

ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Sevtap ARIKAN

İmmün yetmezliği olan olgu sayısında ortaya çıkan artışla birlikte, bu olgularda gelişen fırsatçı mantar infeksiyonları önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak gündeme gelmiştir (26).

Fırsatçı mantar infeksiyonlarının artışı ile aynı dönemlerde, ilaç endüstrisindeki gelişmelerle birlikte, antifungal etkinliği olan yeni bileşikler ortaya çıkmış ve bu konuda yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalar hız kazanmıştır. Daha önceleri sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılacak tek ilaç amfoterisin B iken, daha sonraları imidazol grubundan ketokonazol, triazol grubundan flukonazol ve itraconazol bazı mantarlara bağlı gelişen sistemik infeksiyonlarda etkin bulunarak seçenekler arasına katılmıştır (8,24). Triazol grubundan vorikonazol (9) ve ekinokandin grubu antifungaller (1,25) ile ilgili çalışmalar da devam etmektedir. Yeni geliştirilen antifungallerin, amfoterisin B'ye kıyasla toksik etkilerinin daha az oluşu, antifungal tedavide yeni bir umut ışığı oluşturmuştur. Amfoterisin B ve nistatin gibi eski ve bilinen, ancak toksik olan antifungallerin lipozomal formlarının geliştirilmesi ise, antifungal etkinlik korunurken toksisitenin azaltulabilmesini sağlamış, böylece lipozomal antifungaller de mantar infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir adım olmuştur (4,6,15).

Bütün bu gelişmeler sırasında antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmış ve günümüze dek önemli aşamalar kaydedilmiştir. Standart bir antifungal duyarlılık testine gereksinim duyulma nedenleri şöyle özetlenebilir:

1. Sistemik mantar infeksiyonlarındaki artış,
2. Antifungal tedavi seçeneklerindeki artış ve uygun seçeneğin belirlenmesindeki zorluklar,
3. İnfeksiyon etkeninin, ilişkin antifungal ajana in-vitro duyarlılık paterni ile tedavi sonucu elde edilen klinik yanıt arasındaki korelasyonun belirlenmesi ve böylece tıpkı bakteriyel infeksiyonlardaki gibi in-vitro duyarlılık sonuçlarına göre klinik başarının tahmin edilebilir hale gelmesi.

Bu nedenlerle, antifungal tedaviye ışık tutması ve bu konudaki sorunların çözümlenmesi amaçlanarak, sistemik infeksiyonlara yol açan maya ve küf mantarları için standart in-vitro duyarlılık yöntemleri geliştirilmiştir. "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından önerilen bu yöntemler şu anda uygulanmakla birlikte bazı sorunlar halen çözümlenememiştir.

Maya mantarları için önerilen referans antifungal duyarlılık testi

İlk kez 1982 yılında NCCLS bünyesinde konuyla ilgili bir alt komite oluşturulmuş ve antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çok merkezli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda toplanan veriler doğrultusunda ilk kez 1992 yılında *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* izolatları için referans bir yöntem önerilmiş (NCCLS-M27P), 1992-1997 yılları arasındaki süre içerisinde ise bu yöntemle ilgili çalışmalar sürdürülmüştür. Sonuçta, elde edilen yeni verileri ve gelişmeleri içeren NCCLS-M27T ve nihayet 1997 yılında NCCLS-M27A dökümanları hazırlanmıştır (18). Bu bilgiler çerçevesinde, son önerilen yöntemle ilişkin test koşulları tablo 1'de sunulmuştur. Ancak, bu koşullar

la ilgili sorunlar mevcuttur ve bu sorunların çözümlenebilmesine ilişkin çalışmalar halen devam etmektedir.

Tablo 1. Maya mantarları için önerilen antifungal duyarlılık testi (18).

