

Metody identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida*. Część I. Techniki fenotypowe

Sebastian Gnat

z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Methods for species identification of genus *Candida* fungi. Part I. Phenotypic techniques

Gnat S., Sub-Department of Microbiology, Institute of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The incidence of *Candida* spp. infections has increased in recent years due to the widespread use of broad-spectrum antibiotics and the growing numbers of immunocompromised individuals. Despite the predominance of *Candida albicans*, non-*albicans* *Candida* species, such as *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, and *Candida krusei* are emerging as both, colonizers and pathogens, that can cause superficial and systemic infections. Currently, there are various methods for identifying yeasts from clinical samples. Conventional methods for identification of *Candida* species are based on morphological and physiological attributes. Although phenotypic identification methods are cost effective and practical procedures for routine discrimination of isolates in the clinical microbiology laboratory, the accurate identification of all isolates. Moreover, given the variability in the phenotypic characteristics and other irregularities in the taxonomy of the genus *Candida*, identification based on traditional methods has become less reliable. Important progress has been made with various studies on the phenotypic characteristics of these species using commercially available identification systems. The aim of this review is to summarize the methods available for identification of *Candida* species. The first part of the article presents the characteristics of phenotypic methods and quick identification techniques, including systems based on the use of chromogenic media.

Keywords: *Candida*, identification, phenotypic methods, morphology examination.

Notowany w ostatnich latach wzrost częstości występowania grzybic, zwłaszcza narządowych i uogólnionych, oraz związane z nimi powikłania sprawiają, że wykrywanie i rozpoznawanie tych chorób jest przedmiotem dużego zainteresowania lekarzy medycyny, lekarzy weterynarii i mikrobiologów. Jednymi z takich chorób, które pomimo postępów w medycynie wciąż stanowią poważny problem kliniczny o wymiarze światowym, są kandydozy. Grzyby z rodzaju *Candida* wysoki poziom chorobotwórczości zawdzięczają szeregowi czynników zjadliwości pozwalających na kolonizację, penetrację tkanek i rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza, do których zaliczyć można pleomorfizm, aktywność enzymatyczną oraz coraz częściej opisywane zjawisko tworzenia biofilmu. Znacząca częstość występowania kandydoz i wysoka śmiertelność, jaką powodują szczególnie u pacjentów z immunosupresją (od 30 do 70%), są powodem dążenia mykologów do opracowania czułych i wiarygodnych metod diagnostycznych (1).

Obecnie istnieje wiele metod identyfikacji gatunkowej drożdży z rodzaju *Candida* bezpośrednio z próbek klinicznych lub po uzyskaniu kultury. Metody te można podzielić na kilka grup: (1) konwencjonalne, m.in. test filamentacyjny, badania morfologiczne i asymilacja węglowodanów; (2) szybkie, w tym testy enzymatyczne i stosowanie podłoży chromogennych; (3) zautomatyzowane i molekularne, np. techniki typowania molekularnego (tab. 1). Rutynowo w laboratoriach mikrobiologicznych wykorzystywane są techniki konwencjonalne identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Candida*, które oparte są na opisie cech morfologicznych i fizjologicznych, stąd niejednokrotnie diagnostyka jest skomplikowana i czasochłonna (2). Metody identyfikacji fenotypowej są jednak tanie i praktyczne, dlatego nadal wydają się niezastępowalne w laboratoriach klinicznych (3). Biorąc jednak pod uwagę zmienność cech fenotypowych i liczne zmiany w taksonomii drożdżaków rodzaju *Candida* (4), identyfikacja oparta na tradycyjnych metodach stała się w ostatnich latach mniej wiarygodna (5). W odpowiedzi na te problemy opracowano wiele szybkich, komercyjnych i zautomatyzowanych systemów identyfikacji fenotypowej tych organizmów (6). Ich wiarygodność jest zróżnicowana, a koszty stosunkowo wysokie, pomimo tego niektóre ośrodki naukowe korzystają z nich w badaniach naukowych i diagnostyce. Szybką i manualnie prostą do wykonania identyfikację grzybów drożdżopodobnych umożliwiają nowsze techniki typowania molekularnego oraz techniki molekularne (7). Istotne postępy w diagnostyce zostały poczynione przy zastosowaniu podejścia wielokierunkowego, gdy w połączeniu ze sobą stosowane są różne typy metod identyfikacyjnych (7). W tym artykule przedstawiony jest przegląd i omówienie dostępnych metod identyfikacji grzybów z rodzaju *Candida*. Pierwsza część artykułu dotyczy charakterystyki metod fenotypowych oraz technik szybkiej identyfikacji, w tym systemów opartych o stosowanie podłoży chromogennych.

Metody fenotypowe

Metody dostępne niekomercyjnie

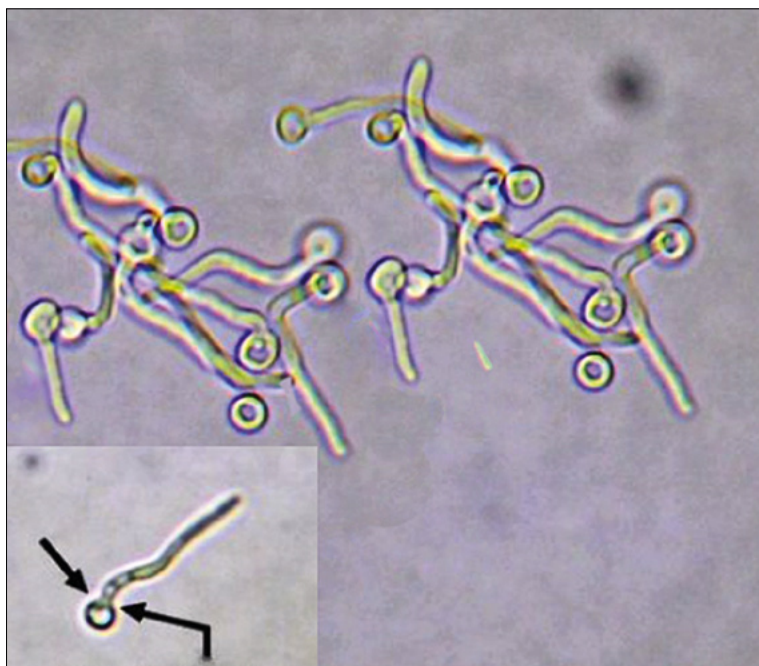
Test filamentacyjny jest uważany za prostą, ekonomiczną i wydajną technikę różnicowania gatunku *Candida albicans*, będącego najistotniejszym patogenem tego rodzaju grzybów, od innych gatunków klasyfikowanych w rodzaju *Candida* (8, 9). Test opiera się na jednej zasadniczej obserwacji w mikroskopie świetlnym, z zastosowaniem powiększenia 200× lub

Tabela 1. Zestawienie metod diagnostycznych z kosztem ich wykonania i stopniem efektywności identyfikacji gatunkowej

Metody	Czas	Koszt	Efektywność
Metody fenotypowe			
Testy niekomercyjne			
Test filamentacji i tworzenia chlamydospor	2–4 godz.	niski	wysoka
Asymilacja różnych źródeł węgla i azotu	24–48 godz.	niski	niska
Fermentacja węglowodanów	24–48 godz.	niski	niska
Testy komercyjne			
API 20C Aux system	24–72 godz.	wysoki	wysoka
ID 32C system	24–72 godz.	niski	wysoka
API Candida system	18–24 godz.	wysoki	wysoka
API yeast identification system	24 godz.	wysoka	niska
Microring YT system	24–48 godz.	niski	niska
Komercyjne systemy oparte na pożywkach chromogennych			
CHROMagar Candida system	24–48 godz.	niski	średnia
Fluorogenic membrane filtration method	9–11 godz.	niski	wysoka
Candida ID system	48 godz.	niski	średnia
Auxacolor system	24–72 godz.	średni	wysoka
Baxter MicroScan yeast identification panel	4 godz.	wysoka	wysoka
Uni-Yeast-Tek system	72 godz.	wysoka	wysoka
RapID yeast plus system	4–5 godz.	średni	wysoka
Fungichrom I	24–48 godz.	niski	wysoka
Fungifast I twin systems	24–48 godz.	niski	średnia
BiGGY agar system	72 godz.	niski	średnia
Specjalistyczne podejścia instrumentalne			
Vitek YBC system	22–24 godz.	średni	średnia
Vitek 2 ID-YST system	15 godz.	wysoka	wysoki
Abbott quantum II	24 godz.	wysoka	średnia
Microbial identification system	24 godz.	wysoka	średnia
Biotypowanie			
Test asymilacji Tween80	2–10 dni	niski	wysoka
Metody molekularne			
Multiplex-PCR	2 godz.	wysoki	wysoka
Nested PCR	4–6 godz.	wysoki	wysoka
Real-time PCR	4–5 godz.	wysoki	wysoka
Hybrydyzacji kwasów nukleinowych <i>in situ</i>	90 min	wysoki	wysoka
MALDI-TOF MS (bez przygotowania prób)	20 min	wysoki	wysoka
Nowe szybkie testy diagnostyczne			
Wykrycie (1,3)- β -d-glukanu	0,5–1 godz.	wysoki	średnia
Wykrycie galaktomannanu	8–24 godz.	wysoki	średnia

