

İN-VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASINDA KUYUCUK DİFÜZYON YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Ayşe EREN, Ayşe KALKANCI

ÖZET

Mantarların antifungallere duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan agar temeline dayalı yöntemler kolay ve ucuz olmaları nedeniyle daha kullanışlı yöntemlerdir. Bu yöntemlerin standardize edilmiş referans yöntemler ile karşılaştırılarak güvenilirliklerinin değerlendirilmesi önemlidir. Bu çalışmada, 35 *Candida* suşunun terbinafin, amfoterisin B, ketokonazol, itraconazol ve flukonazole duyarlılıkları, National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A mikrodilüsyon referans yöntemi ve kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. M27-A mikrodilüsyon yönteminde RPMI 1640 sıvı besiyeri, kuyucuk difüzyon yönteminde ise yeast nitrojen bazlı agar besiyeri (YNBA) kullanılmıştır. YNBA üzerinde 4 mm çaplı kuyucuklar açılmış, bu kuyucuklara her beş antifungalden 20 µl (25 µg) konmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kuyucukların etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür. Zon çapı ≤12 mm ise dirençli, 13-18 mm ise doza bağlı duyarlı, ≥19 mm ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Her iki yöntem arasında uyumluluk oranları, terbinafin için % 83, amfoterisin B için % 88, ketokonazol için % 46, itraconazol için % 94, flukonazol için % 94 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak denebilir ki; güvenilirliği referans mikrodilüsyon yöntemine yakın olan bu difüzyon temeline dayalı yöntem, *Candida* türlerinin ketokonazol dışındaki antifungal ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesinde kullanışlı ve basit bir yöntem olarak denemeye değer bir yöntemdir.

Anahtar kelimeler: Antifungal duyarlılığı, terbinafin, amfoterisin B, ketokonazol, itraconazol, flukonazol

SUMMARY

The evaluation of the well-diffusion method for the investigation of in vitro antifungal susceptibility.

Agar based methods are preferred to determine the susceptibility of fungi to antifungal agents, because of their simplicity and cost effectiveness. It is important to compare these methods with the standardized reference methods in order to evaluate their reliability. In this study, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A microdilution reference method and well-diffusion method were compared to determine the susceptibility of 35 *Candida* strains to terbinafine, amphotericin B, ketoconazole, itraconazole and fluconazole. RPMI 1640 broth medium was used for M27-A microdilution method and yeast nitrogen base agar (YNBA) was used for well-diffusion method. Wells each in 4 mm diameters were cut out in the YNBA plates, and 20 µl (25 µg) of these five antifungals were placed into these wells. Inhibition zone diameters that appeared around the wells were measured after 24 h incubation period. The strains were considered as resistant when the inhibition zone diameters were ≤12 mm, dose dependent susceptible strains showed 13-18 mm while the susceptible strains showed ≥19 mm inhibition zone diameters. Correlation rates between these two methods for these 5 agents terbinafine, amphotericin B, ketoconazole, itraconazole and fluconazole were determined as 83%, 88%, 46%, 94%, 94%, respectively. Depending on these results, we can point out that this diffusion based method which has approximately the same reliability with microdilution reference method for all four antifungals but not for ketoconazole may present a useful and simple method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp.

Key words: Antifungal susceptibility, terbinafine, amphotericin B, ketoconazole, itraconazole, fluconazole

GİRİŞ

Fırsatçı mantar infeksiyonlarındaki artış, antifungal ilaçlara karşı gelişen direnç sorununu gündeme getirmiştir. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) antifungal duyarlılık testlerinin uygulanmasında

standardizasyonu sağlayan bir kuruluştur. Bu kuruluş tarafından önerilen M27-A referans yöntemi mayalar için önerilen fakat uygulanması zaman alıcı bir yöntem olup, azoller için minimal inhibitör konsantrasyonların (MİK) belirlenmesi

*X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (KLİMİK 2001) sunulmuştur (15-19 Ekim 2001, Adana). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

tecrübe gerektirmektedir (8). Difüzyon temeline dayalı duyarlılık yöntemleri antifungal duyarlılık testi olarak son yıllarda artan bir ilgi ile uygulanmaktadır (7,10). Difüzyon temeline dayalı yöntemlerden özellikle disk difüzyon yöntemi kolay ve ucuz oluşu nedeni ile tercih edilmektedir (1). Agar difüzyon temeline dayalı bir başka yöntem olan kuyucuk difüzyon yöntemi ise 1978'de tanımlandıktan sonra, özellikle

yanık ünitelerinde kullanılan topikal antimikrobiyallerin test edilmelerinde kullanılmıştır (4).

