

## İN-VİTRO ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Beyza ENER

*In vitro antifungal susceptibility tests.*

Patojen mantarlara karşı çeşitli antifungal ajanların in-vitro etkinliğini güvenilir bir şekilde ölçmek günümüzde istenilen testler haline gelmiştir. Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilir:

**1- Fungal infeksiyonlar önemli klinik problemler oluşturmaktadır.** Son 10 yılda fungal infeksiyonların (özellikle mayalarla olan) insidansının artışı; yeni ve daha etkili antibakteriyel ajanların artarak kullanılmasına, AIDS pandemisine, terapötik olarak immunsuprese hale gelmiş hasta sayısının artmasına, KIT ve solid organ transplantasyonlarının daha fazla yapılmasına ve onkoloji hastalarına bağlanmaktadır. Gelişmiş tedavi protokolleri sonucu bu hasta popülasyonları daha uzun süre yaşayabilmekte ve hayatı tehdit eden mantar infeksiyonlarına duyarlı hale gelmektedirler.

**2- Fungal infeksiyonların tedavisinde seçilebilecek sistemik etkili antifungal ajanların sayısı artmıştır.** 1950'li yıllarda bulunan amfoterisin B uzunca süre tek başına kullanılan antifungal ajan olmuştur. Her ne kadar her mantar infeksiyonunda etkili olmasa ve toksik özelliği de olsa, uzunca süre bir alternatifi üretilememiştir. Ancak fırsatçı mantar infeksiyonlarının insidansındaki artışa paralel olarak son dekatta sistemik aktivitesi olan yeni antifungal ajanlar da geliştirilmiştir. Bugün için sistemik fungal infeksiyonlarda kullanılabilir lisanslı 6 antifungal ajan bulunmaktadır. Bunlar polien grubundan amfoterisin B, imidazollerden mikonazol ve ketokonazol, triazollerden flukonazol ve itraconazol ve primidin sentez inhibitörü olan flusitozindir(7).

**3- Antifungal ajanlara karşı direnç görülmeye başlanmıştır.** Fungal infeksiyonlardaki artışa paralel olarak antifungal ilaç kullanımında da artma olmuştur. Ancak antifungal ilaçların artan oranda kullanılması infeksiyona sebep olan organizmalarda değişikliğe yol açmıştır. Yeni antifungallerden triazollerin gündeme gelmesi ile özellikle *Candida* infeksiyon paternlerinde değişiklik olmuştur. Mayalar arasında primer ve sekonder olarak dirence rastlanmaktadır. Dirençli türler genellikle non-*albicans Candida* türleri arasında bulunmaktadır. Özellikle *C.parapsilosis*, *C.lusitanae*, *C.krusei*, *C.glabrata* gibi maya türlerinde direnç vardır. Daha sık rastlanılan ve daha virülen olan *C.albicans*'da da HIV pozitif hastalarda dirence rastlanmaktadır(1,18). *Candida* türlerine ek olarak; *Fusarium* türleri, *Trichosporon beigeli*, *Zygomycetes*ler, *Dematiaceous* mantarlar ve diğer non-patojenik mantarlar bazı hastalarda önemli problemler oluşturan yeni fungal patojenler olarak belirlenmektedir(2).

Tüm bu nedenlere bağlı olarak in-vitro antifungal ajanlara karşı duyarlılık testlerine olan ilgi artmıştır ve klinik tanı laboratuvarlarına antifungal tedavi seçimi ve tedavinin monitörizasyonunda daha fazla rol ve sorumluluk yüklenmektedir. Ancak in-vitro antifungal duyarlılık testlerinde tam bir standardizasyonun sağlanamamış olması ve in-vivo korelasyonunu iyi olmaması nedeni ile bu testlerin klinik değeri tartışmalıdır. Antifungal duyarlılık testlerinde karşılaşılan problemler şu başlıklar altında toplanabilir(16):

1- Ökaryotik mikroorganizma olan mantarlara bağlı nedenler (yavaş üreme hızı, dimorfizm... vb).

2- Antifungal ajanlara bağı nedenler (çözünürlük, stabilite, geniş konsantrasyon aralıklarında kısmi inhibisyon... vb).

3- Kullanılan metodlara bağı nedenler (inokulum büyüklüğü, besiyeri, pH, inkübasyon süresi, inkübasyon ısısı... vb).