400 \times , w której stwierdzane jest wytwarzanie struktur przypominających krótkie strzępki przez *C. albicans* (oryginalnie struktury określanych są jako „germ tubes”) podczas inkubacji w surowicy w ciągu od 30 min do 2–4 godz. w temperaturze 37°C (2,8; **ryc. 1**). Filament to bezprzegrodowe rozszerzenie komórki drożdżowej, które różni się od strzępek (pseudohyphae) tym, że nie ma zwężeń w miejscu połączenia z komórką macierzystą. Test filamentacyjny zapewnia szybką identyfikację *C. albicans*, którą można przeprowadzić zarówno w sposób bezpośredni

z materiału klinicznego, jak również z uzyskanych kultur. Punktami krytycznymi tej metody są różne czynniki środowiskowe, takie jak temperatura (10), pH (11), skład pożywki (rodzaj surowicy), stężenie zastosowanego do badania inokulum i kontaminacja bakteryjne (12). Surowica ludzka wydaje się być najlepszą pożywką do testu filamentacji, w następnej kolejności wymienia się surowicę końską (13) i króliczą (14). Wykazano, że surowica ludzka pozwala uzyskać czułość metody wynoszącą 98% i swoistość 100% przy czasie inkubacji w temperaturze 37°C do



Ryc. 1. Zdjęcie mikroskopowe przedstawiające test filamentacyjny wykonany dla *Candida albicans* w surowicy króliczej po 1 godz. inkubacji (powiększenie 400x; w ramce strzałkami zaznaczony element charakterystyczny filamentów, tj. brak przewężenia w miejscu połączenia z komórką macierzystą)

2 godz. (14). Jako najważniejsze ograniczenia metody wskazywane są niespecyficzne wyniki pozytywne, które mogą być uzyskiwane dla innych niż *C. albicans* gatunków, przede wszystkim dla *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, co w konsekwencji prowadzi do błędnej identyfikacji, jeśli nie są stosowane inne techniki do potwierdzenia diagnozy (15, 16, 17, 18).

Inną popularnie stosowaną techniką w diagnostyce *Candida* spp. jest test tworzenia chlamydospor, struktur charakterystycznych dla *C. albicans*, *C. dubliniensis* i niektórych izolatów *C. tropicalis* (16, 17, 19). Przy zastosowaniu techniki płytek Dalmau możliwe jest obserwowanie chlamydospor jako zarodników o grubych ścianach, mocno załamujących promienie świetlne w mikroskopie, usytuowanych bocznie od komórki macierzystej lub na końcu strzępek (ryc. 2). Dane naukowe wskazują, że chlamydospor są to uśpione formy wzrostu, które powstają w warunkach wyczerpania składników odżywczych (20). Chociaż agar z mąką kukurydzianą i ekstraktem z ryżu jest najbardziej znanym podłożem indukującym tworzenie chlamydospor, w literaturze można odnaleźć szereg innych podłoży wzrostowych stosowanych w tym teście (21). Mosca i wsp. (22) wskazali, że obfite wytwarzanie chlamydospor u *C. dubliniensis* na agarze kazeinowym jest użyteczne do rozróżnienia tego gatunku od *C. albicans*. Inne podłoża, które również umożliwiają identyfikację *C. dubliniensis* przez tworzenie chlamydospor, obejmują agar z nasion słonecznika, agar tytoniowy i agar Staiba (21, 23). Tworzenie chlamydospor u *C. dubliniensis* może być radykalnie odmienne od tego, jakie występuje u *C. albicans*. Zasadnicza różnica polega na tym, że u *C. albicans* chlamydospor często przyłączone są parami, trojczkami lub jeszcze większymi skupiskami do tej

samej komórki macierzystej, a nie występują pojedynczo na końcach strzępek (lub pseudostrzępek), jak to opisywane jest dla *C. dubliniensis* (ryc. 2). W tym przypadku występują jednak istotne zmiany pomiędzy różnymi izolatami klinicznymi (19), dlatego rozróżnienie tych dwóch gatunków może wymagać zastosowania dodatkowych testów (21).

Prostym i tanim testem fenotypowym do różnicowania wymienionych dwóch gatunków jest określenie tolerancji temperaturowej. Grzyby z gatunku *C. dubliniensis* wykazują słaby wzrost lub brak wzrostu w temperaturze 42 i 45°C, podczas gdy drożdże *C. albicans* rosną dobrze w tych temperaturach (16, 24).

Auksanogram

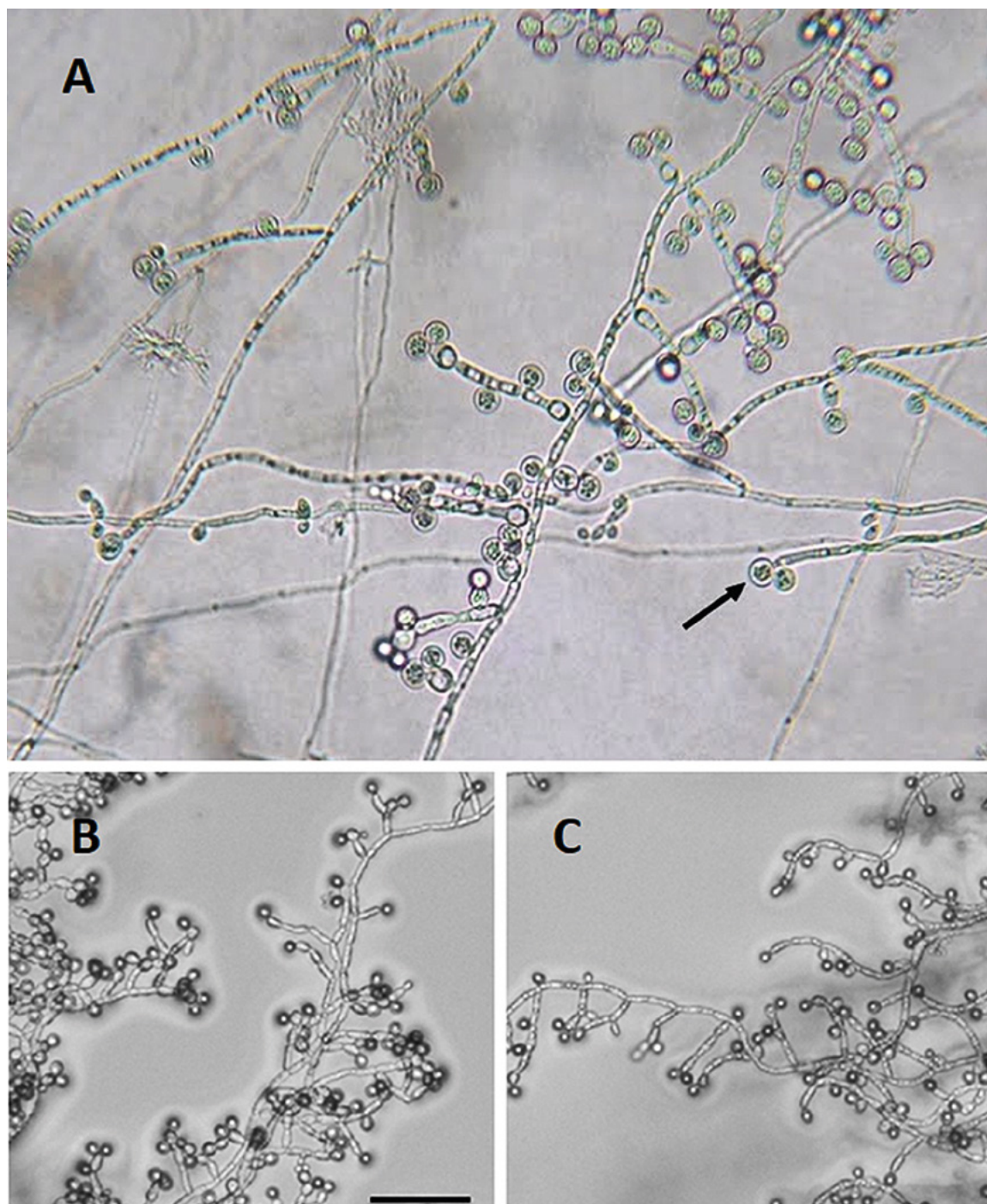
Test asymilacji substratów stanowiących źródło węgla opiera się na określeniu zdolności do przyswajania zestawu określonych węglowodanów jako jedynego źródła wymienionego pierwiastka biogenego. Technika ta jest szeroko stosowana w identyfikacji nie tylko drożdży, ale też innych grzybów oraz mikroorganizmów prokariotycznych. Zdolność konkretnego izolatu do przyswajania zestawu określonych węglowodanów jako jedynego źródła węgla była konwencjonalnie wykorzystywana w identyfikacji drożdżaków. Popularność tego testu można przypisać względnej prostocie metody, niskim kosztom i łatwej dostępności wystandaryzowanych protokołów (25).

