

## ANTİFUNGAL DUYARLILIĞIN MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASINDA FARKLI DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ\*

Mine YÜCESOY, Nevcivan ŞENTÜRKER GÜLDAŞ, Nuran YULUĞ

### ÖZET

*Candida* suşlarının azol derivelere duyarlılığının saptanması için önerilen mikrodilüsyon yöntemi için objektif bir değerlendirme kriteri saptamak amacı ile 103 *Candida albicans* suşunun flukonazol ve ketokonazole duyarlılıkları NCCLS kriterlerine uyularak mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Sonuçlar hem gözle, hem de optik dansiteleri okunarak değerlendirildikten sonra plaklara 5 dakikalık çalkalama işlemi uygulanmış ve okumalar gözle ve optik okuyucuda tekrarlanmıştır. Çalkalama işlemi yapılmadan önceki gözle ve optik okuyucudaki değerlendirmelerin sonuçlarında; flukonazol için % 92; ketokonazol için % 88 tutarlılık saptanırken, çalkalama yapıldıktan sonra bu değerler % 98 ve % 94 olarak bulunmuştur. Çalkalama öncesi ve sonrasındaki değerler karşılaştırıldığında; flukonazol ve ketokonazol için gözle okumada sırasıyla % 97 ve % 94; optik okuyucu ile okumada ise % 92 ve % 94 oranlarında tutarlılık saptanmıştır. Sonuçlarımıza göre azoller için mikrodilüsyon sonuçları değerlendirilirken çalkalama işleminin ve optik okuyucuda okumanın daha net, objektif ve tutarlı değerlendirme sağladığı düşüncesine varılmıştır.

### SUMMARY

*Different evaluation methods for microdilution antifungal susceptibility testing.*

To determine an objective evaluation criteria for the recommended microdilution method for the susceptibility testing of *Candida* strains against azol derivatives, the susceptibility of 103 *Candida albicans* strains were evaluated against fluconazole and ketoconazole by microdilution method according to NCCLS standards. The results were read visually and by measuring the optical density. After a five minute agitation, the plates were evaluated with the same methods once more. The agreement between the visual and optical evaluations before agitation were detected to be 92 % for fluconazole and 88 % for ketoconazole and these values were found to be 98 % and 94 % after agitation, respectively. When the values before and after agitation were compared, the agreement was found to be 97 % and 94 % for fluconazole and ketoconazole for visual reading and 92 % and 94 % for optical density evaluation. According to our results, it is concluded that the agitation procedure and optical density evaluation can provide clear, objective and comparable results for the microdilution method for azol derivatives.

### GİRİŞ

Son yıllarda özellikle fırsatçı fungusların neden olduğu infeksiyonların insidansında ciddi bir artış izlenmiştir (1). Bu artışa neden olarak AIDS, kanser kemoterapisi ve transp-

\* 4. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler toplantısında sunulmuştur (17-19 Mayıs 1999, İstanbul).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı, İzmir.

lantasyona bağı olarak immun yetmezlikli olgulardaki artma, geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçlar ve glukokortikosteroid sağaltımı, cerrahi, protez kullanımı, kateter uygulanımı gibi invaziv işlemler, parenteral beslenme ve diyaliz gösterilmiştir (5,7). Buna paralel olarak antifungal ilaç kullanımında da belirli bir artma söz konusu olmuştur (15). Bu durumun bir başka yönü de antifungal ajanlara karşı gelişen dirençtir. Tüm bunlar göz önüne alındığında antifungal duyarlılık testlerinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Mayaların antifungal duyarlılıklarının saptanmasında; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) makro ve mikrodilüsyon yöntemlerini önermektedir (8). Makrodilüsyon yönteminin rutinde kolay uygulanabilir olmaması ve fazla malzeme ile iş gücü gerektirmesi nedeni ile mikrodilüsyon daha uygun bir yöntem olarak görülmektedir. Bu yöntemde azoller için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak üremede belirgin azalmanın gözleendiği (MİK-2) konsantrasyon belirlenir. Bu son nokta mikrodilüsyon yönteminde MİK olarak saptanan kontrole göre % 80 azalmaya karşılık gelmektedir. Mikrodilüsyon yönteminde son noktanın gözle belirlenmesinin subjektif bir işlem olduğu ve özellikle azol grubu ilaçlarda sorunlara yol açtığı bildirilmiştir (13). Öte yandan azol türevleri için söz konusu olan kısmi inhibisyon ("trailing effect") durumu da sonuçların değerlendirilmesinde güçlük yaratan bir diğer noktadır (2,3).