Çalışmamızda 35 adet *Candida* suşunun terbinafin, amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve flukonazole duyarlılıkları NCCLS M27-A mikrodilüsyon yöntemi ve kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Maya suşları

Kültür koleksiyonumuzdaki vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen 31 *Candida albicans*, 2 *Candida krusei*, 1 *Candida glabrata*, 1 *Candida inconspicua* suşu ile referans suş olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida krusei* ATCC 6258 kullanılmıştır. Koleksiyonumuzdaki bütün maya örnekleri % 0.9'luk steril NaCl içeren ependorflar içinde, oda ısısında saklanmaktadır. Çalışma öncesinde Sabouraud dekstroz agarda 48 saatlik canlandırma ekimleri yapılmıştır.

Antifungal ilaçlar

Terbinafin (Novartis), amfoterisin B (Sigma), ketokonazol (Janssen Pharmaceutica), itrakonazol (Janssen Pharmaceutica), flukonazol (Pfizer) etken maddeleri kullanılmıştır.

Duyarlılık testleri

NCCLS M27-A mikrodilüsyon testi, komitenin önerile-

rine uygun olarak 96 kuyucuklu mikropaklarda yapılmıştır (8).

Kuyucuk difüzyon yöntemi için yeast nitrogen base agar (YNBA) kullanılmıştır. YNBA önerilere uygun olarak otoklavdan çıkarıldıktan ve 50°C'ye kadar soğuduktan sonra, % 10'luk steril glukoz süspansiyonu eklenmiş, 20'şer ml besiyeri steril tüplere dağıtılmış ve 20 ml besiyeri içine 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan maya süspansiyonlarından 1 ml eklenerek petrilere dağıtılmıştır (5). Tarafımızdan geliştirilen kuyucuk açma yöntemi için, 4 mm çapında kesilen pipet uçları steril edilerek kullanılmıştır. Bu şekilde otomatik pipet yardımı ile besiyeri üzerinde 4 mm çapında standart kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuk içine 20 µl hacim içinde 25 µg antifungal olacak şekilde ilaçlar dağıtılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür.

BULGULAR

Mikrodilüsyon yöntemi ile 24 saat sonunda elde edilen MİK sonuçları şu şekilde değerlendirilmiştir: flukonazol için elde edilen MİK değeri ≤ 8 µg/ml ise test edilen suş duyarlı, 16-32 µg/ml ise doza bağlı duyarlı, ≥ 64 µg/ml ise dirençli; itrakonazol için MİK değeri ≤ 0.125 µg/ml ise duyarlı, 0.25-0.5 µg/ml ise doza bağlı duyarlı, ≥ 16 µg/ml ise dirençli olarak kabul edilmiştir (8). Amfoterisin B için >0.5 µg/ml üzerinde elde edilen MİK değerlerinin dirençli olduğu, ketokonazol için >0.125 µg/ml üzerinde MİK değeri elde edilen suşların tedaviye daha az cevap verdiği bildirilmiştir. Bu iki ilaç için diğer duyarlılık sınırlarına ait herhangi bir öneri bulunmamaktadır (11). Terbinafin için önerilen 8 µg/ml üzerinde MİK elde edilen suşların terbinafine in-vitro dirençli olduğudur (12). MİK sonuçlarına göre 35 *Candida* suşundan terbinafine 1'i dirençli, 34'ü duyarlı; amfoterisin B'ye 7'si dirençli, 28'i duyarlı; ketokonazole 35'i de duyarlı; itrakonazole 1'i

dirençli, 19'u doza bağlı duyarlı, 15'i duyarlı; flukonazole 3'ü doza bağlı duyarlı, 32'si duyarlı olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Kuyucuk difüzyon yöntemi sonrasında oluşan zon çapları ≥ 19 mm ise duyarlı, 13-18 mm arasında ise doza bağlı duyarlı, ≤ 12 mm ise dirençli olarak değerlendirilmiştir (5). Bu kriterlere göre test edilen 35 *Candida* suşunun terbinafine 6'sı doza bağlı duyarlı, 29'u duyarlı; amfoterisin B'ye 7'si dirençli, 4'ü doza bağlı duyarlı, 24'ü duyarlı; ketokonazole 16'sı doza bağlı duyarlı, 19'u duyarlı; itrakonazole 1'i dirençli, 17'si doza bağlı duyarlı, 17'si duyarlı; flukonazole 7'si doza bağlı duyarlı, 28'i duyarlı bulunmuştur (Tablo 1).