Yöntem	Mikrodilüsyon
Besiyeri	L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız RPMI-1640
İnokulum miktarı	0.5×10^3 - 2.5×10^3 cfu/mL
İnkübasyon sıcaklığı	35°C
İnkübasyon süresi	48 saat (Candida) 72 saat (C. neoformans)
MIC değeri	Okuma: Vizüel Amfoterisin B: Hiç üreme görülmeyen (berrak) en düşük konsantrasyon (Skor "0") Azoller ve 5-flusitozin: Üreme kontrol çukuruna göre bulanıklığı belirgin (-% 50) azaltan en düşük konsantrasyon (Skor "2")

Sorunlar

1. Yöntem. Mikrodilüsyon yönteminden daha pratik bir yöntem geliştirilebilir mi?

Maya mantarlarının antifungal duyarlılık testleri için bugüne dek değişik yöntemler denenmiştir. Bunlar içerisinde makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E-test sayılabilir (3,7,11,13,21). Çalışmalar makrodilüsyon yöntemi ile başlamış, daha sonra bu yöntemin pratik uygulamadan uzak olması nedeniyle diğer yöntem arayışları devam etmiştir. Yapılan çalışmalarda mikrodilüsyon yönteminin makrodilüsyon yöntemiyle uyumlu sonuçlar verdiğinin görülmesi üzerine M27A dökümanında mikrodilüsyon metodolojisi önerilmiştir. Ancak, mikrodilüsyon yönteminin de makrodilüsyon yönteminden daha az olmakla birlikte, benzer olumsuz özellikleri bulunmaktadır.

E-test antifungal duyarlılık için güvenilir ve pratik bir yöntemdir (11). Ancak, yöntemin maliyeti çok yüksektir ve referans yöntem olarak kullanılmaktan uzaktır. Disk difüzyon yöntemi ise bu yöntemler içerisinde en pratik olanıdır ve bu yöntemin standardizasyonuna ilişkin çalışmalar devam etmektedir (7).

2. İnkübasyon süresi. 48 saatten daha kısa sürede güvenilir sonuçlar elde edilebilir mi?

Şu anda mevcut olan M27A dökümanında *Candida* türleri için 48 saat, *C. neoformans* için ise 72 saat inkübasyon sonunda MIC değerlerinin saptanması önerilmektedir. İnkübasyon süresinin bu denli uzun oluşu hem klinik uygulamadaki yararlılığı azaltmakta, hem de kontaminasyon riskini arttırmaktadır. Bu nedenlerle, MIC sonuçlarının daha kısa sürede saptanabilmesine ilişkin çalışmalar devam etmektedir. Bu konuda deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada, flukonazol için 24 saatte saptanan MIC değerinin 48 saatte saptanana oranla klinik sonuçlarla korelasyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (23).

3. Azol grubu antifungaller. MIC sonuçlarının okunmasındaki zorluklar.

Amfoterisin B için yapılan duyarlılık testlerinde MIC değeri kolaylıkla okunabilirken, azol grubu antifungaller için bu değer okunması amfoterisin B için olduğu kadar pratik ve kolay olmamaktadır (18).

4. Amfoterisin B duyarlılık testleri. Dirençli suşları saptayabilen ve klinik cevabı yanıtan bir yöntem geliştirmek mümkün mü?

NCCLS M27A yöntemi ile hemen tüm izolatlarda amfoterisin B için benzer MIC değerleri elde edilmekte, dolayısıyla bu dar MIC sınır değerleri çerçevesinde dirençli suşları ayırtmak mümkün olmamaktadır. Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda, standart RPMI besiyeri yerine "Antibiotic Medium 3" besiyerinin kullanılmasının dirençli suşları ayırt-

mede yararlı olabileceği bildirilmiş olmakla birlikte, bu besiyeri ile elde edilen sonuçlar çelişkilidir ve amfoterisin B için henüz dirençli suşları ayırabilen standart bir yöntemin mevcut olduğunu söylemek zordur (16,17,20,22).

5. MIC sonuçlarının yorumlanmasında kullanılacak direnç sınır değerleri.

Candida türlerinin flukonazol, itrakonazol ve flusitozine in-vitro duyarlılığının belirlenmesinde kullanılacak direnç sınır değerleri NCCLS tarafından belirlenmiştir. Ancak amfoterisin B için henüz bu değerlerin saptanabilmesi mümkün olmamıştır (18).

6. İn-vitro duyarlılık testi sonucu klinik yanıtı ne kadar yansıtabiliyor?

Antifungal duyarlılık testlerinin ortaya çıkışının esas nedeni, klinik yanıtı yansıtabilen bir yöntem geliştirebilme çabasıdır. NCCLS tarafından yöntemin standardize edilmesini takiben klinik yanıtı ne derece yansıtabildiğini araştıran hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmıştır ve halen devam etmektedir (2,12).

