,5. saate göre daha uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda bir *C. dubliniensis* suşunun MHA ve serum GTT pozitifliğinin bulunmuş olması, MHA'nın *C. dubliniensis* GTT belirlenmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte daha fazla sayıda *C. dubliniensis* ile yapılan çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Rimek ve diğerlerinin çalışmasında, tüm suşlar arasında %1,2 oranında bulunan *C. dubliniensis* sonuçları değerlendirilmiş, MHA'daki GTT duyarlılığı *C. albicans* için %91,5, *C. dubliniensis* için %60 olarak bulunmuştur<sup>9</sup>.

Sonuç olarak, MHA besiyerinin laboratuarlarda kolay bulunabilir olması ve serumun taşıdığı riskleri taşıyamaması, MHA'nın GTT için kullanımını önemli hale getirmektedir. Benzer bir şekilde, besiyeri ticari olarak alınamasa bile laboratuarlarda hazırlanması kolay ve ucuzdur.

## KAYNAKLAR

1. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. Manual of Clinical Microbiology, 9.ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (ed), Washington, DC. ASM Press, 2007; s. 1762-1788
2. Edwards JE, *Candida* Species. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7. ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (ed), Philadelphia, PA. Churchill Livingstone, 2010; s. 3225 - 3240.
3. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol*, 2004; 12(7): 317-324.
4. Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. *Journ Clin Pathol*, 1962; 15(6): 563-565.
5. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journ Clin Microbiol*, 1998; 36(2): 329-334.
6. Beheshti F, Smith AG, Krause GW. Germ tube and chlamyospore formation by *Candida albicans* on a new medium. *Journ Clin Microbiol*, 1975; 2(4): 345-348.
7. Warwood NM, Blazeovic DJ. Comparison of cream of rice agar and horse serum for differentiating germ tubes of *Candida albicans* from filaments of *Candida tropicalis*. *Journ Clin Microbiol*, 1977; 5(4): 501-502.
8. Yong DC, Smitka C, Prytula A ve diğ. The comparison of two agar media for germ tube and chlamyospore production by *Candida albicans*. *Health lab Sci*, 1978; 15(4): 197-200.
9. Rimek D, Fehse B, Göpel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 2008; 51(3): 205-208.
10. Mattei AS, Alves SH, Severo CB ve diğ. Use Of Mueller-Hinton Broth And Agar In The Germ Tube Test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2014; 56(6): 483-485.

11. Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999; 18(3): 188-191.
12. Arora DR, Saini S, Gupta N. Evaluation of germ tube test in various media. *Indian J Pathol & Microbiol*, 2003; 46(1): 124-126.
13. Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses*, 2007; 50(4): 282-285.
14. Atalay A, Koç AN, Parkan Ö ve diğ. Çimlenme borusu (germ tüp) testinde Mueller-Hinton Agar serumların yerini alabilir mi?  
1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Kongresi, Poster no: 07, 25 Eylül 2014, Ankara.