Her iki yöntem arasındaki uyumluluk oranları değerlendirildiğinde; terbinafin için % 83, amfoterisin B için % 88, ketokonazol için % 46, itrakonazol için % 94, flukonazol için % 94 olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Duyarlılık testlerinden elde edilen toplam sonuçlar ve uyum oranları.

Sonuç	Terbinafin		Amfoterisin B		Ketokonazol		İtrakonazol		Flukonazol	
	Mik.	Dif.	Mik.	Dif.	Mik.	Dif.	Mik.	Dif.	Mik.	Dif.
Duyarlı	34	29	28	24	35	19	15	17	32	28
Doza bağlı duyarlı	-	6	-	4	-	16	19	17	3	7
Dirençli	1		7	7	-	-	1	1	-	-
Uyum	% 83		% 88		% 46		% 94		% 94	

Mik: Mikrodilüsyon yöntemi, Dif: Difüzyon yöntemi ile alınan sonuçlar

NCCLS yöntemi referans alınarak kuyucuk difüzyon yöntemi için çok büyük hata (dirençli suşun duyarlı bulunması), büyük hata (duyarlı suşun dirençli bulunması) ve küçük hata (herhangi bir yöntemle doza bağlı duyarlı bulunan suşun diğer yöntemle duyarlı veya dirençli bulunması) oran-

ları saptanmıştır (15). Buna göre sadece küçük hata olmak üzere flukonazol için % 6, itrakonazol için %6, ketokonazol için % 46, amfoterisin B için % 12, terbinafin için % 17 hata oranları hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Sonuçların duyarlı, doza bağlı duyarlı ve dirençli olma durumları göz önüne alındığında saptanan çok büyük, büyük ve küçük hata oranları.

Antifungal ajan	Çok büyük hata n(%)	Büyük hata n(%)	Küçük hata n(%)
Flukonazol	-	-	2 (6)
İtrakonazol	-	-	2 (6)
Ketokonazol	-	-	16 (46)
Amfoterisin B	-	-	4 (12)
Terbinafin	-	-	6 (17)

TARTIŞMA

Kuyucuk difüzyon yöntemi disk difüzyon gibi kolay uygulanabilen difüzyon temeline dayalı bir yöntemdir (4). Özellikle geleneksel olarak kullanılan bitkisel ilaçların antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasında veya topikal ajanların test edilmelerinde kullanılagelmiştir (2,3,13,14). Ketokonazol için elde edilen % 46'lık küçük hata hariç tutulursa, diğer ilaçlar için % 83 ile % 94 arasında tam uyumlu sonuç verdiği gösterilmiştir. Bu nedenle ve pratik oluşu nedeniyle denenebileceği düşünülmektedir. Ancak çalışma kapsamındaki suş sayısının kısıtlı olması ve *C.albicans* dışı suş sayımızın azlığı nedeniyle, elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirilirken bu çalışmanın bir ön çalışma olduğu akıldta tutulmalıdır. Yapılan benzer bir çalışmada flukonazolün mayalara etkinliğinin belirlenmesinde, kuyucuk difüzyon yöntemi, disk difüzyon yöntemi ve NCCLS mikrodilüsyon yöntemi karşılaştırılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (6).

Azol grubu antifungal ilaçlara duyarlılık testlerinin uygulanması sırasında en sık karşılaşılan sorun, bu ilaçların fungostatik olmaları nedeniyle sonuçların okunması sırasında tutarsızlık görülmesidir (9). Bu nedenle yüksek oranda

doza bağlı duyarlılık elde edilmektedir. Çalışmamızda da özellikle itrakonazol için mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen doza bağlı duyarlılık sonuçları yüksektir (Tablo 1). Kuyucuk difüzyon yönteminde doza bağlı duyarlılık sınırı olarak 13-18 mm kullanılmıştır. Ketokonazol ve itrakonazolün kuyucuk difüzyon yöntemi ile elde edilen duyarlılık sonuçlarında bu sınırın içinde kalan suş sayısı da oldukça yüksektir. Aynı gruptan başka bir azol olan flukonazol ile ise daha net duyarlılık sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre azol grubu ilaçlardan ketokonazol ve itrakonazol ile yapılan duyarlılık testlerinde doza bağlı duyarlılık oranlarının yüksek olabileceği akıldta tutulmalıdır.

