

## HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN NON-ALBICANS CANDIDA VE CANDIDA DIŞI MAYA TÜRLERİNİN VORİKONAZOL VE FLUKONAZOLE İN-VİTRO DUYARLILIKLARI\*

Sema KEÇELİ ÖZCAN\*, Handan AĞIRBAŞLI\*\*, Şeyda ÇALIŞKAN\*, Ayşe WILLKE\*\*\*

\*Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KOCAELİ

\*\*Lösemili Çocuklar Vakfı, Çapa, İSTANBUL

\*\*\* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, KOCAELİ

### ÖZET

Son yıllarda özellikle hematolojik maligniteli olgulardan izole edilen non-albicans Candida (NAC) türlerinde artış olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada, hematolojik maligniteli olgulardan izole edilen NAC ve Candida dışı mayaların (CDM) flukonazol ve vorikonazole duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, Lösemili Çocuklar Vakfı Seroisi ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde yatmakta olan toplam 40 olgudan izole edilen 50 suş (43 NAC, 7 CDM) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mayaların identifikasyonu için API 20C AUX (bioMerieux, Fransa) kiti, duyarlılık çalışmaları için ise E test stripleri (AB Biodisk, Solna, İsveç) kullanılmıştır. Vorikonazol için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) aralığı 0.004 - > 32 µg/ml ve flukonazol MİK aralığı 0.023 - > 256 µg/ml olarak saptanmıştır. Bir *C.glabrata* ve bir *C.tropicalis* suşunda vorikonazol MİK değeri > 32 µg/ml saptanmış ve çok yüksek MİK değeri olarak yorumlanmıştır. Tüm mayalar içinde vorikonazol ve flukonazole yüksek MİK değeri veren suşların oranı sırasıyla % 4 ve % 22 olarak belirlenmiştir. Flukonazole dirençli mayaların (% 22) tümü NAC türlerinden oluşmaktadır. Flukonazol direnci saptanan 11 suş içinden sadece bir *C.glabrata* suşunda vorikonazole de yüksek MİK değeri bulunmuştur. Flukonazole göre vorikonazolün daha etkin bulunması nedeniyle, vorikonazolün, flukonazole dirençli olabilecek NAC ve CDM'lerin etken olduğu fungal enfeksiyonların tedavisinde tercih edilebileceği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Candida dışı mayalar, E-test, flukonazol, non-albicans Candida, vorikonazol

### SUMMARY

#### In-vitro Susceptibilities of non-albicans Candida and Yeasts other than Candida Species Isolated from Patients with Hematologic Malignancies to Fluconazole and Voriconazole

Recently, the overall increase in non-albicans Candida (NAC) species especially isolated from patients with hematologic malignancies was noticed. In this study, the investigation of the susceptibilities of NAC and yeasts other than Candida (YOC) species against fluconazole and voriconazole was aimed. A total of 50 yeast isolates (43 NAC and 7 YOC) isolated from 40 hospitalized patients with hematologic malignancies were included into the study. The isolated yeasts were identified using API 20C AUX (bioMerieux, France) system. In-vitro susceptibilities for fluconazole and voriconazole were determined with E test method (AB Biodisk Solna, Sweden). MIC ranges of voriconazole was 0.004 -> 32 µg/ml and of fluconazole was 0.023 -> 256 µg/ml. MIC values of voriconazole for one *C.glabrata* and one *C. tropicalis* isolates were determined as > 32 µg/ml and thus they were accepted as isolates with high MIC values. Amongst all yeast isolates, the rate of high MIC values to voriconazole and fluconazole was determined as 4 % and 22 %, respectively. High MIC value of fluconazole was observed among 11 Candida isolates. One of these isolates (*C.glabrata*) had also high MIC value for voriconazole. Since there is higher efficacy of voriconazole compared to fluconazole, it may be appropriate to prefer voriconazole in the treatment of fungal infections caused by NAC and YOC strains that could be resistant to fluconazole.

