

Candida albicans türü maya mantarlarında antifungal ilaç direnci

Duygu FINDIK*, İnci TUNCER*, Onur URAL**, Uğur ARSLAN*

* S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

** S.Ü.T.F. İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Bu çalışmada hastanede yatmakta olan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen, 63 *Candida albicans* türü maya mantarının amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazole karşı antifungal duyarlılıkları Epsilometer test (E test: AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemi ile araştırıldı. Çalışılan suşların büyük bir çoğunluğu idrar örneklerinden izole edildi (%76.1). Yirmidört saatlik inkübasyondan sonra okunan MİK aralıkları (mg/l) amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazol için sırası ile $\leq 0.002-0.38$, $0.004-\geq 32$, $0.25-\geq 256$, $0.008-\geq 32$ olarak saptandı. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (mg/l) ise amfoterisin B için 0.032, 0.125, ketokonazol için 0.38, 4, flukonazol için 2, 64 ve itrakonazol için 0.094, 3 olarak bulundu. Amfoterisin B'ye karşı tüm suşlarda duyarlılık görülürken, flukonazole %19.2, itrakonazole %17.8 oranında direnç gözlemlendi. Ketokonazol testlerinde ise 5 suşun (%11.1) MİK değeri ≥ 32 mg/l olarak saptandı. Sonuç olarak antifungallere karşı direnç geliştiği gözlenmektedir, bu durum antifungal duyarlılık testlerinin önemini arttırmaktadır.

AnahtarKelimeler: *Candida albicans*, antifungal direnç, amfoterisin B

SUMMARY

Antifungal drug resistance in candida albicans

In this study the antifungal susceptibility patterns of 63 clinical isolates of *Candida albicans* isolated from from hospitalized patients were studied against amphotericin B, ketoconazole fluconazole and itraconazole using the Epsilometer test (E-test). Most of the isolates were isolated from urine samples (76.1%). The MIC ranges determined at 24 h incubation for amphotericin B, ketoconazole fluconazole and itraconazole were: $\leq 0.002-0.38$, $0.004-\geq 32$, $0.25-\geq 256$, $0.008-\geq 32$ respectively. The MIC₅₀ and MIC₉₀ (mg/l) for each antifungal were; amphotericin B 0.032, 0.125, ketoconazole 0.38, 4, fluconazole 2, 64 and itraconazole 0.094, 3. All strains were susceptible to amphotericin B, the resistance rates were 19.2% for fluconazole and 17.8% for itraconazole. Five isolates showed ≥ 32 mg/l MIC values for ketoconazole. The results indicate that there is resistance against antifungal agents and this increases the importance of antifungal susceptibility tests.

Key Words: *Candida albicans*, antifungal resistance, amphotericin B

Son 15 yılda kazanılmış immün yetmezlik sendromunun (AIDS) yaygınlaşması ve bazı hastalıklarda immüniteyi baskılayan ilaçların kullanılması nedeniyle fungal infeksiyonların insidansı artmıştır. Gelişen tedavi protokolleri sonucu bu hastaların ömürleri uzamış, ancak hayatı tehdit eden fırsatçı

mantar infeksiyonlarına daha duyarlı hale gelmişlerdir. Kandidalar tarafından oluşturulan hastalıkların spektrumu çok geniştir. Bulgular basit bir mukozal kolonizasyondan birçok organın tutulumuna kadar uzanır. İnvaziv mantarların tedavisinde kullanılan ilaçlar artarken, direnç problemi de gündeme

Haberleşme Adresi: Doç.Dr. Duygu FINDIK, S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

Geliş Tarihi : 27.04.2001

Yayına Kabul Tarihi : 24.05.2001

gelmiştir. Amfoterisin B'nin tek antifungal ilaç olduğu dönemlerde laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmamıştır, ancak şimdi çok sayıda antifungal içinden en iyi ilacı seçmekte hekimler zorlanmaktadır. Antifungal tedavi için uygun ilaç seçiminde dikkatler antifungal duyarlılık testleri üzerine yoğunlaşmıştır. Kandida ve kriptokok infeksiyonlarında duyarlılık testleri ile ilgili standart metodlar yaklaşık 15 yıllık bir çalışma sonucunda belirlenebilmiştir. Bu çalışmalar National Control Committee for Laboratory Standards (NCCLS) tarafından finanse edilmiştir (1-3).

E testi difüzyon yöntemine dayalı bir test olup pahalı olmasına karşın, disk difüzyon yöntemi gibi kolayca uygulanabilmesi, ek malzeme gerektirmemesi yanında minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin saptanabilmesi nedeniyle son yıllarda önem kazanmıştır (4,5).