Właściwości asymilacyjne różnych źródeł węgla można określić dwiema metodami, przy czym w obu jako baza wykorzystywane jest podłoże minimalne zawierające siarczan amonu i niezawierające aminokwasów (YNB, yeast nitrogen base). Podłoże to umożliwia wzrost drożdży dopiero po dodaniu odpowiedniego substratu stanowiącego źródło węgla. W pierwszej z metod, tzw. auksanograficznej, dyfuzja roztworów badanych cukrów odbywa się ze studzienek wyciętych w podłożu (ryc. 3). Okrągła strefa wzrostu grzyba wokół studzienek wskazuje na asymilację danego substratu węglowodanowego (26). Pomimo prostoty wykonania uważa się, że auksanografia jest czasochłonna (27). Alternatywną metodą stanowi wykorzystanie podłoża płynnego rozlanego do probówek. Każdy zestaw probówek zawiera podłoże podstawowe suplementowane innymi źródłami węgla. Po inkubacji określa się stopień wzrostu drożdży w probówkach.

Uzupełnienie auksanogramu stanowi badanie asymilacji azotanów. W tej metodzie drożdże hoduje się w podłożu bulionowym suplementowanym różnymi związkami będącymi źródłami azotu, a następnie wykonuje się reakcję z dwoma odczynnikami, tj. α -naftyloaminą i kwasem sulfanilowym. Metoda odznacza się wysoką czułością i swoistością (26).

Fermentacja węglowodanów

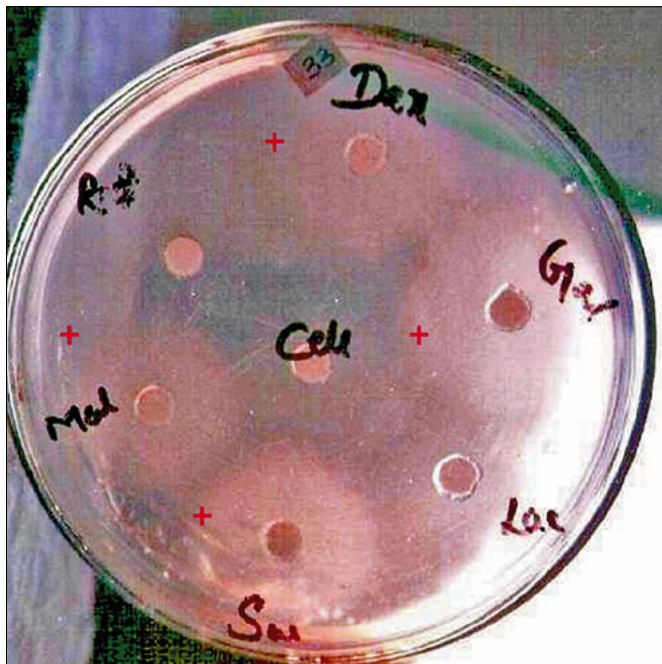
Testy fermentacyjne są zazwyczaj przeprowadzane w płynnych podłożach zawierających węglowodany z indykatozem zmian pH, a opierają się na wykazaniu po inkubacji obecności kwaśnych produktów metabolizmu, często wraz z towarzyszącym reakcji rozkładu wydzielanym dwutlenkiem węgla (28).



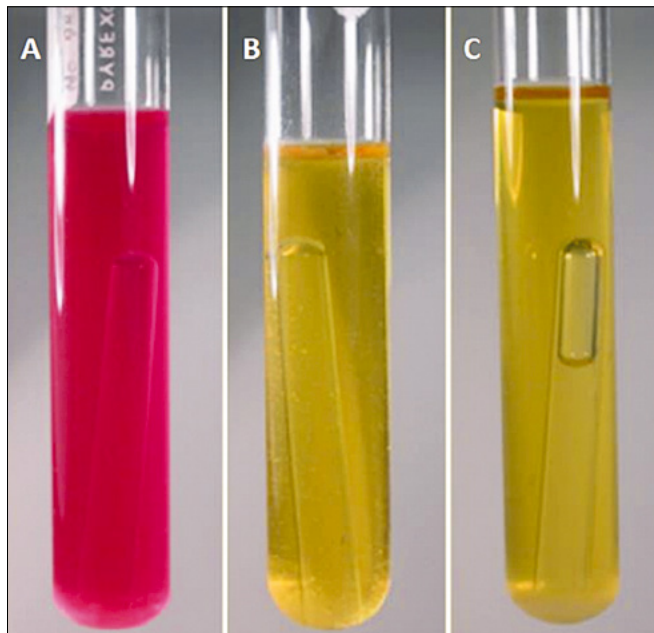
Ryc. 2. Chlamydospory charakterystyczne dla *Candida* spp. A: pokrój ogólny po hodowli w 27°C przez siedem dni na agarze ryżowym. B: obraz charakterystyczny dla *Candida albicans*. C: obraz charakterystyczny dla *Candida dubliniensis* (skala 100 µm)

Badane cukry dodawane są w 1% stężeniu do podłoża tzw. wody peptonowej, zawierającej wskaźnik Andrade (kwaśna fuksyna) lub błękit bromotymolowy (ryc. 4). Do próbek zawierających podłoże i cukry wkłada się dnem do góry małe probóweczki, tzw. rurki Durhama. Rurki te służą do wykrywania gazu wydzielanego podczas wzrostu drobnoustrojów i rozkładu przez nie substratów węglowodanowych. Wydzielany gaz zbiera się w rurce, w której widoczny jest w postaci pęcherzyka. Powstające w trakcie rozkładu cukrów kwasy organiczne prowadzą do zmiany pH środowiska, co z kolei powoduje zmianę barwy indykatora. W przypadku zastosowania wskaźnika Andrade barwa zmienia się

z koloru różowego na słomkowy, a jeżeli zastosowano błękit bromotymolowy z koloru niebieskiego na żółty (29). Zwyczajowo, ze względu na badanie rozkładu węglowodanów, test ten określa się jako tzw. szereg cukrowy. Chociaż fermentacja węglowodanów jest przydatnym testem do różnicowania w obrębie rodzaju *Candida*, ten test jest uważany za mniej czuły, a tym samym mniej wiarygodny niż auksanogram (26). Ponadto, ograniczeniem wszystkich testów fizjologicznych jest ich czasochłonność i pracochłonność, stąd ich wykorzystanie w klinicznych laboratoriach diagnostycznych, w których musi występować wysoka przepustowość próbek, jest coraz rzadsze (7).



Ryc. 3. Auksanogram wykonany dla *Candida albicans*. Oznaczenia „+” wskazują na pozytywny wynik reakcji



Ryc. 4. Sposób wykonania badania fermentacji węglowodanów. A: podłoże kontrolne. B: fermentacja bez produktów gazowych. C: fermentacja z wydzielaniem gazu



48 h	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
72 h	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	0	GLL	GLY	ZKG	ARR	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TFE	MLZ	RAF	Przebieg
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	(2)	(7)	(6)	(4)	(7)	(7)	(4)	(7)	(7)	(4)	(7)	(7)	(4)	(7)	(7)	(4)	(7)	(7)	(4)	(7)	(7)

Ryc. 5. Przykładowy pasek testu API oraz karta odczytu wyniku z przypisanymi punktami tworzącymi profil identyfikacyjny

Szybkie testy komercyjne

Na rynku komercyjnym dostępnych jest kilka prostych systemów diagnostycznych opracowanych w oparciu o test filamentacyjny, tworzenie chlamydospor i auksanogram. Te komercyjne metody często stanowią zminiaturyzowaną wersję konwencjonalnych testów, umożliwiając wygodniejszą i szybszą identyfikację gatunkową w obrębie rodzaju *Candida*. Poniżej omówiono najpopularniejsze metody komercyjne.

System API 20C Aux

System API 20C (Analytab Products, Plainview, NY, USA) był jednym z pierwszych komercyjnych zestawów identyfikacyjnych wprowadzonych do diagnostyki kandydoz. Ten system nie jest już dostępny, został zastąpiony przez API 20C Aux (bioMérieux Vitek, Hazelwood, MO, USA). System API 20C Aux składa

się z 19 testów asymilacji węglowodanów w formie małych studzienek zebranych w pasek, na którym do każdego testu przypisana jest wartość punktowa (ryc. 5). Po inkubacji w 30°C przez 24, 48 i 72 godz. wzrokowo oceniane jest występowanie zmętnienia w studzienkach, wyniki dodatnie umożliwiają przeliczenie wartości punktowej, stanowiącej numer profilu. Ostateczna identyfikacja jest wspomagana komputerowo, podejście numeryczne umożliwia klasyfikację profilu punktowego według skali – doskonała, bardzo dobra, dobra lub akceptowalna identyfikacja (30). Ogólnie rzecz biorąc, system API 20C Aux wydaje się być wysoce wiarygodnym narzędziem diagnostycznym w różnicowaniu gatunków *Candida*, oferując wskaźniki identyfikacji wyższe niż 85% (30). Salkin i wsp. (31) zasugerowali, że w systemie tym, gatunek *C. dubliniensis* można odróżnić od *C. albicans* na podstawie braku asymilacji ksylozy i α -metylo-D-glukozydu pierwszego z wymienionych. Z drugiej strony badania naukowe wykazały problemy ze zdolnością systemu API 20C Aux do prawidłowej identyfikacji gatunku *C. krusei* (32, 33). Według Liguori i wsp. (34) podczas wysiewu inokulum do studzienek wymagana jest precyzja, prawidłowa interpretacja poziomu zmętnienia wymaga od diagnosty ponadprzeciętnych umiejętności, a czas odczytu dla uzyskania wyniku może wynosić nawet do 72 godz.