**Keywords:** E-test, fluconazole, non-albicans Candida, voriconazole, yeasts other than Candida

**Yazışma adresi:** Handan Ağırbaşı. Lösemili Çocuklar Vakfı, Çapa, İSTANBUL

Tel: (0212) 351 77 88, (0533) 269 14 15

e-posta: agirbaslihandan@hotmail.com

Alındığı tarih: 28.08.2007, revizyon kabulü: 09.11.2007

XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (12-16 Eylül 2006, Antalya)

## GİRİŞ

İnvaziv fungal infeksiyonlar immunsuprese hastalarda, HIV pozitif kişilerde, prematüre yenidoğanlarda en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir<sup>(1)</sup>. *Candida* türleri nozokomial kan dolaşımı infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında dördüncü sırada yer almaktadır<sup>(12)</sup>. Aynı zamanda, antifungallere nispeten dirençli non-*albicans Candida* (NAC) veya *Candida* dışı mayaların (CDM) (*Trichosporon*, *Saccharomyces* gibi) izolasyon oranlarında da artış saptanmaktadır. Bu nedenle, hastane kökenli mayalarda özellikle azollerin antifungal etkinlik paternlerinde değişiklik gözlenmektedir<sup>(12)</sup>.

Vorikonazol yeni bir azol türevi olup etki mekanizması ergosterol sentezinde önemli bir basamak olan 14 $\alpha$ -lanesterol demetilasyonuna bağımlı olan sitokrom P450'nin inhibisyonu ile gerçekleşmektedir<sup>(10)</sup>. Vorikonazolün oral ve intravenöz formlarının benzer farmakokinetik özellikleri nedeni ile oral formülasyonun kullanılabilirliği, hastanede kalış süresini kısaltmaktadır. Ayrıca, yıllardır antifungal tedavinin altın standardı olan amfoterisin B'ye göre daha düşük nefrotoksisite ve infüzyonla ilişkili toksisiteye sahiptir. *Candida albicans* ve *Candida krusei* ile yapılan çalışmalarda ergosterol sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği için flukonazolden çok daha etkin olduğu bildirilmiştir<sup>(13)</sup>.

Son yıllarda, NAC ve CDM'ların daha çok görülmeye başlanması ile invaziv fungal infeksiyonların etken spektrumunda görülen farklılığın yanısıra saptanan antifungal direnç artışı, klinisyenin uygun tedavi seçimine yardımcı olacak laboratuvar verilerinin güncellenmesi gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu çalışmanın amacı, hematolojik maligniteli hastalardan izole edilen NAC ve CDM'ların flukonazol ve yeni bir antifungal ajan olan vorikonazole duyarlılıklarını araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 1998-2003 yılları arasında Lösemili Çocuklar Vakfı Servis ve Kemik İliği Nakil Ünitesi'nde yatmakta olan 40 (24 erkek, 16 kız)

hastadan izole edilen toplam 50 izolat (NAC ve CDM; *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides* ve *Saccharomyces cerevisiae*) alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması 8 (1-17) idi. Hastaların altta yatan hastalıkları; 14 akut miyeloid lösemi, 12 akut lenfoblastik lösemi, beş Fanconi aplastik anemisi, iki trombosit fonksiyon bozukluğu, birer kronik miyeloid lösemi, Talassemia major, lenfoma, Hodgkin lenfoma, nöroblastom, adrenokortikal karsinom, megakaryositik trombositopeni idi. Bu hastaların 10'u allojenik, beşi otoplog kemik iliği nakli, biri de allojenik periferik kök hücre nakli yapılmış hastalardı ve flukonazol profilaksisi almışlardı.