Çalışmamız, *Candida albicans* suşlarının mikrodilüsyon yöntemi ile azol türevlerine duyarlılıklarının saptanmasında objektif bir değerlendirme sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Candida suşları:** Çalışmamızda 1998-1999 yılları arasında laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden (34'ü idrar, 26'sı ağız-boğaz, 18'i vajinal-endoservikal sürüntü, 10'u balgam, 9'u kan-kateter, 4'ü cerahat, 1'i safra, 1'i ise parasentez sıvısından) soyutlanan 103 *Candida albicans* suşu alınmış, kontrol suşu olarak *C.albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır.

**Antifungal duyarlılık testleri ve sonuçların değerlendirilmesi:** Suşların flukonazol (Pfizer) ve ketokonazol (İlsan-İltaş) duyarlılıkları NCCLS M27-A kriterlerine uyularak mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir (5). Kullanılan flukonazol ve ketokonazol konsantrasyon aralıkları sırasıyla 0.125-64 µg/ml ve 0.03-32 µg/ml şeklinde idi. Çalkalama işlemi uygulanmadan önce sonuçlar, öncelikle gözle NCCLS standardına uygun şekilde MİK-2 değeri kriter alınarak değerlendirilmiştir. Sonra mikropalak okuyucusunda (Sorin Biomedica Eti-System) 492 nm dalga boyunda optik dansite ölçülüp, +1 (kontrole göre >0 - % 25'lik üreme) ve % 50 inhibisyon sağlayan nokta kriter alınarak MİK değerleri saptanmıştır (2). Mikroplaklara 5 dakikalık çalkalama işlemi uygulanmış, daha sonra yine gözle MİK-2 kriter alınarak değerlendirilmiştir. Ayrıca aynı dalga boyunda optik dansite de ölçülüp, % 50 inhibisyon sağlayan nokta MİK değeri olarak kabul edilmiştir (2,9). Çalkalama öncesi ve sonrasında belirlenen gözle değerlendirme ve optik dansite MİK sonuçları karşılaştırılmış, MİK değerlerinde ± 2 dilüsyon farklılık kriter alınarak, % tutarlılık (uyum) saptanmıştır.

## BULGULAR

Çalıştığımız suşların flukonazol için saptanan MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla 1 ve 8 µg/ml'dir. Bu değerler ketokonazol için ise 0.03 ve 0.12 µg/ml olarak belirlenmiştir. Gözle ve optik okuyucudaki değerlendirmelerin sonuçlarında % tutarlılık oranları Tabloda özetlenmiştir.

Tablo. Gözle ve optik okuyucudaki değerlendirmelerin sonuçlarında tutarlılık oranları.

Çalkalama işlemi yapılmadan önceki tutarlılık				Çalkalama işlemi yapıldıktan sonraki tutarlılık	
Flukonazol için		Ketokonazol için		Flukonazol için	Ketokonazol için
+1 kriterine göre	% 50 inhibisyon kriterine göre	+1 kriterine göre	% 50 inhibisyon kriterine göre	% 50 inhibisyon göre	% 50 inhibisyon kriterine göre
% 92	% 99	% 88	% 99	% 98	% 94

Çalkalama işleminin etkisinin değerlendirildiği durumda çalkalama öncesi ve sonrasında değerler karşılaştırıldığında; gözle okumadaki tutarlılıklar flukonazol için % 97, ketokonazol için ise % 94 olarak saptanmıştır. Optik okuyucu ile okumadaki tutarlılıklar +1 kriterine göre flukonazol için % 92, ketokonazol için % 94; % 50 inhibisyon kriterine göre flukonazol ve ketokonazol için aynı oranlarda, % 95 olarak belirlenmiştir.