System ID 32C

System ID 32C (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja) jest szeroko stosowany w Europie, w wielu laboratoriach klinicznych jest uznawany za system referencyjny, dzięki wysokiej dokładności identyfikacji osiągającej powyżej 92% po 48–72 godz. inkubacji (35, 36). System zawiera bazę danych dla 63 różnych gatunków *Candida* spp. i składa się z plastikowego paska z 32 studzienkami do przeprowadzenia

29 testów asymilacji, pojedynczej studzienki jako kontroli ujemnej, pozytywnej i testu kolorymetrycznego (2, 36). Według Pincusa i wsp. (37) prawidłowa identyfikacja może wahać się od 88,5 do 98,0% w porównaniu z konwencjonalnymi metodami. Dane z badania Ramani i wsp. (36) wykazały, że system ID 32C jest tak samo skuteczny jak API 20C w identyfikacji drożdży i patogenów drożdżopodobnych, które są izolowane w laboratorium klinicznym. Z drugiej strony, ostatnie badania wykazały niskie wskaźniki identyfikacji systemu ID 32C w porównaniu z innymi systemami biochemicznymi, m.in. Auxacolor i Vitek 2 YST oraz analizą techniką spektrometrii masowej (5, 38). Niedawne włączenie specyficznych profili asymilacji węglowodanów dla gatunku *C. dubliniensis* do baz danych systemów ID 32C i API 20C Aux poprawiło wiarygodność identyfikacji tego gatunku w laboratoriach klinicznych. Badanie Cardenes-Perera i wsp. (39) wykazało, że system ID 32C prawidłowo zdiagnozował 96% izolatów *C. dubliniensis*. Podobnie Pasligh i wsp. (40) sugerują, że specyficzność systemu ID 32C jest wysoka i użyteczna do wiarygodnej identyfikacji *C. dubliniensis*.

System API Candida

System API Candida (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja) składa się z paska zawierającego 10 studzienek, na którym wykonywane są testy fermentacji węglowodanów i testy enzymatyczne (41–43). System przeznaczony jest do identyfikacji 15 gatunków *Candida* spp. po 18–24 godz. inkubacji w temperaturze 35°C (41, 43). Reakcje są interpretowane wizualnie na podstawie zmiany koloru zabarwienia inokulum w studzience bez konieczności dodawania odczynników, jak to ma miejsce w wielu innych systemach API. Według Fricker-Hidalgo i wsp. (41) czułość systemu API Candida wynosi odpowiednio 97,4% z zastosowaniem dodatkowych testów i 75,2% bez tych testów. Gatunki prawidłowo zidentyfikowane przez ten system bez zastosowania dodatkowych testów to *C. tropicalis* (86,7%), *C. parapsilosis* (89,7%), *C. lusitanae* (91,2%), *C. glabrata* (96,8%), *C. albicans* (96,9%), *C. guilliermondii* (100%) i *C. kefyr* (100%). Bernal i wsp. (42) wykazali, że za pomocą systemu API Candida prawidłowo zidentyfikowano 91,4% izolatów, kiedy posiłkowano się dodatkowymi testami (100% izolatów *C. glabrata*, 100% *C. lusitanae*, 97,6% *C. albicans* i 82,6% *C. parapsilosis*) i 71,7% izolatów bez wykonywania dodatkowych testów. Niezależnie od sposobu postępowania laboratoryjnego dla identyfikacji *C. krusei* wymagane jest wykonanie dodatkowych testów. System API Candida został oceniony przez diagnostów jako łatwy w obsłudze i interpretacji (41,42) oraz pozwalający uzyskać wyniki szybciej niż przy użyciu systemu API 20C (42). Ponadto błędów w identyfikacji drożdży przy użyciu systemu API Candida można uniknąć, jeśli do profilu numerycznego dodane zostaną wyniki analiz morfologicznych (43).

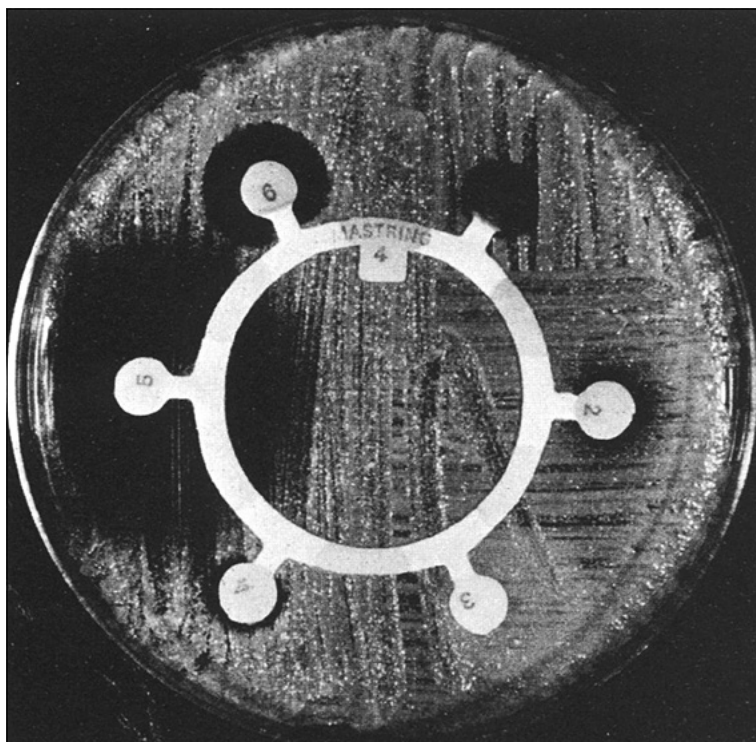
System identyfikacji API

System identyfikacji API (Analytab Products, Plainview, NY, USA) składa się z paska zawierającego 20 studzienek zawierających odwodnione substraty

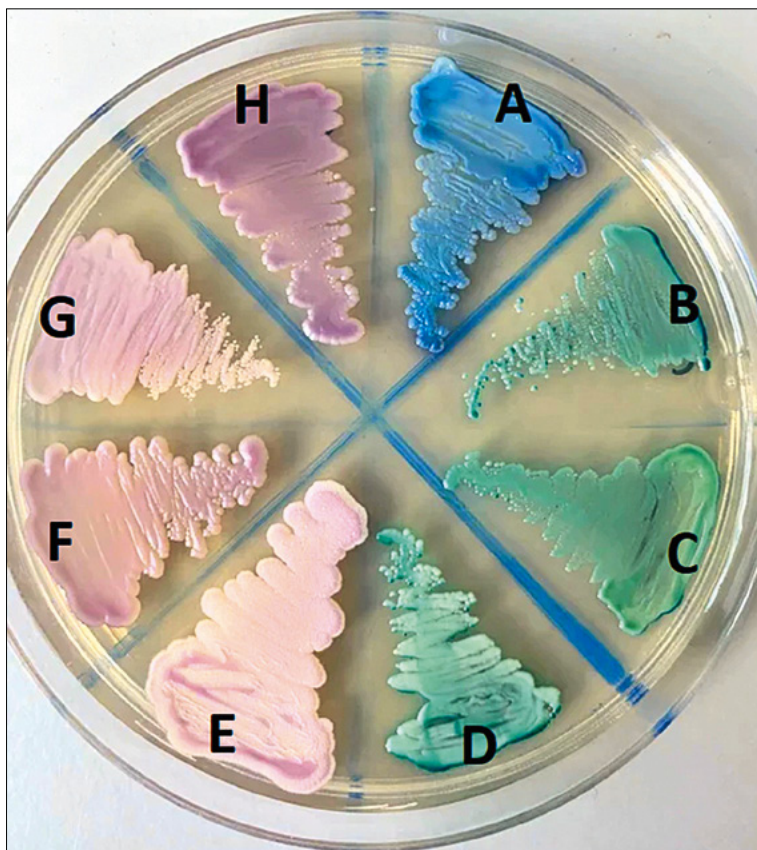
lub pożywki (44). W tym systemie stosowany jest chromogeny sposób interpretacji wyników, tj. poszczególne substraty związane są z chromogenem, a zmiany koloru w studzienkach testowych następują wyłącznie w wyniku reakcji enzymatycznych. Takie podejście jest zupełnie odmienne od pozostałych szybkich systemów identyfikacji, gdzie większość reakcji oparta jest na analizie fermentacji węglowodanów, a nie na analizie reakcji enzymatycznych (44). System identyfikacji API wykazuje raczej niespójną zdolność do identyfikacji izolatów klinicznych, przy ogólnym wskaźniku identyfikacji wynoszącym od 55 do 60% (44, 45). Ponadto zostały zgłoszone problemy z ograniczoną bazą danych i trudnościami w interpretacji testu (44).