Suşlar standart yöntemler ile izole edilmiştir. Tür düzeyinde tanımlama API 20C AUX (bioMerieux, Fransa) kiti ile saptanmış, ayrıca asimilasyon profilleri ve mısır unlu Tween 80 besiyerindeki morfolojik görünümleri değerlendirilmiştir. İn-vitro flukonazol ve vorikonazol duyarlılığı E test yöntemi (AB Biodisk, Solna, İsveç) ile belirlenmiştir. E test için % 2 glukoz içeren RPMI 1640 (Angus, İtalya) besiyeri kullanılmış ve sonuçlar üretici firmanın önerilerine göre belirlenmiştir. MİK değerleri inkübasyon süresi (24-48 saat) sonunda değerlendirilmiştir. *Candida* türleri için standart antifungal duyarlılık testi olarak kabul edilen "mikrobroth" dilüsyon yönteminde CLSI ile belirlenmiş MİK sınır değerleri kullanılmıştır<sup>(4)</sup>. Buna göre flukonazole duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli olan izolatların MİK değerleri sırasıyla  $\leq 8$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 16-32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ve  $\geq 64$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; vorikonazole duyarlı, doza bağımlı duyarlı ve dirençli izolatların MİK değerleri ise sırasıyla  $\leq 1$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ve  $\geq 4$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  olarak kabul edilmektedir<sup>(4)</sup>. E test yönteminin standart mikrobroth dilüsyon yöntemi ile uyumlu olduğu düşünülerek verilen MİK sınır değerleri *Candida* türleri için de geçerli kabul edilmektedir. Birçok klinik laboratuvar bu değerlere göre sonuç bildirmektedir<sup>(7)</sup>.

*Trichosporon*, *Saccharomyces* gibi CDM türleri için ise standart bir yöntem henüz saptanmamış ve MİK sınır değerleri belirlenmemiştir. Bu nedenle, bu çalışmada CDM türleri için elde edilen MİK değerleri düşük veya yüksek değerler olarak yorumlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan maya izolatlarının 29'u dışkı, dokuzu kan, sekizi boğaz sürüntüsü, ikisi balgam ve ikisi vajinal salgıdan izole edilmiştir. İzole edilen mayaların 15'i *Candida glabrata*, 12'si *C.krusei*, yedisi *Candida kefyır*, dördü *S.cerevisiae*, üçü *Candida tropicalis*, ikisi *Candida norvegensis*, ikisi *T.asahii* ve bireri *Candida utilis*, *Candida zeylanoides*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* ve *T.mucoides* olarak tanımlanmıştır. Suşlar ve izole edildikleri muayene maddeleri tablo 1'de bildirilmiştir. Vorikonazol ve flukonazol ile elde edilen MİK değerleri tablo 2'de özetlenmiştir. Sadece iki maya izolatında (bir *C.glabrata* ve bir *C.tropicalis*) vorikonazole direnç (MİK > 4 µg/ml) saptanmıştır. Bir *C.glabrata* ve bir *S.cerevisiae* izolatında ise vorikonazol MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmıştır. *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.kefyır* için vorikonazol MİK<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1 µg/ml, 0.38 µg/ml ve 0.016 µg/ml olarak bulunmuştur. Vorikonazol için ≥ 4 µg/ml ve flukonazol için ≥ 64 µg/ml MİK değerleri dirençli olarak kabul edildiğinde tüm *Candida*'lar (n=43) içindeki dirençli suşlar vorikonazol için % 4.7 ve flukonazol için % 25.6 olarak belirlenmiştir. Flukonazole dirençli mayaların tümü *Candida* cinsi ve NAC türlerinden oluşmaktadır. Bu yüzden tüm mayaları dikkate aldığımızda direnç daha düşük olup % 22 olarak saptanmıştır. Flukonazole ≥ 64 µg/ml MİK değeri saptanan 11 suşun (beş *C.glabrata*, dört *C.krusei*, bir *C.zeylanoides*, bir *C.guilliermondii*) sadece birinde (*C.glabrata*) vorikonazol MİK değerinin de ≥ 4 µg/ml olduğu saptanmıştır (Tablo 3). 39 suşun

**Tablo 2:** 43 NAC ve 7 CDM suşunda saptanan flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri (µg/ml).

	MİK aralığı	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Flukonazol	0.023 - > 256	0.125	> 256
Vorikonazol	0.004 - > 32	0.25	1

