

MAYA SUŞLARININ ANTİFUNGAL MADDELERE DUYARLIĞI

Meltem UZUN, Gülşen AKTAN

ÖZET

Çeşitli klinik örneklerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida* (n=52), *Torulopsis* ve *Trichosporon* (n=28) cinslerine ait olmak üzere toplam 80 maya suşunun antifungal maddelere duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri saptanarak araştırılmıştır.

Suşların % 50 veya daha fazlasına karşı yüksek MİK değeri saptanan antifungal maddeler *Candida spp.* için bifonazol, ketokonazol, nistatin, oksikonazol, pimarisin ve tolnaftat; diğer maya cinsleri için bifonazol, isokonazol, ketokonazol, nistatin, oksikonazol ve tolnaftat olarak belirlenmiştir.

SUMMARY

Susceptibility of yeast strains to antifungal agents.

Susceptibility of 80 yeast strains (*Candida spp.* n=52, *Torulopsis spp.* and *Trichosporon spp.* n=28) isolated from various clinical specimens as infection agents to antifungal agents were investigated by microdilution method where MIC values were determined.

The antifungal agents with high MIC values were determined as bifonazole, ketoconazole, nystatin, oxiconazole, pimarinin and tolnaftate with *Candida spp.*, and bifonazole, isoconazole, ketoconazole, nystatin, oxiconazole and tolnaftate with the other yeast species.

GİRİŞ

Son yıllarda çeşitli hazırlayıcı faktörler nedeni ile fırsatçı mantar infeksiyonları daha sık olarak ortaya çıkmakta, izolasyon ve idantifikasyon yöntemlerinin geliştirilmesine bağlı olarak tanısı kolaylıkla yapılabilmektedir. Çoğunlukla sistemik infeksiyonlar şeklinde ortaya çıkan fırsatçı mantar infeksiyonlarının tedavisi de bu artışa bağlı olarak daha sık gündeme gelmekte, kullanılan antifungal maddelere karşı direnç oluşabilmekte ve yeni antifungallere gereksinim duyulmaktadır (3, 4, 6, 9, 10, 13, 16, 18).

Yukarıda belirtilen nedenlere bağlı olarak infeksiyon etkeni olan mantar suşlarının antifungal maddelere duyarlılığını ortaya çıkarmayı amaçlayan deneyler daha sık olarak uygulanmaktadır. Antifungal maddelerin in-vitro ve in-vivo etkinliklerinin belirlenmesi, deney koşullarında standardizasyon sorunu, mantar hastalıklarının tanısındaki güçlükler, tedaviye yanıtın çok kolay olarak belirlenememesi ve tedaviye bağlı olarak sekonder direnç gelişmesi nedenleriyle

her zaman kolaylıkla yapılamamaktadır. Standardizasyon sorununu ortadan kaldırmak amacıyla yoğun çalışmalar yürütülmesine rağmen henüz tam olarak başarı sağlanamamıştır. Laboratuvarların genel kurallar içinde kendi standart koşullarını oluşturmaları önerilmektedir. Çeşitli merkezlerden alınacak sonuçlar ve öneriler doğrultusunda standardizasyon sorunu ortadan kalkmış olacaktır (2, 5, 8, 10, 17, 19, 20, 22).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kan, idrar, balgam, boğaz salgısı, vagina salgısı ve cerahatten infeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen *Candida spp.* (n=52) ve diğer maya suşlarının (*Torulopsis spp.*, *Trichosporon spp.*) (n=28) çeşitli antifungal maddelere duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır.

Yöntemin uygunluğunun kontrol edilmesi amacıyla *C.albicans* ATCC 10231, *C.tropicalis* CBS 94 ve *T.glabrata* LSHTM 3240 standart suşları ile ön deneyler yapılmış ve uygun sonuçlar alındıktan sonra çalışmaya başlanmıştır.

Maya suşlarının hazırlanması:

Glikozlu Sabouraud besiyerinde üretilen 24 saatlik kültürlerle çalışılmış, suşların bulanıklık ayarının yapılmasında spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu işlem için suşların % 0.85 tuzlu suda süspansiyonu yapıldıktan sonra 530 nm'de % 95 transmittans değeri elde edilmiştir.

