

# Üç Yüz *Candida albicans* Suşunun Amfoterisin B, Flusitozin, Flukonazol ve Mikonazole Duyarlıklarının Araştırılması

Nuri Kiraz<sup>1</sup>, Zayre Erturan<sup>2</sup>, Meltem Uzun<sup>2</sup>, Gül Durmaz<sup>1</sup>, Tercan Us<sup>1</sup>, Yurdanur Akgün<sup>1</sup>, Özdem Anğ<sup>2</sup>

**Özet:** İmmün sistemi baskılanan hastalarda oluşan mantar infeksiyonlarının en sık etkeni *Candida albicans*'tir. Bu etkene bağlı infeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde uygun antifungal ilaç seçimi son derece önemlidir. Kandidozların tedavisinde antifungal duyarlık testlerine başvurulması ise uygun antifungal ilaç seçimi yapılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla antifungal profilaksi uygulanmayan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşu çalışma kapsamına alındı. Her hastaya ait sadece bir *C. albicans* suşu kullanıldı. Antifungal duyarlığı araştırılan *C. albicans* suşlarının 97'si vagina sürüntüsü, 60'ı balgam, 42'si boğaz sürüntüsü, 24'ü deri (pişik), 20'si dışkı örneklerinden izole edildi. Bu suşların amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole duyarlıkları NCCLS tarafından önerilen buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı. *C. albicans* suşlarının amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole karşı  $MIC_{50}$  ve  $MIC_{90}$  değerleri, sırasıyla 0.5 ve 1 µg/ml, 0.25 ve 1 µg/ml, 1 ve 8 µg/ml ile 1 ve 4 µg/ml olarak bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** *Candida albicans*, antifungal duyarlık testleri.

**Summary:** Susceptibility of 300 *Candida albicans* strains to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and miconazole. *C. albicans* is the most frequently isolated fungus from immunosuppressed patients. To prevent and treat this infection, it is very important to choose the correct antifungal agent. Antifungal drug susceptibility testing is an obligation to choose the right drug to treat candidosis. For this purpose, 300 *C. albicans* strains isolated from patients not taking antifungal prophylaxis have been included in this study, and only one strain was taken from each patient. From these *C. albicans* strains, 97 were isolated from vagina, 60 from sputum, 57 from urine, 24 from skin, 20 from stool specimens and 42 from throat swabs. Susceptibility testing for amphotericin B, flucytosine, fluconazole and miconazole was performed by broth microdilution method according to the NCCLS guidelines.  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  values to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and miconazole were found as follows: 0.5-1 µg/ml, 0.25-1 µg/ml and 1-4 µg/ml, respectively.

**Key Words:** *Candida albicans*, antifungal susceptibility testing.

## Giriş

Son yıllarda tanı ve tedavi alanındaki gelişmelere paralel olarak mantar infeksiyonlarının insidansında artışlar gözlenmektedir. İmmün sistemi baskılanan hastalarda konak savunmasında oluşan önemli değişiklikler, infeksiyonlara duyarlılığı artırırken, hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik invazif tıbbi girişimler nozokomiyal infeksiyonların gelişmesini kolaylaştırmaktadır (1). İnsanlarda görülen fırsatçı mantar infeksiyonlarına neden olan mantar türlerinin çeşitliliğinde artış olmasına karşın hâlâ en sık etken *Candida albicans*'tir (2). Bu maya türü diğer bazı *Candida* türlerine göre antifungallere daha duyarlıdır. Ancak son yıllarda bu maya türüne karşı da direnç geliştirebildiği bildirilmektedir (3-6).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 300 *C. albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, fluko-

nazol ve mikonazole duyarlıkları in vitro olarak NCCLS'in önerdiği mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır.

## Yöntemler

Çalışmamızda antifungal profilaksi uygulanmayan hastaların klinik örneklerinden izole edilen ve her hastaya ait sadece bir *C. albicans* suşu çalışma kapsamına alındı. Antifungal duyarlığı araştırılan *C. albicans* suşlarının 97'si vagina sürüntüsü, 60'ı balgam, 57'si idrar, 42'si boğaz sürüntüsü, 24'ü deri (pişik) sürüntüsü, 20'si dışkı örneklerinden izole edildi. *C. albicans* suşlarının tanımlanması koloni morfolojisi, germ tübü oluşumu, mısır unlu Tween 80 agar'da klamidospore oluşumu ve karbonhidratlara etkisine göre (Mycotube, BBL) yapıldı.

Çalışmamızda kullanılan amfoterisin B, flusitozin ve mikonazol Sigma firmasından, flukonazol Pfizer firmasından temin edildi. Bu maddelerin hepsi dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürüldü ve antifungal mad-

- (1) Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir
- (2) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

**Tablo 1. 300 *Candida albicans* Suşunun Amfoterisin B, Flusitozin, Flukonazol ve Mikonazole In Vitro Duyarlıkları (µg/ml)**

Antifungal Madde	MİK Aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Amfoterisin B	0.03-4	0.5	1
Flusitozin	0.06-2	0.25	1
Flukonazol	0.06-8	1	4
Mikonazol	0.03-16	1	8

delerin stok solüsyonları hazırlandı (en yüksek dilüsyon x 10).