**Tablo 3:** Flukonazol > 32 µg/ml ve vorikonazol > 4 µg/ml MİK değerine sahip izolat sayıları.

	Flukonazol	Vorikonazol
<i>C.glabrata</i> (15)	5	1
<i>C.krusei</i> (12)	4	0
<i>C.guilliermondii</i> (1)	1	0
<i>C.zeylanoides</i> (1)	1	0
<i>C.tropicalis</i> (1)	0	1

flukonazol MİK değerleri ise < 8 µg/ml olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Hematolojik maligniteli hastalardan izole edilen NAC ve CDM türlerinin neden olduğu invaziv fungal infeksiyonlar artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, hematolojik malignitesi olan hastalarda gelişen kandidemilerin % 64'ünde NAC'ların etken olduğu saptanmıştır<sup>(6)</sup>. Başka bir çalışmada, bu tür hastalardan izole edilen *C.glabrata* ve *C.krusei* suşlarında flukonazol duyarlılığının azaldığı belirlenmiştir<sup>(15)</sup>. Çalışmamızda, NAC türlerinden en fazla 15 *C.glabrata* ve 12 *C.krusei* ile CDM cinsi olarak üç *Trichosporon* ve dört *Saccharomyces* suşu ile çalışılmıştır. Bu suşların flukonazol ve vorikonazol duyarlılığı saptanarak sonuçların karşılaştırılması plan-

**Tablo 1:** Suşların izole edildiği muayene maddeleri.

	Dışkı	Kan	Boğaz sal.	Balgam	Vagina sal.	Toplam
<i>C.glabrata</i>	12	3	1	1	1	15
<i>C.krusei</i>	4	6	4		1	12
<i>C.kefyır</i>			1			7
<i>C.tropicalis</i>	3					3
<i>C.guilliermondii</i>	1					1
<i>C.zeylanoides</i>	1					1
<i>C.famata</i>	1					1
<i>C.norvegensis</i>	1		1			2
<i>C.utilis</i>	1					1
<i>S.cerevisiae</i>	4					4
<i>T.asahii</i>			1	1		2
<i>T.mucoides</i>	1					1
Toplam	29	9	8	2	2	50

lanmıştır.

İmmüsuprese ve kemik iliği nakli yapılmış hastalarda bir *Candida* türünün çeşitli vücut bölgelerinde üremesi ile *C.krusei* ve *C.glabrata* kolonizasyonlarında survi kötüdür<sup>(11)</sup>. Hematojen kandidiyazis olgularının çoğu endojen konak florasından kaynaklanmaktadır<sup>(2,8)</sup>. Kemoterapiden kaynaklanan mukozal hasar sonunda barsak kolonizasyonları invaziv hale gelmektedir<sup>(8)</sup>. Hasta grubumuzda kolonizasyonlar bu nedenle çok önemsenmektedir. Ayrıca fungal etkenleri üretmede hemokültür hassasiyetinin çok düşük olduğu düşünülürse febril nötropenik olup nedeni bilinmeyen ateş tedavisi gören birçok hastada elimizdeki tek bulgu kolonizasyonlar olabilmekte ve bu bilgi tedaviyi yönlendirmektedir. Bu amaçla da özellikle kemik iliği nakil ünitesinde yatmakta olan hastalardan haftalık surveyans kültürleri almaktayız.

İnfeksiyon bulguları olmayan hastalarda kolonizasyonlar için duyarlılık çalışmaları yapılmazken retrospektif olarak yapılmış bu çalışmada amacımız yeni kullanıma giren vorikonazolün elimizde bulunan eski suşlarımıza etkinliğinin araştırılması ve bu bilgi ile; identifikasyon sonucuna göre ampirik tedavide uygun seçimi yapabilecek bir bilgi oluşturmak ve zaman kazanabilmektir.

Azol grubunun yeni bir üyesi olan vorikonazolün etkinliğini saptamaya yönelik bir çalışmada vorikonazol, içlerinde *C.glabrata* ve *C.krusei*'nin de bulunduğu *Candida* suşlarına karşı flukonazolden 4-16, itrakonazolden 2-8 kat daha etkili bulunmuştur<sup>(3)</sup>. Yine *C.krusei*'nin de dahil olduğu toplam 209 *Candida* suşuna karşı vorikonazol oldukça etkin bulunmuş olup, MİK değerleri yüksek bulunan bazı izolatların diğer antifungallere karşı da yüksek MİK değerlerine sahip suşlar oldukları belirlenmiştir<sup>(9)</sup>. Klinik materyelden izole edilen 250 maya izolatına karşı flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B'nin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada vorikonazolün, *Candida* ve *Trichosporon* türlerine karşı en etkili antifungal ajan olduğu belirlenmiştir<sup>(16)</sup>. Bu çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda, vorikonazolün flukonazole göre daha etkin olduğu ve daha düşük MİK<sub>90</sub> değerine ( $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) sahip olduğu sap-