System Microring YT

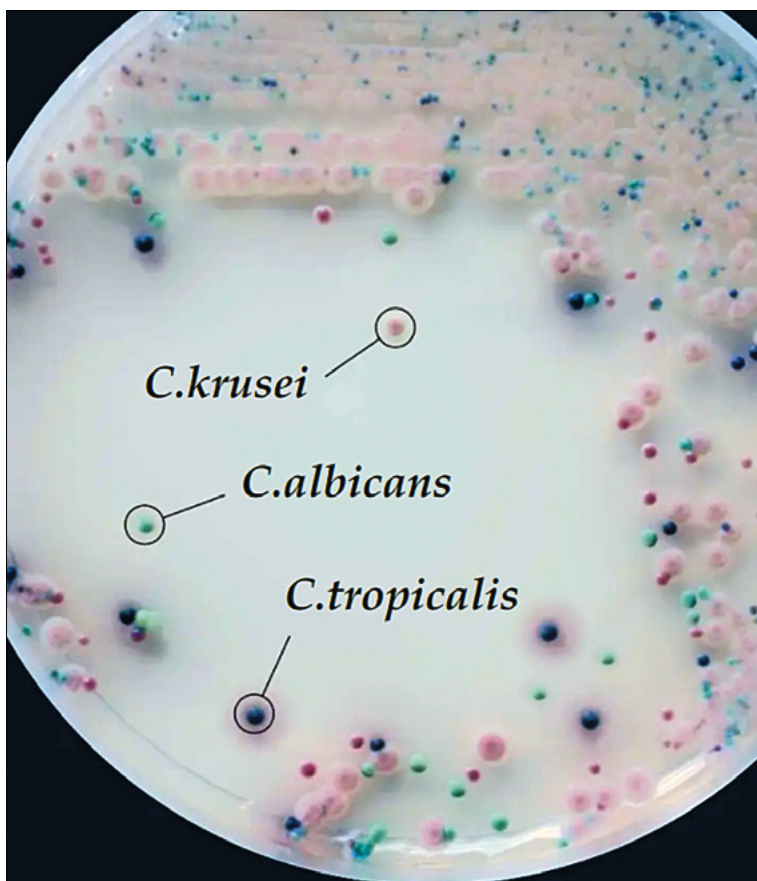
System Microring YT (MYT; Medical Wire & Equipment Co, Victory Gardens, NJ, USA) został wprowadzony z zamierzeniem taniej i szybkiej metody identyfikacji najczęściej izolowanych gatunków *Candida*. W systemie badana jest zdolność izolatów klinicznych do wzrostu w pobliżu krążków bibuły filtracyjnej nasączonych sześcioma różnymi reagentami i barwnikami: zielenią janusową, bromkiem etydy, chlorkiem trifenylotetrazoliowym, zielenią brylantową i rodaminą 6G (6, 7). Po inkubacji mierzy się strefy zahamowania wzrostu wokół każdego krążka (ryc. 6). Chociaż system jest prosty w użyciu i stosunkowo niedrogi, badania sugerują, że dokładna identyfikacja gatunkowa tą metodą jest trudna (6, 46). Identyfikacje często różniły się w zależności od badania, co najprawdopodobniej wynika z niskiej wiarygodności oceny. McGowan i Mortensen (46) zaobserwowali, że system MYT jest odpowiedni do identyfikacji *C. albicans* (96%) i *C. glabrata* (91%), ale nie jest w stanie poprawnie zidentyfikować innych powszechnych



Ryc. 6. Wygląd płytki z paskiem Microring YT w identyfikacji *Candida albicans*



Ryc. 7. Wzrost na podłożu CHROMagar po 48 godz. w 35°C. A: *Candida tropicalis*. B: *C. albicans*. C: *C. dubliniensis*. D: *C. albicans* (inny szczep). E: *C. krusei*. F: *C. kefyr*. G: *C. parapsilosis*. H: *C. glabrata*



Ryc. 8. Różnicowanie najpopularniejszych gatunków grzybów *Candida* na podłożu CHROMagar (materiał ze strony producenta: www.chromagar.com)

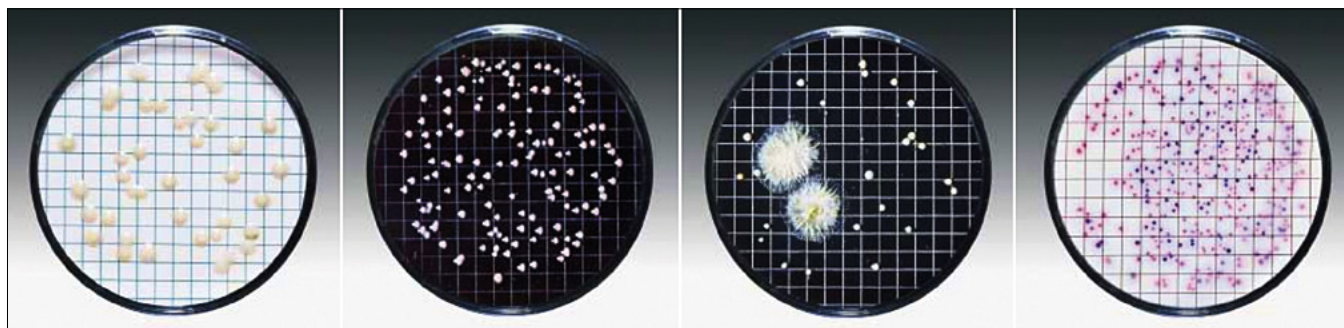
izolatów klinicznych, takich jak *C. guilliermondii* (0%), *C. lusitanae* (29%) i *C. parapsilosis* (36%). Zgadza się to z badaniami Shanklandem i wsp. (6), którzy wykazali, że gatunki *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* były najtrudniejszymi do identyfikacji przy użyciu tego systemu.

Systemy oparte o podłoża chromogenne

Identyfikacja przy użyciu CHROMagar Candida

CHROMagar Candida (CHROMagar Company, Paryż, Francja) to selektywne i różnicujące podłoże do izolacji i identyfikacji trzech gatunków *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (8, 47). Po 24–48 godz. inkubacji w temperaturze 35°C wyrastają kontrastowo zabarwione kolonie, których barwa jest zróżnicowana z powodu rozkładu chromogennych substratów przez inne, specyficzne dla gatunku enzymy (47, 48; ryc. 7). Stosowanie tego podłoża daje wiele korzyści w laboratorium diagnostycznym, przede wszystkim ułatwia wykrywanie mieszanin gatunków drożdży na jednej płytce izolacyjnej, a powszechnie wiadomo, że niektóre gatunki, m.in. *C. dubliniensis* i *C. albicans*, izolowane są wspólnie z jednej próbki (24). Na tym podłożu kolonie *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei* przybierają barwę odpowiednio zielonkawą, ciemnoniebieskoszarą z efektem „halo” lub fioletową (ryc. 8). Inne gatunki wyrastają w postaci koloni o barwie od białej do ciemnoróżowej (47). Ponadto doniesienia naukowe sugerują, że na podłożu CHROMagar Candida ciemnozielony wygląd *C. dubliniensis* można również wiarygodnie odróżnić od wyglądu *C. albicans* (17, 24, 49). Niemniej jednak charakterystyczna ciemnozielona barwa kolonii *C. dubliniensis* może zostać utracona po przechowywaniu materiału w temperaturze -70°C, przy czym jasnozielony kolor kolonii *C. albicans* nie ulega wówczas zmianie (50). Zjawisko to wynika prawdopodobnie ze zdolności *C. dubliniensis* do wykazywania mozaiki fenotypowej w zależności od warunków środowiskowych (24). W badaniu Kirkpatricka i wsp. (51) ujawnione zostało, że 46% atypowych klinicznych izolatów *C. albicans*, które na podłożu Chromagar Candida uzyskało ciemnozielony kolor, zostało następnie błędnie zidentyfikowanych jako *C. dubliniensis*. Autorzy zasugerowali, że pierwotną izolację atypowych kolonii *C. albicans* na podłożach chromogennych można wykorzystać jako test przesiewowy do dodatkowych testów identyfikacyjnych. Niektórzy badacze sugerowali, że *C. glabrata* można zidentyfikować z niemal tak wysoką dokładnością jak *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei* przy użyciu podłoża CHROMagar (47, 52), chociaż inni autorzy nie zgadzają się z tym twierdzeniem (8, 53). Hospenthal i wsp. (54) zasugerowali, że kolonie *C. glabrata* mają kolor ciemnofioletowy, który można odróżnić od różowego i białego koloru wytwarzanego przez inne gatunki. Szczególną zaletą pożywki jest jednak jej zdolność do wykrywania mieszanych zakażeń drożdżakami w jednej próbce klinicznej (53).

W próbie opracowania agaru do szybkiej i prostej identyfikacji drożdżaków opornych na flukonazol bezpośrednio z próbek klinicznych do Chromagar



Ryc. 9. Metoda filtracji membranowej w identyfikacji grzybów *Candida* spp.

Candida dodawano flukonazol, a wyniki były korelowane ze standardowym testem metodą mikro-rozcieńczeń. W przypadku tej zmodyfikowanej pożywki udało się przewidzieć wrażliwość *C. albicans* i innych gatunków tego rodzaju na flukonazol (55). Metoda nie weszła jednak do rutynowego użycia laboratoryjnego.