Biz de bu çalışmamızda *Candida albicans* türü maya mantarlarının amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazole karşı antifungal duyarlılıklarını E test yöntemi ile araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi yoğun bakım üniteleri ve çeşitli kliniklerde yatmakta olan hastalara ait örneklerden izole edilen *Candida albicans* (*C.albicans*) suşlarının amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazole karşı duyarlılıkları araştırıldı. Mantar kültür istemi ile yollanan örnekler Sabouraud dextrose agar (OXOID) ve Mycobiotic agara (OXOID) ekildi. Ekimler 35 ve 25 derecelik etüvlerde inkübe edildi. Üreyen örneklerden basit boyama ile maya olduğu tesbit edilen mikroorganizmaların identifikasyonu API (API 20C AUX, Biomerioux) yöntemi ile yapıldı (6). *Candida albicans* olduğu saptanan suşlar çalışmaya alındı. Bu suşların amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazole duyarlılıkları E test (AB Bi-disk, Solna, Sweden) yöntemi ile üretici firmanın önerilerine göre araştırıldı. *Candida albicans* ATCC 90028 kontrol suşu olarak kullanıldı. Antifungal duyarlılık testlerinde duyarlı, doza bağlı duyarlı ve dirençli MİK sınırları flukonazol için ≤ 8 mg/l, 16-32mg/l, ≥ 64 mg/l olarak, itrakonazol için ≤ 0.125 mg/l, 0.25-0.5mg/l ve ≥ 1 mg/l olarak kabul edilmektedir. Bu değerler mukozal kandida infeksiyonları için geçerli olmasına rağmen başka veriler olmadığı için, çeşitli

literatürlerde, invaziv infeksiyonlardan izole edilen kandida infeksiyonlarında da kullanılmaktadır (7). Ketokonazol ve amfoterisin B için duyarlılık dirençlilik sınırları henüz belirlenmemiştir (3,7).

BULGULAR

C.albicans suşlarının izole edildikleri klinik örnekler Tablo 1'de verilmiştir.

Bu çalışmada MİK değerleri E test ile ölçülmüş ve tüm değerler duyarlılık testleri yapıldıktan 24 saat sonra okunmuştur.

Yapılan E test sonucunda amfoterisin B'de saptanan MİK değerleri oldukça düşüktü, saptanan en yüksek MİK değeri 0.38mg/l idi ve bu değere 5 suşta (%7.9) rastlandı. Amfoterisin B'de MİK₅₀ değeri 0.032mg/l, MİK₉₀ değeri 0.125mg/l olarak bulundu.

Ketokonazol için MİK aralığı 0.004- ≥ 32 mg/l olarak saptanmıştır. MİK₅₀ 0.38mg/l, MİK₉₀ 4mg/l olarak bulunurken suşların 7'sinin (%11.1) MİK değerleri 32mg/l ve üstünde bulunmuştur.

Flukonazol için MİK aralığı 0.25- ≥ 256 mg/l ve MİK₅₀ 2mg/l, MİK₉₀ 64mg/l olarak saptanmıştır. MİK duyarlılık/dirençlilik sınırlarına göre suşların %19.2'si flukonazole dirençli bulunmuştur.

İtrakonazol için MİK aralığı 0.008- ≥ 32 mg/l, MİK₅₀ 0.094mg/l ve MİK₉₀ 3mg/l olarak bulunmuş ve suşların %17.8'inin dirençli olduğu gözlenmiştir.

Tablo 1. *Candida albicans* suşlarının izole edildiği örnekler ve yüzdeleri.

Örnekler	Sayı	Yüzde
İdrar	48	76.1
Kan	7	11.1
Drenaj sıvısı	3	4.8
BOS*	2	3.2
Cerrahi yara	2	3.2
Periton sıvısı	1	1.6
Toplam	63	100

*BOS: Beyin omurilik sıvısı

Çalışılan antifungallerde saptanan MİK aralıkları, suşların %50'sinin ve %90'ının inhibe oldukları MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve dirençli suş yüzdeleri Tablo II'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Tedavi gerektiren invaziv mantar infeksiyonlarına rastlanma sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (5). Bu çalışmada hastanemizin yoğun bakım üniteleri ve diğer kliniklerinde yatmakta olan hastalara ait örneklerden izole edilen 63 C.albicans suşunun %76.1'i idrardan, %11.2'i kandan, %4.8'i drenaj sıvısından, %3.2'si beyin omurilik sıvısından %3.2'si cerrahi yara örneklerinden ve %1.6'sı periton sıvısından izole edilmiştir. Samet ve ark. (8) da yaptıkları çalışmada hastane kökenli Candida suşlarının büyük bir çoğunluğunu idrar örneklerinden (%41.8), %16'sını yara örneklerinden ve %6.8'ini kandan izole etmişlerdir. Araj ve ark.(9) ise 70 klinik örnekten izole ettikleri Candida suşlarının 16'sını idrardan, 15'ini balgamdan, 8'ini yara örneklerinden, 4'ünü kandan, 2'sini periton sıvısından izole etmişlerdir. Her iki çalışmada ve bizim çalışmamızda idrar, hastanede yatan hastalardan izole edilen Candida suşlarının en sık izole edildiği klinik örnek olarak görülmektedir.