Antifungal maddelerin hazırlanması:

Antifungal maddelerin DMSO'de 400 µg/ml'lik stok solüsyonları hazırlanmış, deney uygulanacağında bu stok solüsyondan 1/1 oranında steril damıtık su ile sulandırım yapılarak konsantrasyon 200 µg/ml'ye düşürülmüştür.

Deneyde tüm antifungal maddeler için 50-0.04 µg/ml arasında 11 dilüsyon kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon deneyinin uygulanması:

Deneyin bundan sonraki aşamaları steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

Steril, 96 çukurlu U tipi mikroplyetlerin ve besiyeri olarak Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco)'in kullanıldığı deneyde toplam 210 µl'lik besiyeri+antifungal madde+maya süspansiyonu ile çalışılmıştır. Başlangıçta 200 µg/ml'lik antifungal madde konsantrasyonu 50 µg/ml'ye düşürülmüş ve bu işlem için seri dilüsyon uygulanmıştır (Deneye 10 µl halinde ilave edilen maya süspansiyonunun konsantrasyon saptanmasında ihmal edilebilir bir miktar olduğu çeşitli yayınlarda belirtilmektedir).

Deney tamamlandıktan sonra mikroplyetlerin yüzeyine steril cam plaklar yerleştirilmiş ve hava almamaları için selofan band ile kapatılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübe edilen mikroplyetlerde üremenin gözle görülmeyeceği en küçük dilüsyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (1, 2, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Antifungal maddeler ile elde edilen MİK veya MFK değerleri ile bu maddelerin vücut düzeyleri karşılaştırılarak breakpoint değerleri elde edilir. Tüm antifungal maddeler için breakpoint değerleri henüz saptanamamıştır. Maya infeksiyonlarında kullanılabilecek breakpoint değerleri 5-fluorositozin, amfoterisin B ve mikonazol için saptanmış olup 5-12.5 µg/ml arasında değişmektedir (12, 13, 20, 21).

Antifungal maddeler için belirlenmiş olan bu breakpoint değerleri gözönüne alınarak çalışmamızda elde edilen MİK değerleri ≤ 6.25 ve ≥ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde iki grup içinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan maya suşları ile alınan MİK değerleri dirençli ve duyarlı olarak yorumlanabilecek iki grup içinde değerlendirilmiştir. Buna göre, suşların %50 veya daha fazlası için yüksek MİK değeri veren antifungal maddeler *Candida spp.* için bifonazol, ketokonazol, nistatin, oksikonazol, pimarisin ve tolnaftat; *Torulopsis spp.* ve *Trichosporon spp.* için bifonazol, ketokonazol, nistatin ve tolnaftat olarak belirlenmiştir (Tablo).

Tablo. Maya suşlarının antifungal maddelere duyarlılığı.

Antifungal madde	Candida spp. (n= 52)				Torulopsis spp.+Trichosporon spp. (n= 28)			
	≥ 12.5		≤ 6.25		≥ 12.5		≤ 6.25	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Bifonazol	32	62	20	38	20	71	8	29
İsokonazol	14	27	38	73	21	75	7	25
Ketokonazol	33	63	19	37	21	75	7	25
Klotrimazol	17	33	35	67	11	39	17	71
Mikonazol	15	29	37	71	5	18	23	72
Nistatin	42	81	10	19	22	79	6	21
Oksikonazol	36	69	16	31	14	50	14	50
Pimarisin	34	65	18	35	13	46	15	54
Sulkonazol	16	31	36	69	13	46	15	54
Tiyokonazol	13	25	39	75	12	43	16	77
Tolnaftat	50	96	2	4	25	89	3	11

TARTIŞMA

Antibiyotik duyarlık deneyi yöntemlerinde kaydedilen tüm gelişmelere karşın in-vitro deney sonuçlarına uyularak yapılan her tedavi protokolü mutlak başarı ile sonuçlanmamaktadır. Diğer deyişle antibiyotiklerin in-vitro ve in-vivo koşullarda mikroorganizmalara karşı etkisi tümüyle paralellik göstermemektedir. Bu durumun nedenleri, in-vitro koşullardaki standardizasyon güçlükleri ve tedavi uygulanan bireylere bağlı değişken faktörler olmak üzere iki yöndür.

