

Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole İn Vitro Duyarlılıkları

Distribution of Candida Species Isolated From Blood Cultures and in-Vitro Susceptibilities to Amphotericin B and Fluconazole

Mustafa Altay Atalay, Hafize Sav, Gonca Demir, A. Nedret Koç

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D., Kayseri

Özet

Fungal kan dolaşımı enfeksiyonları, immün yetmezlikli hastalarda mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden birisidir. İnvazif kandidiyazise neden olan türler arasında Candida albicans halen en sık görülen patojen olmakla beraber diğer Candida türlerinin de oranı artmaktadır. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen Candida türlerinin tanımlanması ve bunların amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıklarının araştırılması amaçlandı. Temmuz 2009–2011 tarihleri arasında 97 hastanın kan kültüründen izole edilen Candida türleri çalışmaya alındı. İzolatların tanımlanmasında, germ tüp testi, mısır unu-Tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünüşleri ve API 20C AUX (Biomerieux, Fransa) sistemi kullanıldı. C. albicans en çok (% 68) izole edilen tür olup bunu C. parapsilosis (% 14.5) ve C. glabrata (% 9.3) izledi. Amfoterisin B, flukonazol duyarlılıkları ve Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle yapıldı. İzole edilen tüm Candida suşları amfoterisin B'ye duyarlı bulundu. Flukonazole dirençli bir ve doza bağlı duyarlı altı C. glabrata suşu dışındaki hiçbir Candida suşunda flukonazole direnç saptanmadı.

Anahtar kelimeler: amfoterisin B, E-test, flukonazol, kandidemi

Abstract

Fungal bloodstream infections are a leading cause of morbidity and mortality in the immunosuppressed patients. While Candida albicans remains the predominant pathogen, the proportion of invasive candidiasis caused by other species of Candida continues to increase. In this study the identification of the Candida species isolated from blood cultures and investigation of their susceptibilities against amphotericin B and fluconazole was aimed. Candida strains isolated from 97 patients blood cultures within the time period of July 2009-2011 were included in the study. Identification of the strains, germ tube test, morphological appearance of corn meal-Tween 80 agar medium and API 20C AUX (Biomerieux, France) were used. The most common Candida form was C. albicans (68 %) followed by C. parapsilosis (14.5 %) and C. glabrata (9.3 %). Amphotericin B, fluconazole susceptibilities and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) values were measured with E-test method. All Candida strains were susceptible to amphotericin B. Except the fluconazole resistant one and dose-dependent susceptible six C.glabrata isolates, non of Candida isolates were resistant to fluconazole.

Key words: amphotericin B, candidemia, E-test, fluconazole

GİRİŞ

Son yıllarda immunsupresif tedavi alan hasta sayısının artması, büyük cerrahi girişimlerin ve geniş spektrumlu ve birden fazla antibiyotik kullanımının artması, hiperalimentasyon, yoğun bakım ünitelerinde genel durumu bozuk hastaların daha fazla izlenmesi ve yapay protezlerin kullanımının yaygınlaşmasına bağlı olarak, ciddi fungal enfeksiyonların, özellikle invazif Candida enfeksiyonlarının insidansında da artış gözlenmektedir (1,2). Kandidemiler invazif kandida enfeksiyonlarının %50-70'ini oluşturur. Amerika'da hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8-10'una sebep olan Candida türleri, koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS), Staphylococcus aureus ve enterokoklardan sonra dördüncü sırayı almakta ve önemli oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (3). Kandidemilerde en sık etken Candida albicans olmakla birlikte albicans-dışı türlerin görülme sıklığı da giderek artmaktadır (4). Vorikonazol, posakonazol ve ekinokandinler gibi yakın zamanda kullanıma girmiş ya da isavukonazol gibi araştırma aşamasında

olan antifungal ajanlar tedavi seçeneğini genişletse de, amfoterisin B ve flukonazol fungemilerin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır(5). Bu çalışmada yaklaşık 2 yıllık süre zarfında kan kültüründen izole edilen kandidaların ve bunların amfoterisin B ve flukonazol duyarlılıklarının E test yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Temmuz 2009–2011 tarihleri arasında hastanemizin çeşitli birimlerinden Merkez Laboratuvarına gönderilen kan kültürleri BacT/Alert 3D otomasyon sistemi (Biomerieux, Fransa)'nde inkübe edilmiştir. Kan kültürü şişelerinden üreme sinyali verenlerden preparat hazırlanmış, Gram boyama ile maya hücreleri tespit edilenler CHROMagar Candida (BBL Fransa) ve Sabouraud dektroz agar (Oxoid, İngiltere)'a pasajlanmıştır. İzolatların tanımlanmasında, germ tüp testi, mısır unu-Tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünüşleri ve gerektiğinde API 20C AUX (Biomerieux, Fransa) sistemi kullanılmıştır. CHROMagar