NCCLS dökümanlarında ketokonazol ve amfoterisin B için sadece dirençlilik sınırı bildirilmektedir. Bu nedenle sonuçlar karşılaştırıldığında ketokonazol için kuyucuk difüzyonu ile doza bağlı duyarlılık elde edilen 16 suşun mikrodilüsyon yöntemi ile tamamı duyarlı olarak değerlendirilmelidir. Dolayısı ile bu ilaç için küçük hata oranı diğerlerine göre çok yüksek (% 46) bulunmuştur. Amfoterisin B için mikrodilüsyon ile doza bağlı duyarlılık sonucu bulunmaması nedeniyle

değerlendirmede aynı problem yaşanmamıştır.

Terbinafin için NCCLS dökümanlarında herhangi bir öneri bulunmamaktadır. Bu alilamin grubu antifungal için çeşitli yayınlarda bildirilen direnç sınırı olarak $>8 \mu\text{g/ml}$ kullanılmıştır (12).

Çalışmamız sonuçlarına göre, kuyucuk difüzyon yöntemi ketokonazol hariç test edilen bütün antifungaller için re-

ferans yöntem ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Referans yöntemlerin her zaman standardize edilmiş yöntemler oldukları gözden kaçırılmadan, bu difüzyon temeline dayalı pratik yöntemin daha geniş serilerde ve karşılaştırmalı çalışmalarla değerlendirilerek, güvenilirliğinin ortaya çıkarılması için gelecekte yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1- Barry AL, Brown SD: Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species, *J Clin Microbiol* 34:2154 (1996).
- 2- Desta B: Ethiopian traditional herbal drugs: Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants, *J Ethnopharmacol* 39:129 (1993).
- 3- Heggors JP, Velanovich V, Robson MC, Zoellner SM, Schileru R, Boertman J, Xing-Tao N: Control of burn wound sepsis: A comparison of in vitro topical antimicrobial assays, *J Trauma* 27:176 (1987).
- 4- Holder IA, Boyce ST: Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture, *Burns* 20:426 (1994).
- 5- Magaldi S, Mata S, Hartung C, Verde G, Deibis L, Roldan Y, Marcano C: In vitro susceptibility of 137 *Candida* spp. isolates from HIV positive patients to several antifungal drugs, *Mycopathologia* 149:63 (2001).
- 6- Magaldi S, Rios A, Hartung C, Verde G, Spencer L, Mata S: In vitro susceptibility to fluconazole of *Candida* spp. isolates comparing three different methods, *J Mycol Med* 11:123 (2001).
- 7- Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D, and the Global Antifungal Surveillance Group: A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion, *Diagn Microbiol Infect Dis* 36:215 (2000).
- 8- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, Approved standard M27-A, NCCLS, Wayne (1996).
- 9- Nguyen MH, Yu CY: Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentrations on spectrophotometric end point determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole, *J Clin Microbiol* 37:141 (1999).
- 10- Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Müller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, Shadomy S, Troke PF, Walsh TJ, Warnock DW: Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study, *Antimicrob Agents Chemother* 36:1805 (1992).
- 11- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chatorvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges, *Clin Microbiol Rev* 14:643 (2001).
- 12- Ryder NS, Wagner S, Leitner I: In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts, *Antimicrob Agents Chemother* 42:1057 (1998).
- 13- Taddonio TE, Thomson PD, Smith DJ, Prasad JK: Topical antimicrobial testing of burn wound microorganisms, evaluation of a new technique, *Burns* 16:64 (1990).
- 14- Thomson PD, Taddonio TE, Tait M, Prasad JK: Susceptibility of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* wound isolates to topical antimicrobial agents, a 10-year review and clinical evaluation, *Burns* 15:190 (1989).
- 15- Yücesoy M, Mutlu E, Yuluğ N: Antifungal duyarlılığın saptanmasında E test yönteminin değerlendirilmesi, *ANKEM Derg* 15:670 (2001).