İn-vitro koşullardaki standardizasyon güçlükleri antifungal maddelerle yapılan duyarlık deneylerinde çok daha büyük boyutlarda ortaya çıkmaktadır.

Buyyonda dilüsyon, agar dilüsyonu ve agar difüzyonu şeklinde uygulanabilen antifungal madde duyarlık deneylerinde ortaya çıkan güçlükler üç ana başlık altında toplanabilir:

1. Mantarlarla ilgili : Morfolojik değişkenlikler; yavaş üreme, çalışma riski, kontaminasyon.
2. Deneylerle ilgili : İnokulum yoğunluğu; besiyeri içeriği ve pH; inkübasyon süresi; inkübasyon ısısı, etkinliğin değerlendirilmesi.
3. İlaçla ilgili : Çözünürlük; kimyasal stabilite.

Yukarıda belirtilen faktörlerin antifungal maddelere duyarlık deneylerine etkisi konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle kullanılan besiyeri, pH ve inokulum yoğunluğunun etkisi konusunda yapılan araştırmalar çoğunlukta (8, 15, 18, 20, 21).

Kyle ve ark (14) SCH 39304 ve flukonazolün etkisini 10^2 , 10^3 , 10^4 ve 10^5 /ml'lik maya süspansiyonları ile araştırmışlardır. *C.albicans* C17 suşu için 10^4 /ml yoğunlukta $0.63 \mu\text{g/ml}$, 10^5 /ml yoğunlukta ise $40 \mu\text{g/ml}$ 'lik MİK değerleri elde etmişlerdir. Bir başka suş (*C.albicans* ATCC 64546) ile 10^4 /ml'lik süspansiyon ile $10 \mu\text{g/ml}$, 10^5 /ml'lik yoğunlukta ise $5 \mu\text{g/ml}$ 'lik MİK değeri bulmuşlardır. Flukonazol ile *C.albicans* C17'nin 10^4 /ml'lik süspansiyonu $0.5 \mu\text{g/ml}$, 10^5 /ml'lik süspansiyonu ise $>256 \mu\text{g/ml}$ MİK değeri vermiştir. Çalışmanın flukonazol ile elde edilen tüm sonuçları değerlendirildiğinde 10^2 - 10^5 /ml yoğunlukta süspansiyonlarla yapılan deney serilerinde 4->512 kat değişken MİK değerleri belirlenmiştir. SCH 39304'ün denendiği ortamların asiditesi yükseldikçe maya suşlarının duyarlılığının azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada besiyeri içeriği, tampon sıvı ve inkübasyon ısı farklılıklarında MİK sonuçları incelenmiş ve 4-64 kat değişken değerler elde edilmiştir. 30°C , 35°C , 37°C 'lerde yürütülen deney sonuçlarının ise iki kat değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (14).

Galgiani (8)'nin yayınladığı bir çalışmada, Calhoun ve arkadaşlarının bir *Candida albicans* suşunu yedi ayrı laboratuvara dağıttığı belirtilmiş ve bu çalışmada amfoterisin B ve flusitozinin bu suşa etkinliği günde iki kez tekrarlar şeklinde birkaç gün üst üste ve belirli periyodlarla denetlenmiştir. Laboratuvarlardan farklı saat ve günlerde alınan MİK sonuçları kendi içinde karşılaştırıldığında % 95 uyumluluk saptanmıştır. Ancak laboratuvarlar karşılaştırdığında önemli farklılıklar belirlenmiş, bu farklılığın amfoterisin B için 8-32 kat, flusitozin için 32-512 kat kadar olduğu saptanmıştır.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından 1982'de oluşturulan "Antifungal Duyarlık Deneyleri" alt komitesi yukarıdaki gibi değişken sonuç veren çalışmaları ve ayrıca in-vitro ve in-vivo etkinlik uyumsuzluklarını gözönünde bulundurarak aşağıdaki önerileri getirmiştir:

1. Henüz geniş anlamda standardizasyon sağlanmadığından şimdilik laboratuvarlar kendileri için bir standart oluşturmalı ve sonuçlar aynı şekilde değerlendirilmelidir.
2. Standart olmayan yöntemlerle elde edilen sonuçlar değerli kabul edilmemelidir.
3. MİK-ilaç farmakokinetiği ile hazırlanmış bir "terapötik indeks"e gereksinim vardır.
4. Sonuçlar yayınlanırken yorumlamayı kolaylaştırmak amacıyla gereç ve yöntem ayrıntılı olarak bildirilmelidir.
5. İlaç sulandırılmaları geniş bir yelpaze oluşturmalıdır.
6. Sonuçlar mümkün olduğunca deney hayvanı serileri ile birlikte değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada laboratuvarımızda izole edilen maya suşlarının antifungal maddelere duyarlılığının saptandığı ilk dönem sonuçları bildirilmiştir.