Sistemik mantar infeksiyonları genellikle immün yetmezlikli hastalarda gelişmekte ve mantar infeksiyonunun prognozu, verilen antifungal tedavi ve suşun in-vitro duyarlılık paterni kadar, alitta yatan hastalığın gidişine de bağlı olarak değişmektedir. Sonuç olarak, bu denli çok faktöre bağlı olan klinik yanıtı in-vitro duyarlılık paterninin etkisinin ne olduğunun saptanması zordur. Bu konuda yapılan bir çalışmada flukonazol ile tedavi edilen olguların tedaviye verdikleri yanıtın, infekte eden suşun duyarlılık paterni ile ilintili olduğu görülmüştür (2). Bu konuyla ilgili halen bir çok çalışma yürütülmektedir.

Küf mantarları için önerilen referans antifungal duyarlılık testi

Maya mantarları için referans NCCLS yönteminin önerilmesini takiben, bu yöntem esas alınarak küf mantarları için de standart bir yöntem geliştirme çabaları başlamıştır (5,10,14). Yapılan çok merkezli çalışmaları takiben, Kasım 1998'de *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Rhizopus* türleri, *Pseudallescheria boydii* ve *Sporothrix schenckii*'nin miçelyal formu için NCCLS tarafından ilk duyarlılık testi önerisi yayımlanmıştır (19). Bu dökümanda önerilen test koşulları tablo 2'de özetlenmiştir. Bundan sonra elde edilecek veriler doğrultusunda, yöntemle ilgili gerekli değişikliklerin yapılması amaçlanmaktadır.

Tablo 2. Küf mantarları için önerilen antifungal duyarlılık testi (19).

Yöntem	Mikrodilüsyon
Besiyeri	L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız RPMI-1640
İnokulum miktarı	0.4x10 ⁴ -5x10 ⁴ cfu/mL
İnkübasyon sıcaklığı	35°C
İnkübasyon süresi	24 saat (<i>Rhizopus</i>) 48 saat (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>S. schenckii</i>) 72 saat (<i>P. boydii</i>)
MIC değeri	Okuma: Vizüel Amfoterisin B: Hiç üreme görülmeyen (berrak) en düşük konsantrasyon (Skor "0") Azoller ve 5-flusitozin: Üreme kontrol çukuruna göre bulanıklığı belirgin (-% 50 ve daha fazla) azaltan en düşük konsantrasyon (Skor "2" veya altı)

Sorunlar

Küf mantarları için mayalara oranla henüz çok daha kısa bir yol katedilmiştir. MIC direnç sınır değerleri ve duyarlılık testi ile klinik yanıt arasındaki korelasyon başta olmak üzere bir çok soru henüz yanıt bulamamıştır (19).