Antifungal duyarlık deneyinde 0.165 M 3-(N-morfolino)-propan-sulfonik asid (MOPS) (Sigma) ile tamponlanmış, pH'si 7, L-glutaminli, bikarbonatsız RPMI 1640 (Sigma) besiyeri kullanıldı ve antifungal maddelerin stok solüsyonları da bu besiyerinde hazırlandı.

**Duyarlık Deneyinin Uygulanışı (7-9):** Sabouraud dekstroz agarda üretilen ve en az 1 mm çapında olan *C. albicans* kolonilerinden beş tane seçildi. Bu koloniler, içinde serum fizyolojik bulunan tüplere aktarıldı ve 15 saniye vorteksle karıştırıldı. Süspansiyonun hazırlanmasında NCCLS'in önerdiği spektrofotometrik yöntem kullanıldı ve bu süspansiyon RPMI 1640 besiyeri kullanılarak önce 1/50, daha sonra 1/20 oranında dilüe edildi. Dibi yuvarlak, steril, 96 çukurlu mikropiplar kullanılarak iki kat azalan dilüsyonlar şeklinde antifungal maddelerin en yüksek dilüsyonundan başlayarak 100'er mikrolitre olarak ilk 11 çukura inokülasyon yapıldı. 12. çukura ise antifungal madde içermeyen besiyerinden 100 mikrolitre konuldu. Çalışmamızda amfoterisin B için 4-0.03, mikonazol için 16-0.03, flusitozin için 2-0.06 ve flukonazol için de 8-0.06 µg/ml arasında iki kat azalan dilüsyonlar kullanıldı. Tüm çukurlara 100'er µl maya süspansiyonu konuldu. Üzerlerine steril cam kapatılarak 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Amfoterisin B ve flusitozin için bulaşıklığın görülmediği en son çukur; flukonazol ve mikonazol için ise üremenin %80 azaldığı çukur, MİK değeri olarak belirlendi.

### Sonuçlar

Klinik örneklerden izole edilen 300 *C. albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole in vitro duyarlıkları Tablo 1'de gösterilmiştir.

300 *C. albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole duyarlıklarının çalışılan dilüsyonlara dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. 300 *Candida albicans* Suşunun Amfoterisin B, Flusitozin, Flukonazol ve Mikonazole Duyarlıklarının Çalışılan Dilüsyonlara (µg/ml) Dağılımı**

Antifungal Madde	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
Flukonazol	*	6	25	81	52	41	34	31	30	*
Mikonazol	5	21	30	57	56	37	30	29	20	15
Amfoterisin B	*	*	8	11	66	74	49	37	33	22
Flusitozin	*	*	*	6	59	82	70	63	20	*

\*Çalışılmadı

### İrdeleme

Son zamanlarda ciddi mantar infeksiyonlarının görülme sıklığında önemli artışlar olduğu bilinmektedir. Mantar infeksiyonlarının tedavisinde tek seçeneğin amfoterisin B olduğu zamanlarda duyarlık testleri düşünülmemiş, ancak yeni azol grubu ilaçların kullanıma girmesi ile antifungal duyarlık testleri de gündeme gelmiştir (10). 1992'de NCCLS (7) tarafından *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için standard yöntem tanımlanmıştır. Antifungal duyarlık deneylerinin standardizasyonunda

önemli sorunlar olduğu, mantar hücresinin stabil olmaması başta olmak üzere deneyi etkileyen birçok etken bulunduğu belirtilmiştir. Pratik ve güvenilir antifungal duyarlık deneyleri geliştirmeye yönelik araştırmalar sürdürülmekte ve sonuçları NCCLS'in önerdiği yöntemle kıyaslanmaktadır (9,11-14).

*Candida* türlerinin antifungal duyarlıklarının belirlenmesinde NCCLS tarafından önerilen makrodilüsyon yöntemiyle uyumu gösterilen mikrodilüsyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (11,12). Duyarlık deneylerinden elde edilen in vitro sonuçlarla in vivo sonuçlar arasında kesin bir korelasyon olmasa bile in vitro sonuçlar birbirleriyle kıyaslanabilecek standarttır. Sistemik ilaçlardan amfoterisin B ve büyük ölçüde flusitozin ile alınan sonuçların yorumlanması daha objektif olarak yapılabilmektedir. Flukonazolün de içinde yer aldığı azol grubu ilaçların MİK değerlerinin belirlenmesinde güçlüklerle karşılaşmakta ve subjektif değerlendirmeler olabilmektedir. Ancak amfoterisin B ve flusitozin için üremenin inhibe olduğu en son konsantrasyonun, azol grubu için ise üremenin %80 inhibe edildiği konsantrasyonun MİK değeri olarak belirlenmesi, olası hataları en aza indirmektedir (10). Çalışmamızda daha objektif sonuçlar vermesi bakımından spektrofotometrik ölçümler kullanılmıştır.