Bugün için in-vitro antifungal duyarlılıkları test etmek amacı ile kullanılan metodlar antibakteriyel duyarlılık test metodlarından örneklenerek alınmıştır. Buyyonda dilüsyon (makro ve mikro), jeloz dilüsyon ve jeloz difüzyon (disk ve E testi) metodları kullanılan metodlardır(7). Ayrıca hızlı bir şekilde antifungal aktiviteyi ölçmeyi planlayan flow sitometrinin ve otomatize kan kültür sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar da vardır(10,11). Son birkaç yıla kadar bu değişik metodlar rastgele olarak laboratuvarlar tarafından uygulanmış ve standardize olmamış yöntemlere bağı olarak oldukça farklı sonuçlar alınmıştır(9). Bu zorlukları çözmek için 1982 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bir komite kurulmuş ve geniş kapsamlı ortak çalışmalarla standart metodoloji oluşturulmaya çalışılmıştır. Komite işe bir anket yaparak başlamış ve en çok tercih edilen metodun makrodilüsyon yöntemi olduğu anlaşılmıştır(4). Bunun üzerine makrodilüsyon yöntemi standardize edilmeye çalışılmış ve birçok parametrenin kontrol edildiği 10 yıllık çok sayıda çalışma sonunda NCCLS tarafından referans bir metod yayınlanmıştır(12). Referans makrodilüsyon metodu öncelikle *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* gibi maya grubu mantarların in-vitro duyarlılığını ölçmek amacı ile standardize edilmiştir ve dimorfik ve filamentöz mantarlar için uygun değildir. Dimorfik ve filamentöz mantarlar için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca referans metod sonuçları ile hastanın tedaviye cevabı arasında tam bir korelasyon olmayıp ileri çalışmalar gerekmektedir. Referans metod, son konsantrasyon aralığını amfoterisin B için 0.03-16 µg/ml, flusitozin için 0.125-64 µg/ml, ketokonazol için 0.03-16 µg/ml ve flukonazol için 0.125-64 µg/ml olarak belirlemiştir. RPMI 1640 sentetik besiyerinin (0.165 MOPS ile tamponlanmış, pH: 7.0) kullanılmasının en iyi sonucu verdiği saptanmıştır. En önemli aşamalardan biri olan inokulum miktarının belirlenmesinin spektrofotometrik olarak yapılması ve 530 nm'de McFarland 0.5 tüpünün verdiği geçirgenlikle aynı değeri veren inokulum miktarı 1/100 ve 1/20 kez sulandırılarak standart  $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$  /ml'lik miktar hazırlanması önerilmiştir. İlaç dilüsyonlarından 0.1 ml, maya süspansiyonundan 0.9 ml konularak hazırlanan tüplerin 35°C'da 48 saat inkübe edilmesi ve MIC (minimal inhibitör konsantrasyon) değeri olarak amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, flusitozin ve azol antifungaller için % 80 inhibisyonun olduğu en düşük konsantrasyonun alınmasının uygun olduğu bulunmuştur. Flusitozin ve azol gibi antifungal ajanlarda geniş konsantrasyon aralıklarında kısmi inhibisyon olduğu için MIC'i belirlemede laboratuvarlarda çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bazı laboratuvarlar üremenin azaldığı, bazı laboratuvarlar ise üremenin tamamen kesildiği en düşük konsantrasyonu MIC olarak aldıkları için MIC değerlerinde büyük farklılıklar olmaktadır(15). Bu sorunu önlemek için NCCLS tarafından % 80 inhibisyonun olduğu en düşük konsantrasyonun alınması önerilmiştir. Standart yöntem kullanılarak çok merkezli (13 merkez) yapılan geniş bir çalışmada laboratuvarlar arası uyum % 85 olarak bulunmuştur(8). Ancak referans yöntem olarak önerilen makrodilüsyon yöntemi oldukça zaman alıcı, fazla malzeme harcayan, klinik laboratuvarlara yük bindiren ve rutin kullanıma çok uygun olmayan bir yöntem olduğu için referans yöntemin bazı modifikasyonlarla mikrodilüsyon olarak yapılmasına yönelik çalışmalar olmuştur. Makro ve mikrodilüsyon yöntemleri karşılaştırıldığında çeşitli çalışmalarda % 80'in üzerinde uyum elde edilmiştir(3,5,6). Bu çalışmalara göre NCCLS standartları kullanılarak uygulanan mikrodilüsyon yöntemi kolay bir alternatif oluşturmuştur. Antifungal duyarlılık testlerinde en büyük problem özellikle azol grubu antifungallerde görülen yukarıda anlatıldığı gibi kısmi