Sonuç

Antifungal duyarlılık testleri henüz şekillenen güncel bir konudur. Bu testlerin klinik örneklerden izole edilen suşların hepsine rutin olarak uygulanması önerilmemektedir. Testin uygulanması kararı klinik-laboratuvar işbirliği ile verilmeli ve seçici davranılmalıdır (19). Yürütülmekte olan in-vitro ve in-vivo çalışmalardan elde edilecek sonuçlar, bu testlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Abruzzo G K, Flattery A M, Gill C J, Kong L, Smith J G, Pikounis V B, Balkovec J M, Bouffard A F, Dropinski J F, Rosen H, Kropp H, Bartizal K: Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): Efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2333 (1997).
- 2- Arıkan S, Akova M, Hayran M, Özdemir O, Erman M, Gür D, Ünal S: Correlation of in vitro fluconazole susceptibility with clinical outcome for severely ill patients with oropharyngeal candidiasis, *Clin Infect Dis* 26: 903 (1998).
- 3- Arıkan S, Gür D, Akova M: Comparison of E-test, microdilution and colorimetric microdilution with reference broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients, *Mycoses* 40: 291 (1997).
- 4- Arıkan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Gordon D, Wallace T, Rex J H: In vitro activity of liposomal nystatin (LNY, Nyotran) compared with amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLU) against clinical *Candida* isolates, 98th General Meeting of American Society for Microbiology, Abst. No. C-280, Atlanta (1998).
- 5- Arıkan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex J H: Activity of amphotericin B (AMB), itraconazole (ITR), and voriconazole (VOR) against *Aspergillus* (ASP) and *Fusarium* (FUS), 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abst. No. J-19, San Diego (1998).
- 6- Arıkan S, Paetznick V L, Arizmendi A, Lal L, Khyne T A, Lozano-Chiu M, Wallace T, Bazemore S, Rex J H: Comparative murine pharmacokinetics of polyene antifungal agents, 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abst. No. J-79, San Diego (1998).
- 7- Barry A L, Brown S D: Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species, *J Clin Microbiol* 34: 2154 (1996).
- 8- Dupont B, Drouhet E: Early experience with itraconazole in vitro and in patients: Pharmacokinetic studies and clinical results, *Rev Infect Dis* 9: S71 (1987).
- 9- Espinel-Ingroff A: In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens, *J Clin Microbiol* 36: 198 (1998).
- 10- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin N X, Cooper JR C, Fothergill A, McGinnis M R, Menezes P, Messer S A, Nelson P W, Odds F C, Pasarell L, Peter J, Pfaller M A, Rex J H, Rinaldi M G, Shankland G S, Walsch T J, Weitzman I: Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *J Clin Microbiol* 35: 139 (1997).
- 11- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin M E, Jones R N: Interlaboratory evaluation of E-test method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI-1640 medium with 2% glucose, *J Clin Microbiol* 34: 848 (1996).
- 12- Ghannoum M A, Rex J H, Galgiani J N: Susceptibility testing of fungi: Current status of correlation of in vitro data with clinical outcome, *J Clin Microbiol* 34: 489 (1996).

- 13- Gülay Z, Yuluğ N: Antikandidal duyarlılık testlerinde yöntemlerin karşılaştırılması, *Mikrobiyol Bül* 29: 179 (1995).
- 14- Gülay Z, Yuluğ N: Filamentöz mantarların antifungal duyarlılık testlerinde yöntemlerin karşılaştırılması, *Infeksiyon Derg* 12: 407 (1998).
- 15- Leenders A, de Marie S: The use of lipid formulations of amphotericin B for systemic fungal infections, *Leukemia* 10: 1570 (1996).
- 16- Lozano-Chiu M, Arkan S, Martin-Diez F M, Paetznick V, Rodriguez-Tudela J L, Rex J H: Reliability of Antibiotic Medium 3 (AM3) agar and E-test for detection of amphotericin B (AMB) resistant isolates of *Candida* spp.: results of a collaborative two-center study, *38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abst. No. J-18, San Diego (1998).
- 17- Lozano-Chiu M, Arkan S, Martin-Diez F M, Paetznick V, Rodriguez-Tudela J L, Rex J H: A two-center study of Antibiotic Medium 3 (AM3) broth for detection of amphotericin B (amB)-resistant isolates of *Candida* spp. (CAND) and *Cryptococcus neoformans* (CNEO), *38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Abst. No. J-19b, San Diego (1998).
- 18- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, Approved standard M27-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (1997).
- 19- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi*, Proposed standard M38-P, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (1998).
- 20- Nguyen M H, Clancy C J, Yu V L, Yu Y C, Morris A J, Snyderman D R, Sutton D A, Rinaldi M G: Do in vitro susceptibility data predict the microbiological response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia, *J Infect Dis* 177: 425 (1998).
- 21- Pfaller M A, Arkan S, Lozano-Chiu M, Chen Y S, Coffman S, Messer S A, Rennie R, Sand C, Heffner T, Rex J H, Wang J, Yamane N: Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing, *J Clin Microbiol* 36: 2609 (1998).
- 22- Rex J H, Cooper Jr C R, Merz W G, Galgiani J N, Anaissie E J: Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 906 (1995).
- 23- Rex J H, Nelson P W, Paetznick V L, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie E J: Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis, *Antimicrob Agents Chemother* 42: 129 (1998).
- 24- Terrell C L, Hughes C E: Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections, *Mayo Clin Proc* 67: 69 (1992).
- 25- Uzun Ö, Kocagöz S, Çetinkaya Y, Arkan S, Ünal S: In vitro activity of a new echinocandin, LY303366, compared with amphotericin B and fluconazole against clinical yeast isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1156 (1997).
- 26- Wingard J R: Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy, *Clin Infect Dis* 19 (Suppl 1): S49 (1994).