Gün ve arkadaşları (15) *C. albicans* suşlarının etki aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini amfoterisin B, flukonazol ve mikonazol için sırasıyla 0.062-0.125, 0.125, 0.125; 0.125-1, 0.5, 1; 0.3-2.5, 0.3, 1.25 µg/ml olarak bulmuşlardır. Molbay ve arkadaşları (16) flukonazol için etki aralığını 0.125-8, MİK<sub>50</sub> değerini 0.25 ve MİK<sub>90</sub> değerini 0.5 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Willke ve arkadaşları (17) *C. albicans* suşlarına amfoterisin B ve flukonazolün etki aralığını sırasıyla <0.06-2 ve <0.06-4 µg/ml olarak bulmuşlardır. Gülay ve Yuluğ (18), *C. albicans* suşlarına flukonazolün etki aralığını <0.06-64, MİK<sub>50</sub> değerini 0.25 µg/ml olarak saptamışlardır. Price ve arkadaşları (19), 1987 ve 1992 yılları arasında kan kültürlerinden izole ettikleri *C. albicans* suşlarına flukonazolün etki aralığını 0.125-1, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerini sırasıyla 0.125 ve 0.25 µg/ml olarak bildirmişlerdir. NCCLS (8), flukonazol ve flusitozin için duyarlık sınırlarını sırasıyla <8 ve <4 µg/ml olarak bildir-

miş; ancak amfoterisin B ve mikonazol için herhangi bir sınır vermemiştir. Bahsedilen antifungaller için dirençlilik sınırları sırasıyla >64 ve >32 µg/ml olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda bulduğumuz etki aralığı, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Bulgularımız, literatür ile karşılaştırıldığında, bazı araştırmalarla uyumlu, bazı araştırmalarla da uyumsuz sonuçlar elde edilmesine karşın NCCLS kriterlerine göre, flukonazol ve flusitozine direnç gözlenmemiştir.

Antifungal duyarlık testlerinin *Candida* türleri ve *C. neoformans* için standardize edilmiş olması ve uygulanabilirliği daha kolay olan mikrodilüsyon yönteminin sonuçlarının makrodilüsyon yöntemininkilerle korele olduğunun bildirilmesi son derece sevindiricidir. *Candida* türleri için uygulanan ve NCCLS tarafından önerilen in vitro testler birbiriyle kıyaslanabilecek standarddır. In vitro sonuçlar ile in vivo sonuçların da korele olduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte (20), bu konu henüz netlik kazanmamıştır.

Sonuç olarak, in vitro antifungal duyarlık deneyi sonuçları, ancak klinik yanıtla paralellik gösterdiğinde, bu sonucun güvenilir ve klinisyene yardım edecek nitelikte olabileceği kanısındayız.

#### Kaynaklar

1. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 1992; 14(Suppl 1): 43-53
2. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-25
3. Boken DJ, Swindells S, Rinaldi MG. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 1018-21
4. Goff DA, Koletar SL, Bueshing WJ, Barnishen J, Fass RJ. Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-negative patients never treated with azoles. *Clin Infect Dis* 1995; 20:77-83
5. Rex CH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1-8
6. White a, Goetz M B. Azole-resistance *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 687-92
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Proposed Standard. M27-P. Villanova, Pa: NCCLS, 1992
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard. NCCLS Document M27-A. Villanova, Pa: NCCLS, 1996
9. Espinel-Ingroff A, Kish C W, Kerkering T M, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3138-45
10. Rex CH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani J. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-81
11. Barchiesi F, Colombo AL, Mc Gough DA, Rinaldi MG. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2494-500
12. To WK, Fothergill AW, Rinaldi MG. Comparative evaluation of macrodilution and alamar calorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2660-4
13. Espinel-Ingroff A, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Laboratory Clinical Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3154-8
14. Pfaller MA, Grant C, Morthand V, Rhine-Chalberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 506-9
15. Gün H, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baysallar M. Klinik örneklerden patojen etken olarak izole edilen *Candida* suşlarının sistemik etkili antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Gaziantepe Üniv Tıp Fak Derg* 1993; 4: 181-92
16. Molbay D, Ener B, Gülen D, Korten V, Özek E, Bozok-Johannson C. *Candida* kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazole karşı in vitro duyarlılıklarının makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 1997; 11: 149-52
17. Willke A, Çerikoğlu N, İnci R, Arslan H, Demirkazık A. Kanserli hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1993; 23:119-22
18. Gülay Z, Yuluğ M. Antikandidal duyarlık testlerinde yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül* 1995; 29: 179-88
19. Price MF, Larocco MT, Gentry LO. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1422-42
20. Quereda C, Polanco M A, Giner C, Sanchez-Sousa A, Perire E, Navas E, Fortun J, Guerrero A, Baquero F. Correlation between in vitro resistance of fluconazole and clinical outcome of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 30-7