Özalp ve ark.(10) hastane kaynaklı Candida izolatlarında E test ile flukonazol için MİK aralığını 0.12-256mg/l, amfoterisin B için 0.032-0.75mg/l olarak saptamışlardır. Araj ve ark.(9) Lübnan'da yaptıkları çalışmalarında E test ile 48 C.albicans suşunda MİK aralıklarını (mg/l) amfoterisin B, ketokonazol, flu-

konazol, itrakonazol için 24. saatteki okumalarında sırası ile $\leq 0.002-0.064$, $0.002-\geq 32$, $0.064-\geq 256$, $0.012-2$ olarak saptamışlar, dirençlilik yüzdelerini ise yine sırası ile %0, %4, %6, %4 olarak bildirmişlerdir. Testlerin uygulanmasından 48 saat sonra yaptıkları okumalarda ise MİK değerlerini ve dirençlilik oranlarını 24. saatteki okumadan yüksek bulmuşlardır: Örneğin flukonazol direncini %33, itrakonazol direncini %21, ketokonazol direncini %19 olarak saptamışlardır, amfoterisin B direncine 48. saatte de rastlanmamıştır. Linares ve ark.(11) E test ile yaptıkları duyarlılık testlerinde klinik izolatlardan elde ettikleri C.albicans suşlarının %20'sinin ketokonazole, %17'sinin itrakonazole ve %33'ünün flukonazole dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Wilke ve ark. (12) kanserli hastalarda izole ettikleri Candida izolatlarında amfoterisin B'de MİK50'yi 1mg/l, MİK90'ı 2mg/l ve MİK etki aralığını 0.06-4mg/l, flukonazolde MİK50'yi 1mg/l, MİK90'ı 4mg/l ve etki aralığını 0.006-8mg/l olarak saptamışlardır.

Bu çalışmada ise MİK aralıkları (mg/l) amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazol için sırası ile $\leq 0.002-0.38$, $0.004-\geq 32$, $0.25-\geq 256$, $0.008-\geq 32$ olarak saptanmıştır. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (mg/l) ise amfoterisin B için 0.032, 0.125, ketokonazol için 0.38, 4, flukonazol için 2, 64 ve itrakonazol için 0.094, 3 olarak bulunmuştur. Suşların %19.2'si flukonazole, %17.8'i itrakonazole direnç göstermiştir. Amfoterisin B'de en yüksek MİK değeri 0.38mg/l olarak saptanmış ve tüm suşlar duyarlı olarak

Tablo 2. Candida albicans suşlarında elde edilen MİK değerleri ve dirençli suş yüzdeleri.

MİK (mg/l)				
Antifungal (n*)	MİK aralığı(mg/l)	% 50	% 90	Dirençli suş(%)
Amfoterisin B(63)	$\leq 0.002-0.38$	0.032	0.125	0
Ketokonazol(63)	$0.004-\geq 32$	0.38	4	11.1
Flukonazol(52)	$0.25-\geq 256$	2	64	19.2
İtrakonazol(28)	$0.008-\geq 32$	0.094	3	17.8

*n :test edilen suş sayısı

değerlendirilmiştir. Ketokonazol testlerinde ise 5 suşun (%11.1) MİK değerinin ≥ 32 mg/l olduğu görülmüştür.

Farklı çalışmalarda yüzdeleri farklı olmakla birlikte antifungaller arasında en yüksek direncin flukonazole karşı geliştiği, bunu itrakonazol ve ketokonazolün izlediği görülmektedir (7,8,10,11).

KAYNAKLAR

1. Espinel-Ingroff A. History of Medical Mycology in the United States. Clin Microbiol Rev 1996;9:235-272.
2. Sugar AM, Lyman CA. A Practical Guide to Medically Important Fungi and the Diseases They Cause. 1st.ed., Lippincott-Raven USA; 1997:p.97-120.
3. National Control Committee for Laboratory Standards .M27-A :Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard. 1997;17(9):16.
4. Yücesoy M. Mayalar için antifungal duyarlılık testleri. Sempozyum. 1.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 4-6 Mayıs 1999;İzmir, Türkiye. p.191-199.
5. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of E test and National Committee for Clinical laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 1995;33:535-40.
6. Ener B. Antifungal Direnç. Sempozyum. 1.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 4-6 Mayıs 1999;İzmir, Türkiye. p.187-190
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn, Jr. WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J.B Lippincott Company USA.1992;p:791-878.
8. Samet A, Nalewajska J. Isolation of yeasts from patients hospitalized in a public hospital. Clin Microbiol Infect 2001;7(Supp.1):339.
9. Araj GF, Daher NK, Taborrah ZA. Antifungal susceptibility of candida isolates at the American University of Beirut Medical center. Int J Antimicrob Agents 1998;10:291-296.
10. Özalp M, Ekizoğlu M, Gür D. In vitro activity flukonazole and amfoterisin B against hospital isolates of Candida spp. Clin Microbiol Infect 2001;7 (Supp.1):343.
11. Linares MJ, Monoz JF, Solis F, Rodriguez FC, Valero A, Cosal M. Study of the susceptibility of yeast isolates of clinical interest to five antifungal agents using the E test. Rev Esp Quimioter 1998;11:64-9.
12. Wilke A, Çerikçioğlu N, İnci R, Arslan H, Demirkazık A. Kanserli hastalardan izole edilen Kandida türlerinin antifungallere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1993;23:119-122.