Candida besiyerinde parlak yeşil kolonileri olan, mısır unu-Tween 80 agarda klamidospore oluşturan ve germ tüp pozitif olup 45°C'de üreyebilen izolatların tamamı *C. albicans* olarak kabul edilmiş ve API 20C AUX (Biomerieux, Fransa) kiti ile tanımlamaya gereksinim duyulmamıştır. İzole edilen Candida suşlarının Amfoterisin B ve flukonazole karşı duyarlılıkları ise E test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntemde %2 glikoz ve %1.5 agar içeren RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyeri kullanılmış ve sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Buna göre, her Candida izolatının % 085 sodyum klorürde 0.5 McFarland standardı bulanıklığına göre süspansiyonları hazırlanmış ve eküvyon ile agar yüzeylerine inokule edilmiştir. Agar plakların yüzeyleri kuruduktan sonra, amfoterisin B (0.002-32 µg/ml) ve flukonazol (0.016-256 µg/ml) içeren E-test şeritleri yerleştirilmiştir. Daha sonra plaklar 37°C'de 24 saat, eğer yetersiz üreme varsa 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) (µg/ml) değerleri belirlenmiştir(6). Flukonazol için MİK değeri ≤8 µg/ml ise duyarlı, 16-32 µg/ml ise doza bağlı duyarlı ve ≥64 µg/ml ise dirençli kabul edildi. Amfoterisin B için MİK değeri ≤1 µg/ml olan suşlar duyarlı kabul edildi. Kontrol kökenleri olarak *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. parapsilosis* ATCC 90018 kullanılmıştır.

BULGULAR

Toplam 97 suşun 66'sı (%68) *C. albicans*, 14'ü (%14.5) *C. parapsilosis*, 9'u *C. glabrata* (%9.3), 4'ü (%4.1) *C. krusei*, 3'ü (%3.1) *C. tropicalis* ve biride (%1) *C. pelliculosa* olarak tanımlanmıştır. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. pelliculosa* için amfoterisin B - flukonazol MİK aralıkları ve MIC50 / MIC90 değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Tüm suşlar amfoterisin B'ye duyarlı bulunurken, flukonazole duyarlılıkları incelendiğinde altı (%66.7) doza bağlı duyarlı, bir (%11.1) tane de dirençli *C. glabrata* suşu dışında tüm suşların duyarlı olduğu saptanmıştır. *C. krusei* suşları ise flukonazole doğal dirençli kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Risk altındaki bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonu giderek arttığı için, hastane kaynaklı kan dolaşımı etkenleri arasında üst sıralarda yer alan Candida türleri her geçen gün önem kazanmaktadır (7). Kan ile yayılan ve hastane infeksiyonuna neden olan mikroorganizmalar içinde Candida'ların dördüncü sıraya yerleştiği belirtilmektedir ve kandideminin hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzattığı ve mortalite oranının ise %40-60 arasında olduğu bildirilmektedir (8). Candida cinsi içinde çok sayıda tür olmakla birlikte hastaların çoğunda etken olarak beş tür (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*) izole edilmektedir. *C. albicans*