tanmıştır. Bir *C. glabrata* suşunda ise hem flukonazol hem de vorikonazole karşı yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Vorikonazol ile ilgili bir derlemede *C.glabrata*'nın vorikonazole azalmış duyarlılığından söz edilmektedir<sup>(5)</sup>. Vorikonazolün geniş etki spektrumunda *Trichosporon* türleri de bulunmaktadır ve *Trichosporon* infeksiyonlarının tedavisinde en etkili antifungal ajan olarak gösterilmiştir<sup>(10,14)</sup>. Çalışmamızda izole edilen iki *T.asahii* suşu ve bir *T.mucooides* suşu vorikonazole duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, NAC ve CDM türlerinin in vitro antifungal duyarlılık testlerinde vorikonazol gibi yeni kullanıma giren antifungallere karşı düşük MİK değerleri elde edilirken, flukonazol için türlere göre değişen yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Buna göre, özellikle immün sistemi baskılanmış hematolojik maligniteli hastalarda gelişen kandidemilerde tedavinin antifungal duyarlılık deneyi sonuçlarına göre planlanması gereği önem kazanmıştır. Duyarlılık testinin yapılamadığı veya testin henüz sonuçlanmadığı durumlarda maya türlerinin vorikonazole karşı düşük MİK değerlerine sahip oldukları, buna karşılık flukonazole direnç olasılıklarının yüksek olduğu bilgisinin göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Abuhammour W, Habte-Gaber E: Newer antifungal agents, Indian J Pediatr 2004;71(3):253-9.
2. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU: Epidemiology of Candida colonization in an intensive care unit of a teaching hospital in Kuwait, Med Mycol 2003;41(6):487-93.
3. Clancy CJ, Yu CY, Nguyen MH: In vitro activity of voriconazole against yeasts and comparison with fluconazole, Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington (1997).
4. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard, CLSI Document M27 A2, 2nd ed., CLSI, Wayne, PA (2002).
5. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ: In vitro activities of voriconazole and reference agents determined by NCCLS methods: review of the lite-

- ature, *Mycopathologia* 2001;150(3):101-15.
6. Giamarellou H, Antoniadou A: Epidemiology, diagnosis and therapy of fungal infections in surgery, *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;17:558-60.
  7. Koç AN, Gökahmetoglu S, Oğuzkaya M: Comparison of E-test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals, *Mycoses* 2000;43(7-8):294-7.
  8. Kullberg BJ, Oude Lashof BM: Epidemiology of opportunistic invasive mycoses, *Eur J Med Res* 2002;7(5):183-91.
  9. Lozano-Chiu M, Arıkan S, Paetznick V, Anaissie EJ, Rex JH: Optimizing voriconazole susceptibility test of *Candida*: Effects of incubation time, end point rule, species of *Candida*, and level of fluconazole susceptibility, *J Clin Microbiol* 1999;37(9):2755-9.
  10. Naithani R, Kumar R: Voriconazole, *Indian Pediatr* 2005;42(12):1207-12.
  11. Safdar A, Armstrong D: Prospective evaluation of *Candida* species colonization hospitalized cancer patients: impact on short term survival in recipients of marrow transplantation and patients with hematologic malignancies, *Bone Marrow Transplant* 2002;30(12): 931-5.
  12. Samra Z, Bishara J, Ashkenazi S et al: Changing distribution of *Candida* species isolated from sterile and non-sterile sites in Israel, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(7):542-5.
  13. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M: A new triazole, voriconazole (UK-109,496) blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2492-6.
  14. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM: Current emerging azole antifungal agents, *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):40-79.
  15. Singh N: Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications, *Clin Microbiol Infect* 2001;7(Suppl 2):1-7.
  16. Uzun O, Arıkan S, Kocagöz S, Sancak B, Ünal S: Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University hospital and effect of time of reading, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38(2):101-7.