### TARTIŞMA

Geçtiğimiz yıllar içinde antifungal duyarlılık testleri ile ilgili standardizasyon çalışmaları hızlanmıştır. Bunun yanında mikrodilüsyon yönteminin değerlendirilmesinde özellikle azoller için sorunlar ile karşılaşıldığı bildirilmektedir (13). Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemini daha standart ve objektif hale getirebilmek için gözle değerlendirmeye alternatif olarak optik dansite okuma yöntemi ve çalkalama işlemi uygulanmıştır.

Araştırmamızda, optik dansite okunarak saptanan sonuçların, gözle değerlendirme bulguları ile uyumunun çok iyi olduğu gözlenmiştir. Rodríguez-Tudela ve arkadaşları (13) da azollerde gözlenen tekrarlanabilirlik ile ilgili sorunu MİK değerlerinin gözle okunmasına bağlayarak, mikroplakların otomatik olarak optik dansitelerinin okunmasına uygun olduğunu belirtmiştir. Spektrofotometrik yöntemlerle yapılan çeşitli çalışmalarda, referans makrodilüsyon yöntemi ile amfoterisin B ve flukonazol için % 98-100'lik bir korelasyon saptanmıştır (6,12). Bizim bulgularımız, bu sonuçlar ile paralel doğrultudadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, spektrofotometrik değerlendirmenin, objektif olması yanında, otomatize olabileceği ve hızlı tarama işlemine olanak sağlaması nedenleri ile gözle okumaya alternatif olabileceği ve bu açıdan yoğun laboratuvarlarda yeğlenebileceği bildirmiştir (2,9). Öte yandan bu yöntemin objektif ve hızlı MİK sonucunun belirlenmesine olanak sağlaması yanında minimal üreme veya kısmi inhibisyona bağlı subjektif değerlendirmeleri de elimine ettiği saptanmıştır (4,10). Mikrodilüsyon yönteminde azoller için hemen her Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunabilen enzim immün assay plak okuyucusu kullanılarak, standart yöntem ile uyumlu, deneyim gerektirmeyen, kolay ve objektif bir değerlendirme yapılabileceği görüşüne varılmıştır.

Çalışmamızda, uyguladığımız optik dansite ile sonuçların okunmasından sonra MİK belirlenmesinde kullanılan % 50 inhibisyon kriteri birçok araştırmacı tarafından da önerilmiştir (2,14). Bunun yanında Rex ve arkadaşları (11) da spektrofotometrik yöntemlerde % 50 inhibisyon kriterine göre saptanan MİK sonuçlarının in vitro-in vivo korelasyonunun daha iyi olduğunu bildirmiştir.

Mikrodilüsyon sonuçlarının değerlendirilmesinde uyguladığımız bir diğer yöntem ise plakların okunmadan önce 5 dakika çalkalanmasıdır. Çalkalama işlemi öncesi ve sonrasında MİK sonuçları karşılaştırıldığında elde ettiğimiz % tutarlılıklar flukonazol ve ketoko-