Laboratuvarımızda duyarlık çalışmaları sürdürülmektedir. Elde edilecek bulgular, önceki sonuçlarla karşılaştırılarak laboratuvar içi standardizasyonu konusunda aşama sağlanmış olacak, ayrıca bu sonuçlara göre yürütülecek klinik çalışmalarla in-vitro/in-vivo etkinlik konusunda yorum yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Aheram D G, McGlohm M S: Invitro susceptibilities of sucrose negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole and ketoconazole, *J Clin Microbiol* 19: 412 (1984).
2. Aktan G: Gebe olan ve olmayan kadınlarda maya infeksiyonlarının araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Tıp Fakültesi (1988).
3. Chandler F W, Kaplan W, Ajello L: *A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases*, 2.baskı, Wolf Medical Publ Ltd, Netherlands (1989).
4. *Clinical Laboratory International*, An Elsevier Librico Publication, 16-5, Brussels (1992).
5. Cook R A, McIntyre K A, Galgiani J N: Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro and microdilution broth susceptibility test results for yeasts, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1542 (1990).
6. Dick J D, Merz W G, Saral R: Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens, *Antimicrob Agents Chemother* 18: 158 (1980).
7. Espinel-Ingroff A, Kerkering T M: Spectrophotometric method of inoculum preparation for invitro susceptibility testing of filamentous fungi, *J Clin Microbiol* 29: 393 (1991).
8. Galgiani J N: Antifungal susceptibility tests, *Antimicrob Agents Chemother* 31: 1867 (1987).
9. Hay R J: Overview of the treatment of disseminated fungal infections, *J Antimicrob Chemother (Suppl B)* 28: 17 (1991).
10. Holt R J, Azmi A: Miconazole resistant *Candida*, *Lancet* 7: 50 (1978).
11. Huppert M, Harper G, Sun S H, Delanerolle V: Rapid methods for identification of yeasts, *J Clin Microbiol* 2: 21 (1975).
12. Kiraz M, Kasımoğlu Ö, Aktan G, Kaya D: Trichophyton mentagrophytes suşlarının antifungal maddelere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 8: 10 (1994).
13. Kwon Chung K J, Bennet J E: *Medical Mycology*, Lea-Febiger, Philadelphia-London (1992).
14. Kyle A, McIntyre KA, Galgiani J N: Invitro susceptibilities of yeasts to a new antifungal triazole: SCH 39304. Effects of test conditions and relation to in vivo efficacy, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1095 (1989).
15. McCabe W R, Treadwell TL: In vitro susceptibility tests: Correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients, "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2. baskı" kitabında s.925, Williams and Wilkins, Baltimore-London (1986).
16. Moore G S, Jaciow D M: *Mycology for the Clinical Laboratory*, 1. baskı, Reston Publ Co, Reston (1979).
17. Radetsky M, Wheeler R C, Roe M H, Tod J K: Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome, *J Clin Microbiol* 24: 600 (1986).

18. Rippon J W: *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*, 3. baskı, W B Saunders Co, Philadelphia-London (1988).
19. Sandven P: Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates, *Acta Odontol Scand* 48: 27 (1990).
20. Shadomy S: In-vitro and in-vivo evaluation of antifungal agents, *J Clin Microbiol* 8: 352 (1989).
21. Shadomy S, Pfaller A: Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility tests and quantitation in body fluids, "W J Hausler, K L Hermann, H D Isenberg, H J Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s. 1173, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
22. Tanio T, Ichise K, Nakajima T, Okuta J: In-vivo efficacy of SM 8668 (SCH 39304), a new oral triazole antifungal agent, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 980 (1990).