Metoda fluorogennej filtracji membranowej

W 1999 r. Bauters i wsp. (56) opisali metodę poprawy czułości i szybkości systemów enzymatycznych do wykrywania drożdży za pomocą nietypowej 2-etapowej metody polegającej na tworzeniu mikrokolonii na nylonowym filtrze membranowym, a następnie oznaczeniu aktywności enzymów przy użyciu substratów fluorogennych, z wykorzystaniem zjawiska przepuszczalności membrany (ryc. 9). Metoda fluorogennej filtracji membranowej umożliwia wykrycie identyfikację *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. tropicalis* w ciągu 9–11 godz. (56). Połączenie zastosowania podłoża CHROMagar z filtracją membranową pozwalało zwiększyć zdolność detekcji i identyfikacji drożdży o 16,7% (48).

System ID Candida

System ID Candida (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja) jest oparty na chromogennym podłożu zawierającym substrat indoliloglukozaminidowy, który jest hydrolizowany przez *C. albicans* do nierozpuszczalnego turkusowego lub niebieskiego produktu. Na tym podłożu kolonie *C. tropicalis*, *C. lusitanae* i *C. guilliermondii* są różowe, a kolonie pozostałych gatunków *Candida* białe (tab. 2). Identyfikacja gatunku *C. albicans* za pomocą systemu ID Candida wydaje się być szybsza niż w przypadku stosowania podłoża CHROMagar (49), a jej czułość osiąga aż 97,7% po 48 godz. (57). Ponadto system ID Candida umożliwia detekcję

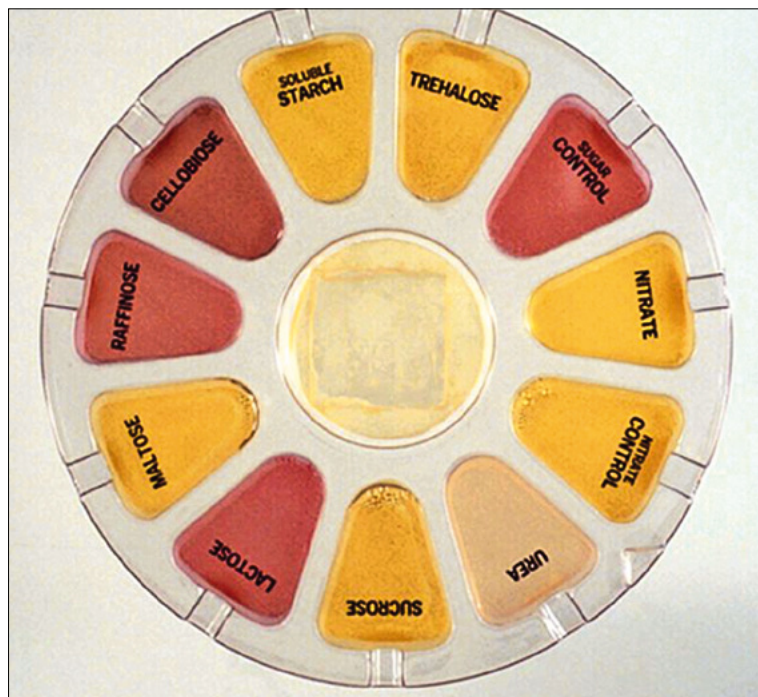
prób zawierających więcej niż jeden gatunek *Candida* spp. i wykazuje lepszą zdolność do identyfikacji gatunków drożdży sprawiających trudności diagnostyczne, np. *C. lusitanae*, *C. kefyr* i *C. guilliermondii* (57). Letscher-Bru i wsp. (57) stwierdzili jednak, że system jest niewystarczająco selektywny w stosunku do kontaminacji bakteryjnych, co powoduje zahamowanie wzrostu grzybów w próbkach zanieczyszczonych bakteriami i ryzyko pomylenia kolonii bakterii zabarwionych na niebiesko ze wzrostem *C. albicans*.

System Auxacolor

System Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paryż, Francja) zawierał początkowo bazę danych dla 26 gatunków *Candida* i składał się z jednorazowej plastikowej mikropłytki zawierającej 16 studzienek. Pierwsza studzienka stanowi kontrolę ujemną, kolejnych 13 studzienek to kolorymetryczne testy biochemiczne, przede wszystkim oparte na konwencjonalnej asymilacji węglowodanów, kolejna jest testem oporności na cykloheksymid, a ostatnia służy do badania aktywności oksydazy fenolowej (43, 58, 59). Mikropłytki odczytuje się po 24–72 godz. inkubacji w 30°C, a wzrost grzybów uwidaczniany jest zmianą barwy wskaźnika pH (60). Campbell i wsp. (43) oraz Romney i wsp. (59) zaobserwowali, że za pomocą systemu Auxacolor możliwa była prawidłowa identyfikacja 94 i 91,2% izolatów odpowiednio w ciągu 48 i 72 godz. od inokulacji. Wyniki te zgadzają się z analizami Shepparda i wsp. (58), którzy stwierdzili ogólny odsetek prawidłowych identyfikacji na poziomie 91,4%. Natomiast inne badania (35, 60) wykazały niższą czułość wynoszącą 80–86%. Zaletą systemu jest to, że izolaty są identyfikowane nie tylko na podstawie cech biochemicznych, ale także uwzględniane są cechy morfologiczne, takie jak zdolność do tworzenia grzybni, co zmniejsza potrzebę wykonywania dodatkowych testów (60). Spośród gatunków *Candida* system Auxacolor umożliwia

Tabela 2. Wygląd kolonii gatunków klasyfikowanych w rodzaju *Candida* z zastosowaniem systemu ID Candida

Gatunek	Barwa kolonii	Powierzchnia kolonii	Brzeg kolonii	Odczyt wyników
<i>C. albicans</i>	turkusowa/miętowa	gładka, błyszcząca	gładki	od 24 do 72 godz.
<i>C. glabrata</i>	jasnoróżowa	gładka, błyszcząca	gładki	
<i>C. krusei</i>	jasnoróżowa	szorstka, matowa	nieregularny	
<i>C. tropicalis</i>	metaliczna, niebieska, granatowa	gładka, błyszcząca	gładki	
Pozostałe gatunki	mlecznobiała, szaromleczna bądź kremowa	gładka, szorstka bądź błyszcząca, matowa	gładki lub nieregularny	



Ryc. 10. Płytkę systemu Uni-Yeast-Tek do identyfikacji drożdży *Candida*

identyfikację *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (43, 58, 59), *C. kefyr*, *C. zelanoydes* (59), *C. lipolytica* (58, 59) oraz *C. inconspicua* (58).

System Uni-Yeast-Tek

System Uni-Yeast-Tek (Flow Laboratories, Inc., Baltimore, Maryland, USA) składa się z wieloczęściowej szalki zawierającej podłoża stałe do badania następujących cech: asymilacji źródeł węgla, rozkładu mocznika, asymilacji azotanów oraz umieszczone centralnie podłoże skomponowane z mąki kukurydzianej suplementowane Tween 80, 0,05% glukozy i 2,6% ekstraktu wołowego (ryc. 10). System umożliwia identyfikację 16 gatunków drożdży *Candida* (15). Do celów testowych każdą studzienkę zaszczebia się jedną kroplą inokulum o gęstości 4 w skali McFarlanda przygotowanego w wodzie destylowanej. Reakcje obserwuje się pod kątem zmiany barwy z fioletowej na żółtą (reakcja dodatnia), a pożywkę azotanową na podstawie zmiany koloru z żółtego na niebiesko-zielony. Agar z mąki kukurydzianej jest natomiast badany mikroskopowo pod kątem obecności strzępek lub blastokonidii. Według Bowmana i Ahearna (15) system pozwala na wskaźnik identyfikacji w zakresie od 99 do 99,8% dla 16 gatunków *Candida* powszechnie izolowanych w laboratorium klinicznym. W badaniu przeprowadzonym przez Coopera i wsp. (61) nawet do 92% izolatów testowanych za pomocą tego systemu zostało prawidłowo zidentyfikowanych w ciągu 72 godz. Odmiennie wyniki uzyskali Salkin i wsp. (45), którzy odnotowali poprawny wskaźnik identyfikacji tylko dla 40% izolatów. Obecnie podawane jest, że główną zaletą stosowania systemu Uni-Yeast-Tek w laboratoriach klinicznych jest jego szybkość, ponieważ jeden technik może zaszczebić 50–75 płytek podczas jednej sesji trwającej ok. godziny. Z kolei

poważną wadą jest to, że system wymaga monitorowania wzrostu drożdży przez okres do sześciu dni przed ustaleniem ostatecznej identyfikacji (15, 45).