nazol için sırasıyla gözle okumada % 94, % 97; optik okumada ise % 92 ile % 95 arasındadır. Pfaller ve arkadaşları (9) flukonazol ve itrakonazol için çalkalama öncesi ve sonrasındaki gözle değerlendirmeler arasında % 100; gözle ve çalkalama sonrası spektrofotometrik ölçüm arasında ise flukonazol için % 93, itrakonazol için ise % 89 oranlarında tutarlılık saptamıştır. Bizim flukonazol ve ketokonazol için elde ettiğimiz sonuçlar da aynı doğrultudadır. Ayrıca söz konusu çalışmada % tutarlılık için alınan kriter  $\pm 3$  dilüsyon olmasına karşın, bizim çalışmamızda kabul ettiğimiz kriter  $\pm 2$  dilüsyondur. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızda saptadığımız tutarlılık oranları daha yüksektir. Barchiesi ve arkadaşları (4) ile Price ve arkadaşları (10) da mikrodilüsyon yönteminde çalkalama işlemi sonrasındaki spektrofotometrik okuma ile elde ettikleri MİK değerlerinin NCCLS referans metod sonuçları ile mükemmel bir uyum gösterdiğini bildirmişlerdir. Anaissie ve arkadaşları (2) ise plakların 5 dakika çalkalandığı mikrodilüsyon yönteminin flukonazol duyarlılığının değerlendirilmesinde okuma zamanı, inkübasyon ısı, inokulum miktarı gibi değişkenlerden bağımsız olarak kesin, net ve tekrar edilebilir MİK sonuçları verdiğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda çalkalama işleminin, 24 saat inkübasyon sonucunda mikroorganizmanın kuyucuklarda oluşturduğu peleti, kuyucuklarda bulunan maya sayısına bağlı olarak, homojen ve bulanık süspansiyonlara dönüştürdüğü ve bu şekilde üremenin indirekt bir kantitasyonunun yapılabilirdiği belirtilmektedir (2,4,10). Bunun yanında mikrodilüsyon plaklarına okuma öncesi çalkalama işlemi uygulanmasının daha belirgin ve keskin sonuçta değerlendirmesine yol açtığı ve azollerin duyarlılık testlerindeki yorumu zorlaştıran kısmi inhibisyonu minimize ettiği bildirilmiştir (4,10,13). Bizim hem flukonazol, hem de ketokonazol için elde ettiğimiz gözlemlerimiz, flukonazol için saptanmış bu bulgulara paralel doğrultudadır.

Bunun yanında, Anaissie ve arkadaşları (3) yaptıkları bir başka çalışmada da, çalkalama işleminin uygulanmasının laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği ve uyumu; ayrıca değerlendirilebilir MİK sonuçları sayısını arttırdığı sonucuna ulaştıklarını belirtmektedir.

Sonuçlarımıza göre, azoller için mikrodilüsyon sonuçları değerlendirilirken çalkalama işleminin ve optik okuyucuda okumanın, referans yöntemin değerlendirilmesi ile uyumlu olduğu; bunun yanında da daha net, kolay ve objektif bir değerlendirme sağladığı düşüncesine varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Anaissie EJ: Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review, *Clin Infect Dis* 14:43 (1992).
- 2- Anaissie EJ, Paetznick VL, Bodey GP: Fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*: microtiter method that is independent of inoculum size, temperature, and time of reading, *Antimicrob Agents Chemother* 35:1641 (1991).
- 3- Anaissie EJ, Paetznick VL, Ensign LG, et al: Microdilution antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with and without agitation: an eight-center collaborative study, *Antimicrob Agents Chemother* 40:2387 (1996).
- 4- Barchiesi F, Del Poeta M, Morbiducci V, Ancarani F, Scalise G: Turbidimetric and visual criteria for determining the in vitro activity of six antifungal agents against *Candida* spp and *Cryptococcus neoformans*, *Mycopathologia* 124:19 (1993).
- 5- Beck-Sague CM, Jarwis WR: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990, *J Infect Dis* 167:1247 (1993).

- 6- Espinel-Ingroff A, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV: Comparison of two alternative microdilution procedures with National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and susceptible isolates of *Candida albicans*, *J Clin Microbiol* 33:3154 (1995).
- 7- Georgopapadakou NH, Walsh TJ: Human mycoses: Drugs and targets for emerging pathogens, *Science* 264:371 (1994).
- 8- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27-A*, NCCLS, Villanova, Pa (1997).
- 9- Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S: Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870, *J Clin Microbiol* 33:1094 (1995).
- 10- Price MF, LaRocco MT, Gentry LO: Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period, *Antimicrob Agents Chemother* 38:1422 (1994).
- 11- Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ: 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).
- 12- Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R: Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2 % glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*, *Antimicrob Agents Chemother* 40:1998 (1996).
- 13- Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV: Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*, *Antimicrob Agents Chemother* 38:45 (1994).
- 14- Tornatore MA, Noskin GA, Hacek DM, Obias AA, Peterson LR: Effects of incubation time and buffer concentration on in vitro activities of antifungal agents against *Candida albicans*, *J Clin Microbiol* 35:1473 (1997).
- 15- Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy: Therapy of deep fungal infection in haematological malignancy, *J Antimicrob Chemother* 40:779 (1997).