tüm bölgelerde en fazla izole edilen tür olmakla beraber görülme sıklığı bölgelere göre değişmektedir (9,10). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Kanada'da *C. glabrata* *C. albicans*'dan sonra kandidemi etkeni olarak izole edilen tür iken, Kuzey Amerika hariç diğer bölgelerde *C. parapsilosis*, *C. albicans*'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır (9,11). Ülkemizden bildirilmiş kandidemi olgularında, çeşitli merkezlerden farklı oranlar (%37-65) verilmekle beraber *C. albicans* birinci sırada yer almaktadır. *C. parapsilosis* ise farklı oranlar (%12-32) verilmekle beraber ikinci sırada yer almaktadır (12-17). Hilmioğlu ve ark. (18) ise, yaptıkları çalışmada birinci sırada kandidemi etkeni olarak *C. tropicalis* (%36.7)'i bulurken *C. albicans*'ı ikinci sırada (%31.8) bulmuşlardır. Koç ve ark. (19) hastanemizde 1999 yılında yaptıkları çalışmada kandidemi etkeni olarak birinci sırada *C. albicans* (%51.4)'i, ikinci sırada *C. glabrata* (%23.6)'ı bulmuşlardır. Çalışmamızda, kandidemi etkeni olarak birinci sırada *C. albicans* (%68) ikinci sırada *C. parapsilosis* (%14.5) bulundu. Diğer merkezlerle kıyasladığımızda *C. albicans* oranımız daha yüksek, *C. parapsilosis* oranımız ise düşük olmakla birlikte ülkemizden bildirilen oranlar çerçevesinde bulunmuştur. Hastanemizde daha önce yapılan çalışmada %23.6 oranı ile ikinci sırada bulunan *C. glabrata*, bu çalışmada %9.3 oranı ile üçüncü en sık izole edilen Candida türü olmuş ikinci sırada %14.5 oranını ile *C. parapsilosis* bulunmuştur.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 dokümanında antifungal duyarlılık testlerinde standart sıvı dilüsyon yöntemi (Broth Microdilution) önerilmektedir. Ancak bu yöntemin emek-yoğun ve zaman alıcı olması nedeniyle pratik kantitatif antifungal duyarlılık yöntemleri cazip hale gelmektedir (20). Candida türlerinin duyarlılıklarının saptanmasında E test yönteminin güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmektedir (21). Özcan ve ark. (20) E test yöntemi ile elde ettikleri MİK değerlerini, standart buyyon dilüsyon yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında, amfoterisin B için %84.7; flukonazol için %80.4 uyum olduğunu bildirmişlerdir. *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* amfoterisin B, flusitozin, azol grubu ve ekinokandinlere oldukça duyarlı türlerdir. *C. glabrata* flukonazol ve amfoterisin B'ye diğer türlerden daha az duyarlı olup, en fazla sorun oluşturan türdür (9,10). Çalışmamızda, tüm suşlar amfoterisin B'ye duyarlı bulunurken *C. glabrata* dışındaki tüm suşlarda flukonazole duyarlı bulunmuştur. Toprak ve ark. (15) kan kültüründen izole ettikleri Candida suşlarının tümünü, makrodilüsyon yöntemi ile amfoterisin B'ye duyarlı bulmuşlar, flukonazole doğal dirençli kabul edilen *C. krusei* dışındaki tüm Candida suşlarını da flukonazole duyarlı bulmuşlardır. Ancak bu çalışmada izole edilen türler arasında *C. glabrata* bulunmamaktadır. Karakoç ve ark. (1) mikrodilüsyon yöntemiyle flukonazol için doza bağımlı duyarlı 8 Candida suşu (3 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 2 *C. glabrata*), dirençli 1 *C. albicans* suşu tespit etmişlerdir. Altuncu ve ark. (22) neonatal kandida infeksiyonlarını ve makrodilüsyon yöntemi ile antifungal duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında,

Tablo 1. İzole edilen Candida türleri ve Amfoterisin B ve Flukonazol MİK aralıkları

Antifungaller Candida türleri (n)	Amfoterisin B (µg/ml)			Flukonazol(µg/ml)		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı
<i>C. albicans</i> (66)	0.064	0.125	0.002-0.5	0.32	1	0.064-8
<i>C. parapsilosis</i> (14)	0.125	0,5	0.016-1	0.5	1	0.125-2
<i>C. glabrata</i> (9)	0.125	0.25	0.064-0.5	16	32	4-64
<i>C. krusei</i> (4)			0,125-1			*
<i>C. tropicalis</i> (3)			0,012-0,25			0.5-2
<i>C. pelliculosa</i> (1)			0,25			4

* : *C. krusei* flukonazole doğal dirençli olduğundan MİK değeri belirtilmemiştir

amfoterisin B'ye dirençli suş saptamazlarken, flukonazol direnç oranını %5.5 olarak bulmuşlar ve dirençli türler göre dağılımını, *C. albicans* için %2.8, albicans-dışı suşlar için ise % 11 olarak bildirmişlerdir. Kuzucu ve ark. (23) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tüm *Candida* izolatlarında amfoterisin B MİK değerlerini oldukça düşük, flukonazol duyarlılığını ise %96 oranında bulmuşlardır. Pfaller ve ark. (24) 12 yıllık çalışmalarında kandan izole edilen 6082 *Candida* türünde flukonazol duyarlılığını %90, doza bağlı duyarlılığı %7 olarak bulmuşlardır. Madhavan ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *Candida* türlerinde, E test yöntemiyle flukonazole duyarlılık, doza bağlı duyarlılık ve direnç oranlarını sırasıyla %71, %7 ve %22 oranında bulmuşlardır (25). Çalışmamızda da amfoterisin B için MİK değerleri düşük bulundu. Tüm izolatlar için flukonazol duyarlılığı da %92.8, doza bağlı duyarlılık %6.2 idi. Asya/Pasifik bölgelerinde *C. glabrata* için flukonazole duyarlılığını (izolatların %80.5'i flukonazole duyarlı, %3.9'u dirençli) en yüksek, Kuzey Amerika (izolatların %64'ü flukonazole duyarlı, %10.3'ü dirençli) ve Latin Amerika'da (izolatların %62.1'i flukonazole duyarlı, %3.4'ü dirençli) ise en düşük olduğu bildirilmektedir (26). Çalışmamızda izole edilen dokuz *C. glabrata* suşunun ikisi flukonazole duyarlı, altısı doza bağlı duyarlı ve biri de dirençli bulunmuştur.

Hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinden *C. albicans* ilk sırayı almakla beraber, *C. parapsilosis* ikinci en sık izole edilen tür olmuştur. Sonuç olarak, *Candida* enfeksiyonları için risk teşkil eden hasta popülasyonunun artmasına paralel olarak, türlerin tanımlanması için epidemiyolojik çalışmaların ve yeni antifungal ajanları da içeren antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH. Çeşitli *Candida* türlerinin iki farklı triazole duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. *Eurasian J Med* 2007; 39: 173-7.
- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal Disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52: 197-205.
- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485-506.
- Terlecka JA, du Cros PA, Orla Morrissey C, Spelman D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. *Mycoses* 2007; 50: 48-51.
- Guinea J, Recio S, Escribano P, et al. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of E test performed directly on blood samples from patients with fungemia. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2205-12.
- Koc AN, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M. Comparison of E test with microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000; 43: 293-7.
- Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 478-88.
- Kuştimur S. Hastane enfeksiyonlarına neden olan mantarların dünyada ve Türkiye'de dağılımı. In: III. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı; 27-30 Mayıs 2003; Bodrum, Muğla. Türk Mikrobiyoloji Derneği; 2003: 47-58.
- Ener B. *Candida* enfeksiyonları Türkiye'de mantar epidemiyolojisi: İzolatların klinik önemi. In: I. Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı; 12-16 Kasım 2011; Antalya. KLİMUD Derneği; 2011: 104-8.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5848-59.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 3-14.
- Bakır M, Çerikçioğlu N, Barton R, Yağcı A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *APMIS* 2006; 114: 601-10.
- Saraçlı MA, Gönülüm A, Yıldırım ŞT, Doğançlı L. Altı yıllık bir dönemde fungemi olgularından izole edilen fungus türleri. In: II. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar Kitabı; 19-21 Haziran 2001; Ankara. Türk Mikrobiyoloji Derneği; 2001:185.
- Tekeli A, Dolapçı I, Bengisu S, Aysev D, Güriz H. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri içerisinde *Candida dubliniensis* varlığının araştırılması. *Flora* 2011; 6: 254-9.
- Toprak NÜ, Erdoğan S, Çelik C, Johansson C. Kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* suşlarının Amfoterisin B ve Flukonazole in vitro duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 252-6.
- Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, Yuca A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish Hospital. *Mycoses* 2006; 49: 134-8.
- Yucesoy M, Yuluğ N. Kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* türlerinin antifungal ajanlara in vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2000; 14: 71-8.
- Hilmioglu S, İnci R, Hoşgör M, Burhanoglu D, Tümbay E, Tünger A. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde beş yıllık dönemde fungemi epizotları: Non-*albicans* *Candida* türlerinde artış. In: II. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar Kitabı; 19-21 Haziran 2001; Ankara. Türk Mikrobiyoloji Derneği; 2001: 184.
- Koç AN, Erdem F, Çetin N. Kan kültürlerinde üreyen mayaların retrospektif olarak değerlendirilmesi ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1999; 29: 177-82.
- Özcan SK, Mutlu B, Dündar D, Wilke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile E-test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 263-71.
- Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 767-71.
- Altuncu E, Bilgen H, Çerikçioğlu N ve ark. Neonatal kandida enfeksiyonları ve etkenlerinin antifungal duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul*. 2010; 44: 593-603.
- Kuzucu Ç, Yetkin G, Çalışkan A. Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Erciyes Med J* 2007; 29: 115-9.
- Pfaller MA, Diekema DJ, the International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 11-23.
- Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida* spp. by E-test method. *Trop Biomed* 2010; 27: 200-7.
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3142-6.