System RapID plus

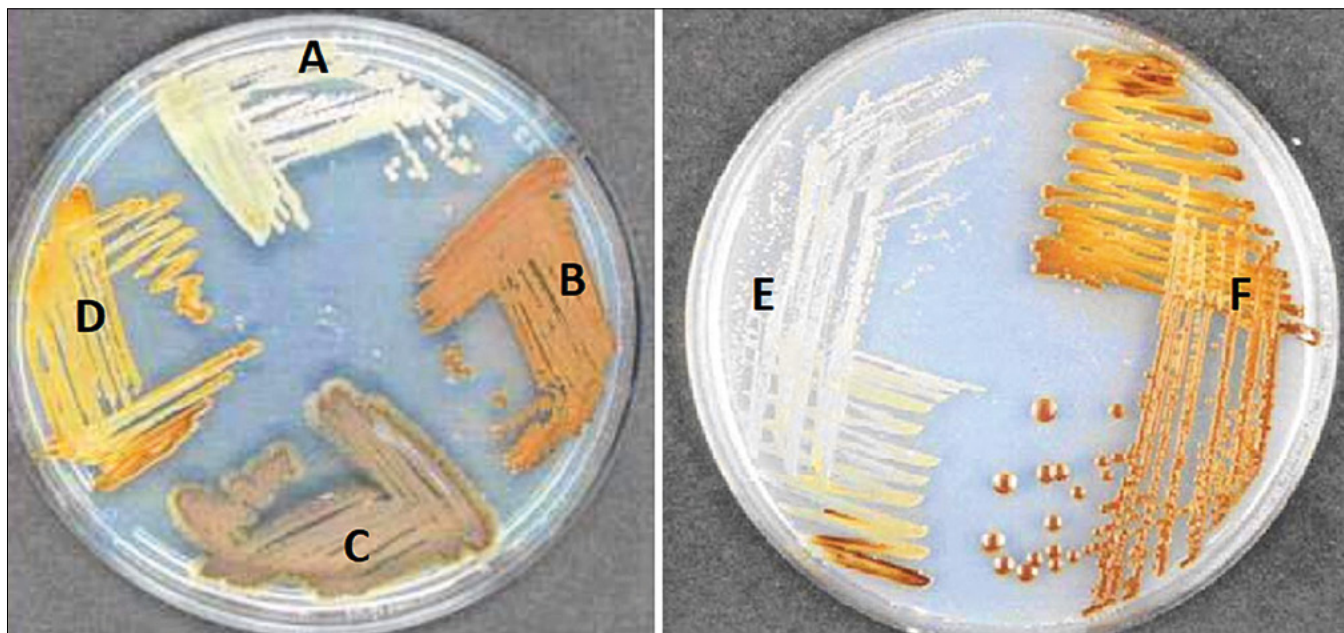
System RapID plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Georgia, USA) to mikrometoda wykorzystująca 18 konwencjonalnych i chromogennych substratów do identyfikacji klinicznie ważnych drożdży *Candida* z próbek klinicznych już po 4 godz. inkubacji (32). W kilku badaniach naukowych oceniono przydatność systemu RapID plus do identyfikacji zarówno powszechnych, jak i nowo pojawiających się patogenów z tej grupy grzybów i wykazano, że system ten okazał się bardzo dokładny w identyfikacji najczęściej izolowanych drożdży (32, 62, 63). Heelan i wsp. (63) stwierdzili doskonałą (99%) identyfikację powszechnych klinicznych izolatów drożdży, takich jak *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. glabrata*. Wadlin i wsp. (32) zaobserwowali, że system ten uzyskał 96% wiarygodność wyników i był lepszy niż API 20C Aux oraz inne zautomatyzowane systemy do identyfikacji drożdży, które nie wymagają stosowania dodatkowych testów. Ci autorzy stwierdzili ponadto, że system RapID plus umożliwiał identyfikację *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. krusei* w 100% próbek, *C. glabrata* w 91% próbek, *C. parapsilosis* w 92% i *C. lusitaniae* w 86%. Jednak według Espinel-Ingroff i wsp. (62) metoda ta powinna być stosowana z ostrożnością przy identyfikacji rzadkich drożdżaków. Ponadto biochemiczne markery identyfikacyjne są czasami trudne do interpretacji, ponieważ reakcje barwne są w niektórych przypadkach niejednoznaczne. W badaniu przeprowadzonym przez Buchaille i wsp. (35) rozróżnienie panelu tych samych drożdży różniło się wśród kilku badaczy, mimo że wszystkie zestawy pochodziły z tej samej partii. Takie ograniczenie systemu RapID plus może być związana z trudnością w rozróżnieniu żółtych odcieni podłoży chromogennych (33).

System Fungichrom I and Fungifast I

Systemy bliźniacze Fungichrom I i Fungifast I (International Microbio, Parc d'activites-allee D'athenes, Francja) składają się odpowiednio z 16 i 10 studzienek testowych. W obu systemach zmiany koloru są badane po inkubacji przez 24–48 godz. w temperaturze 30°C. Według Buchaille i wsp. (35) Fungichrom I jest odpowiednim systemem dla niespecjalistycznych laboratoriów mikrobiologii klinicznej ze względu na swoją prostotę i stosunkowo dobry wskaźnik identyfikacji wynoszący 85%. Szczepy *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. parapsilosis* zostały zidentyfikowane przez ten system bez dodatkowych testów. Badacze wskazują również, że system Fungifast nie jest tak wiarygodny i szybki jak system Fungichrom I (35).

System oparty na podłożu BIGGY agar

Agar BiGGY (Oxoid Company, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, Wielka Brytania) jest podłożem chromogennym, na którym kolonie drożdży *Candida*



Ryc. 11. Wzrost grzybów z rodzaju *Candida* na agarze BIGGY. A: *C. parapsilosis*, B: *C. tropicalis*. C: *C. krusei*. D: *C. albicans*. E: *C. glabrata*. F: *C. albicans*

przybierają barwę brązową do czarnej, co jest spowodowane poprzez zewnątrzkomórkową redukcję siarczynu bizmutu do siarczku bizmutu, jaki prowadzą te grzyby. Szczepy *C. albicans* i *C. tropicalis* mają odpowiednio kolor jasnobrązowy oraz ciemnobrązowy, stąd są trudne do odróżnienia przy hodowli na agarze BiGGY (ryc. 11). *Candida krusei* tworzy typowe duże, szorstkie, ciemnobrązowe kolonie z otaczającą je strefą żółtą, a *C. parapsilosis* rośnie na agarze BiGGY w postaci jasnobrązowo-zielonkawych bądź szarokremowych kolonii. Czułość podłoża została oceniona na 87 (64) do 91% (65) dla *C. albicans*, 66,6 (52) do 87% (65) dla *C. tropicalis* i 100% dla *C. krusei* (52, 65). Swoistość wahała się od 75,2 (52) do 92,7% (65) dla *C. albicans*, 91,7 (65) do 95,4% (52) dla *C. tropicalis* i 99,5 (65) do 100% (52) dla *C. krusei*.

Podsumowanie

Szybka i dokładna identyfikacja gatunkowa grzybów z rodzaju *Candida* ma kluczowe znaczenie z klinicznego punktu widzenia, zarówno w przypadkach kandydozy miejscowej, jak i ogólnoustrojowej. Jednym z istotnych problemów wczesnego rozpoznania zakażeń grzybiczych jest niespecyficzność objawów klinicznych. Ponadto wykonanie badania hodowlanego niejednokrotnie daje wynik ujemny lub wynik dodatni pojawia się zbyt późno, aby można było rozpocząć skuteczną terapię przeciwgrzybiczą. W związku z tymi problemami opracowano wiele nowatorskich podejść diagnostycznych. Niemniej jednak konwencjonalna metodologia wciąż uważana jest za wzorcową w identyfikacji gatunków drożdży *Candida*. Metody te są jednak pracochłonne, czasochłonne i obciążone wysokim ryzykiem błędu w identyfikacji szerokiego spektrum gatunków *Candida* i zwykle wymagają uzupełnienia o dodatkowe testy. Wachlarz tych technik uzupełniających jest bardzo obszerny, a wybór odpowiedniego narzędzia w dużej mierze zależy od diagnostyki.