inhibisyonudur. Kısmi inhibisyon nedeni ile MIC değerlerini okumakta sorun yaşanmaktadır. Bunu kolaylaştırmak amacı ile daha ileri bir aşama olarak mikrodilüsyon yöntemine bir oksidasyon redüksiyon sistemi eklenmiş ve böylece sistemdeki indikatör aracılığı ile oluşan renk değişimlerinden sonuçların daha kolay okunduğu gözlenmiştir. Bu metodla diğer metod arasında uyum, yapılan çeşitli çalışmalara göre % 80-% 96 civarında bulunmuş ve bu yöntemin de rahatlıkla kullanılabilceği anlaşılmıştır(13,14,17).

Umut verici olsa da antifungal duyarlılık testleri henüz daha araştırma aşamasındadır ve rutin olarak kullanılmamalıdır. Her ne kadar uzun süreli tedavilerde bu yöntemler kullanılarak yükselen MIC değerleri ve klinik yanıtızsızlık elde edilmişse de bu sonuçlar yeterli olmayıp bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Antifungal tedavide önemli olan diğer parametreler (doz, verilmiş süresi, verilmiş yolu, hastanın altta yatan hastalığı, CD<sub>4</sub> sayısı) de değerlendirilerek doğru klinik korelasyonun zaman içerisinde sağlanacağı ve rutin uygulamaya geçilebileceği umulmaktadır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Akova M, Akalın EH, Uzun Ö, Hayran M, Tekuzman G, Kansu E, Aslan S, Telatar H: Efficacy of fluconazole in the treatment of upper gastrointestinal candidiasis in neutropenic patients with cancer: Factors influencing the outcome, *Clin Infect Dis* 18:298 (1994).
- 2- Anaissie E: Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review, *Clin Infect Dis* 14(Suppl 1):43 (1992).
- 3- Barchiesi F, Colombo AL, McGough 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* 32:2494 (1994).
- 4- Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennett JE, Feingold DS, Jorgensen J, Kobayashi GS, Shadomy S: Result of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B, *J Clin Microbiol* 23:298 (1986).
- 5- Espinel-Ingroff A, Kerkering TM, Goldson PR, Shadomy S: Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests, *J Clin Microbiol* 29:1089 (1991).
- 6- Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, Fromling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A: Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests, *J Clin Microbiol* 30:3138 (1992).
- 7- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA: Antifungal agents and susceptibility testing, "P Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s.1405, ASM Press, Washington (1995).
- 8- Fromling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, Body BA, Frey C, Hall G, Roberts GD, Nolte FB, Odds FC, Rinaldi MG, Sugar AM, Villareal K: Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility tests for yeasts, *Antimicrob Agents Chemother* 37:39 (1993).
- 9- Galgiani JN, Reiser J, Brass C, Espinel-Ingroff A, Gordon MA, Kerkering TM: Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods, *Antimicrob Agents Chemother* 31:1343 (1987).
- 10- Green L, Petersen B, Steimel L, Haerber P, Current W: Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry, *J Clin Microbiol* 32:1088 (1994).
- 11- Hazen KC, Chery MP, Han Y: Potential use of BacT/Alert automated blood culture system for antifungal susceptibility testing, *J Clin Microbiol* 32:848 (1994).
- 12- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeast*, Proposed standard, Document M-27-P, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1992).

- 13- Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Chalberg-Rhine J: Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*, *J Clin Microbiol* 32:506 (1994).
- 14- Pfaller MA, Vu Q, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Grant C, McGinnes MR, Pasarell L, Rinaldi MG, Steele-Moore L: Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates, *J Clin Microbiol* 32:1625 (1994).
- 15- Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani J: Antifungal susceptibility testing, *Clin Microbiol Rev* 6:367 (1993).
- 16- Sheehan DJ, Espinel-Ingroff A, Moore LS, Webb CD: Antifungal susceptibility testing of yeast: A brief overview, *Clin Infect Dis* 17(Suppl 2):494 (1993).
- 17- To WK, Fothergill AW, Rinaldi M: Comparative evaluation of macrodilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates, *J Clin Microbiol* 33:2660 (1995).
- 18- Wingard JR: Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy, *Clin Infect Dis* 19(Suppl 1):49 (1994).