Piśmiennictwo

1. Staniszevska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W.: Patogeneza i leczenie zakażeń. *Postep Mikrobiol.* 2014, 53, 229–240.
2. Cárdenes C.D., Carrillo-Muñoz A.J., Arias A., Rodríguez-Alvarez C., Torres-Lana A., Sierra A., Arévalo M.P.: Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Microbiol Methods.* 2004, 59, 293–297.
3. Hartz Alves S., Pipolo Milan E., De Laet Sant'Ana P., Oliveira L.O., Santurio J.M., Lopes Colombo A.: Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002, 43, 85–86.
4. Coleman D.C., Sullivan D.J., Bennett D.E., Moran C.P., Barry H.J., Shanley D.B.: Candidiasis: The emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *Aids.* 1997, 11, 557–567.
5. Costa A.R., Silva F., Henriques M., Azeredo J., Oliveira R., Faustino A.: *Candida* clinical species identification: Molecular and biochemical methods. *Ann Microbiol.* 2010, 60, 105–112.
6. Shankland G.S., Hopwood V., Forster R.A., Evans E.G.V., Richardson M.D., Warnock D.W.: Multicenter evaluation of Microring YT, a new method of yeast identification. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 2808–2810.
7. Williams D.W., Lewis M.: Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000, 6, 3–11.
8. Hoppe J.E., 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, 188–191.
9. Guzel A.B., Ilkit M., Akar T., Burgut R., Demir S.C.: Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med. Mycol.* 2010, 49, 16–25.
10. Mackenzie D.W.R.: Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Pathol.* 1962, 15, 563–565.
11. Pollack J.H., Hashimoto T.: The role of glucose in the pH regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133, 415–424.
12. Purohit B.C., Joshi K.R., Ramdeo I.N., Bharadwaj T.P.: The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Proteus vulgaris*. *Mycopathologia.* 1977, 62, 187–189.
13. Arora D.R., Saini S., Aparna., Gupta N.: Evaluation of germ tube test in various media. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2003, 46, 124–126.
14. Hilmioglu S., Ilkit M., Badak Z.: Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses.* 2007, 50, 282–285.
15. Bowman P.I., Ahearn D.G.: Evaluation of the Uni-Yeast-Tek kit for the identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1975, 2, 354–358.
16. Sullivan D.J., Moran G., Donnelly S., Gee S., Pinjon E., McCartan B., Shanley D.B., Coleman D.C.: *Candida dubliniensis*: An update. *Rev. Iberoam. Micol.* 1999, 16, 72–76, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473572>

17. Gutiérrez J, Morales P, González M.A., Quindós G.: *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic. Microbiol.* 2002, **42**, 207–227.
18. Kim T.H., Park B.R.G., Kim H.R., Lee M.K.: *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea. *J. Clin. Lab. Anal.* 2010, **24**, 145–148.
19. Kim D., Shin W.S., Lee K.H., Kim K., Park J.Y., Koh C.M.: Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39 °C. *Yeast.* 2002, **19**, 957–962.
20. Shin J.H., Nolte F.S., Holloway B.P., Morrison C.J.: Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 165–170.
21. Staib P, Morschhäuser J.: Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – An enigmatic developmental programme. *Mycoses.* 2007, **50**, 1–12.
22. Mosca C.O., Moragues M.D., Llovo J., Al Mosaid A., Coleman D.C., Pontón J.: Casein agar: A useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 1259–1262.
23. Bosco-Borgeat M.E., Taverna C.G., Cordoba S., Isla M.G., Murisengo O.A., Szusz W., Vivot W., Davel G.: Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia in Argentina: Identification by a Novel Multiplex PCR and Comparison of Different Phenotypic Methods. *Mycopathologia.* 2011, **172**, 407–414.
24. Campanha N.H., Neppelenbroek K.H., Spolidorio D.M.P., Spolidorio L.C., Pavarina A.C.: Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 2005, **11**, 392–398.
25. Latouche G.N., Daniel H.M., Lee O.C., Mitchell T.G., Sorrell T.C., Meyer W.: Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 3171–3180.
26. Ja D., Samyukta Reddy B.V.: Laboratory Diagnosis of Oral Candidiasis. *J. Orofac. Sci.* 2010, **2**, 70–74.
27. Fenn J.P., Segal H., Barland B., Denton D., Whisenant J., Chun H., Christofferson K., Hamilton L., Carroll K.: Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 1994, **32**, 1184–1187.
28. Roberts G.D., Wang H.S., Hollick G.E.: Evaluation of the API 20 C microtube system for the identification of clinically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1976, **3**, 302–305.
29. Schau H.-P.: J.F. MacFaddin, Media for Isolation – Cultivation – Identification – Maintenance of Medical Bacteria, Volume I. XI + 929 S., 163 Abb., 94 Tab. Baltimore, London 1985. Williams and Wilkins. ISBN: 0-683-05316-7. *J. Basic Microbiol.* 1986, **26**, 240–240.
30. Freydiere A.M., Guinet R., Boiron P.: Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: Phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001, **39**, 9–33.
31. Salkin I.F., Pruitt W.R., Padhye A.A., Sulivan D., Coleman D., Pincus D.H.: Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 1467.
32. Wadlin J.K., Hanko G., Stewart R., Pape J., Nachamkin I.: Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 1967–1970.
33. Tortorano A.M., Barchiesi F., Manso E., Montagna M.T., Farina C., Ferrari L., Raballo A., Grancini A., Lombardi G.: Is a kit for identification of clinical yeasts correctly evaluated when released onto the market? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 2000, **19**, 567–569.
34. Liguori G., Di Onofrio V., Lucariello A., Gallé F., Signoriello G., Colella G., D'Amora M., Rossano F.: Oral candidiasis: A comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009, **24**, 76–78.
35. Buchaille L., Freydiere A.M., Guinet R., Gille Y.: Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 1998, **17**, 479–488.
36. Ramani R., Gromadzki S., Pincus D.H., Salkin I.F., Chaturvedi V.: Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3396–3398.
37. Pincus D.H., Orenga S., Chatellier S.: Yeast identification – Past, present, and future methods. *Med Mycol.* 2007, **45**, 97–121.
38. Seyfarth F., Wiegand C., Erhard M., Gräser Y., Elsner P., Hipler U.C.: Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses.* 2012, **55**, 276–280.
39. Cárdenes-Perera C.D., Torres-Lana Á., Alonso-Vargas R., Moragues-Tosant M.D., Pontón-San Emeterio J., Quindós-Andrés G., Arévalo-Morales M.P.: Evaluation of API ID 32C® and VITEK-2® to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004, **50**, 219–221.
40. Pasligh J., Radecke C., Fleischhacker M., Ruhnke M.: Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2010, **43**, 147–154.
41. Pricker-Hidalgo H., Vandapel O., Duchesne M.A., Mazoyer M.A., Monget D., Lardy B., Lebeau B., Frenay J., Ambrose-Thomas P., Grillot R.: Comparison of the new API Candida system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 1846–1848.
42. Bernal S., Mazuelos E.M., Chávez M., Coronilla J., Valverde A.: Evaluation of the new API Candida system for identification of the most clinically important yeast species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, **32**, 217–221.
43. Campbell C.K., Davey K.G., Holmes A.D., Szekely A., Warnock D.W.: Comparison of the API Candida system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 821–823.
44. Pfaller M.A., Preston T., Bale M., Koontz F.P., Body B.A.: Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems for identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1988, **26**, 2054–2058.
45. Salkin I.F., Land G.A., Hurd N.J., Goldson P.R., McGinnis M.R.: Evaluation of yeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 1987, **25**, 624–627.
46. McGowan K.L., Mortensen J.E.: Identification of clinical yeast isolates by using the Microring YT. *J. Clin. Microbiol.* 1993, **31**, 185–187.
47. Horvath L.L., Hostenal D.R., Murray C.K., Dooley D.P.: Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 2629–2632.
48. Bauters T.G., Nelis H.J.: Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 1838–1839.
49. Willinger B., Hillowoth C., Selitsch B., Manafi M.: Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 3793–3795.
50. Schoofs A., Odds F.C., Colebunders R., Ieven M., Goossens H.: Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 1997, **16**, 296–300.
51. Kirkpatrick W.R., Revankar S.G., McAtee R.K., Lopez-Ribot J.L., Fothergill A.W., McCarthy D.I., Sanche S.E., Cantu R.A., Rinaldi M.G., Patterson T.F.: Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3007–3012.
52. Yücesoy M., Marol S.: Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2003, **2**, 8.
53. Powell H.L., Sand C.A., Rennie R.P.: Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, **32**, 201–204.
54. Hostenal D.R., Beckius M.L., Floyd K.L., Horvath L.L., Murray C.K.: Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2006, **5**, 1.
55. Patterson T.F., Revankar S.G., Kirkpatrick W.R., Dib O., Fothergill A.W., Redding S.W., Sutton D.A., Rinaldi M.G.: Simple method for detecting fluconazole-resistant yeasts with chromogenic agar. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 1794–1797.
56. Bauters T.G., Peleman R., Moerman M., Vermeersch H., De Looze D., Nopens L., Nelis H.J.: Membrane filtration test for rapid presumptive differentiation of four *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 1498–1502.
57. Letscher-Bru V., Meyer M.H., Galois A.C., Waller J., Candolfi E.: Prospective evaluation of the new chromogenic medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 2002, **40**, 1508–1510.
58. Sheppard D.C., DeSouza E., Hashmi Z., Robson H.G., René P.: Evaluation of the auxacolor system for biochemical identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3726–3727.
59. Romney M.G., Bryce E.A., Rennie R.P., Sand C.A.: Rapid identification of clinical yeast isolates using the colorimetric AUXACOLOR system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000, **36**, 137–138.
60. Verweij P.E., Breuker I.M., Rijs A.J.M.M., Meis J.F.G.M.: Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J. Clin. Pathol.* 1999, **52**, 271–273.
61. Cooper B.H., Johnson J.B., Thaxton E.S.: Clinical evaluation of the Uni-Yeast-Tek system for rapid presumptive identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 1978, **7**, 349–355.
62. 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**, 883–886.
63. Heelan J.S., Sotomayor E., Coon K., D'Arezzo J.B.: Comparison of the rapid yeast plus panel with the API20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 1443–1445.
64. Yeo S.F., Wong B.: Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002, **15**, 465–484.
65. Yücesoy M., Oztek A.O., Marol S.: Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2005, **11**, 245–247.

Dr hab. Sebastian Gnat prof. uczelni,
e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl