

MAYALARIN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASINDA “HIGH RESOLUTION” BESİYERİ KULLANILAN MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF MICRODILUTION METHOD USING HIGH RESOLUTION MEDIUM FOR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF YEASTS

M. Cem ERGON Mine YÜCESOY

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

Anahtar Sözcükler: Maya, antifungal duyarlılık testi, RPMI 1640, HR besiyeri

Keywords: Yeast, antifungal susceptibility testing, RPMI 1640, HR medium

Geliş: 18 Mayıs 2005

Kabul: 11 Temmuz 2005

ÖZET

Bu çalışma, maya mantarlarının antifungal duyarlılık testlerinde "high resolution" besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden soyutlanan toplam 194 maya kökeni (78 *Candida albicans*, 42 *C. glabrata*, 33 *C. tropicalis*, 18 *C. parapsilosis*, 11 *C. krusei*, üç *C. guilliermondii* ve dokuz *Trichosporon spp.*) alınmıştır. Kökenlerin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazole karşı duyarlılıkları MOPS ile tamponlanan RPMI 1640 ve fosfat tamponu ile tamponlanan "high resolution" besiyerlerinin kullanıldığı iki mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. İki farklı besiyeri ile belirlenen MİK değerleri ± 2 kat dilüsyon içerisinde ise uyumlu olarak kabul edilmiştir. Amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol MİK'leri için ± 2 dilüsyon içerisindeki MİK değerlerinin uyum oranları sırasıyla %84, %62 ve %81 olarak saptanmıştır. Amfoterisin B ve flukonazol duyarlılık kategorileri için ise uyum oranları %95 ve %70 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, mikrodilüsyon yönteminde "high resolution" besiyerinin *Candida* ve *Trichosporon* türlerinin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazole karşı duyarlılıklarının, özellikle kategorilerinin belirlenmesinde kullanılabileceği görüşüne varılmıştır.

SUMMARY

The current study was undertaken to evaluate the microdilution method using high resolution medium for the susceptibility testing of yeasts. A total of 194 yeast isolates (78 *Candida albicans*, 42 *C. glabrata*, 33 *C. tropicalis*, 18 *C. parapsilosis*, 11 *C. krusei*, three *C. guilliermondii* and nine *Trichosporon spp.*) that were recovered from various clinical specimens were included. The susceptibilities of the isolates against amphotericin B, fluconazole and ketoconazole were determined by microdilution methods using RPMI 1640 medium buffered with MOPS and high resolution medium buffered with phosphate buffer. Overall results of both methods were considered to be in agreement when the MIC values were within ± 2 fold dilutions. The agreement rates of MIC values of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole were 84%, 62% and 81%, respectively. The agreement rates for the susceptibility categories of amphotericin B and fluconazole were 95% and 70%. As a result, it is concluded that high resolution medium can be used in the microdilution method when determining the susceptibilities especially susceptibility categories of *Candida* and *Trichosporon* spp. against amphotericin B, fluconazole and ketoconazole.

GİRİŞ

Son yıllarda *Candida* türlerinin neden olduğu mantar enfeksiyonları artış göstermektedir. Maya türlerinin dağılı-

mında değişiklik gözlenmekte ve non-*albicans* türlerin oranı artmaktadır (1-3). Mantar enfeksiyonlarındaki bu artış, beraberinde antifungal ilaçların daha çok kullanımı

ve dirençli suşların ortaya çıkışını getirmiştir. Bu gerçekler göz önünde bulundurulduğunda; uygun ilaç seçimi, ilaçların klinik sonuçlarını değerlendirme, direnç oranlarını saptama ve yeni ilaçları inceleme gibi nedenlerle maya mantarlarının antifungal duyarlılık durumlarının araştırılması önem kazanmaktadır (4-6).

Mayaların antifungal duyarlılık testi için standart bir yöntem "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından yayınlanmıştır (7). Sonuçların gözle değerlendirilmesi ve kısmi inhibisyon ("trailing") etkisinin görülmesi nedeni ile azollerin minimal inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerinin tanımlanması sorunludur. Bu nedenle, standart bir yöntem bulunmasına rağmen, özellikle farklı besiyerleri ile araştırma yapılmasına gereklidir (5, 6). Bu çalışmanın amacı, maya mantarlarının antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde "high resolution" (HR) besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yönteminin değerlendirilmesi ve NCCLS'in önerdiği mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan ve 78 *Candida albicans*, 42 *C. glabrata*, 33 *C. tropicalis*, 18 *C. parapsilosis*, 11 *C. krusei*, üç *C. guilliermondii* ve dokuz *Trichosporon spp.*'den oluşan toplam 194 köken çalışmaya alındı. Flukonazole dirençli beş suş, Prof. Dr. Annette Fothergill'den ("The University of Texas Health Science Center", ABD) sağlandı. *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları, kalite kontrol amacıyla çalışmaya dahil edildi. Tür tanımlaması, çimlenme borusu oluşturma, mısır unlu (Oxoid, İngiltere) Tween 80 (Riedel-de Haen, Almanya) agardaki görünüm ve API 20C AUX otomatize sistemi (bio Mérieux, Fransa) kullanılarak gerçekleştirildi (8, 9).

Antifungal ilaçlar: Kökenlerin, amfoterisin B (Fluka, İsviçre), ketokonazol (Sigma, İngiltere) ve flukonazole (Mustafa Nevzat, Türkiye) duyarlılıkları araştırıldı. Amfoterisin B ve ketokonazol 0.03-16 µg/ml, flukonazole ise 0.125-64 µg/ml konsantrasyon aralığında kullanıldı.

Antifungal duyarlılık testi:

a. RPMI 1640 besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi, NCCLS M27-A2 standartlarına uygun olarak uygulandı (7). L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyerinin (Sigma, A.B.D.) pH'ı, 0.165 M morfolino-propan sulfonik asit (MOPS) (Sigma, A.B.D.) kullanılarak 7.0'ye ayarlandı. Sabouraud-dekstro-agar (SDA)'da 48 saatte üreyen kolonilerden RPMI 1640 besiyeri ile 0.5-2.5 x 10³ KOÜ/ml'lik inokulum hazırlandı. Son konsan-

trasyonun iki katı antifungal ilaç içeren mikrodilüsyon plaklarının uygun kuyucuklarına, 100'er µl maya süspansiyonundan aktarıldı. Mikrodilüsyon plakları 35°C'de 48 saat inkübe edildi (7).

b. HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi, Troke ve Pye (10) tarafından önerilen şekilde uygulandı. Bu amaçla, 29.34 g HR besiyeri (Oxoid, İngiltere) ve 20.0 g glikoz, 900 ml steril distile su içerisinde çözülde. İki gram asparajın, 100 ml steril distile su içerisinde çözülerek ilk çözeltiye eklendi. Filtre edilerek sterilize edilen karışımın pH'ı 0.2 M fosfat tampon ile 7.0'ye ayarlandı. SDA'daki 48 saatlik kolonilerden, HR besiyeri kullanılarak son inokulum 0.5-2.5 x 10³ KOÜ/ml olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı. Son konsantrasyonun iki katı antifungal ilaç içeren mikrodilüsyon plaklarının uygun kuyucuklarına, bu süspansiyonlardan 100'er µl aktarıldı (10). Referans yöntemde uygulandığı gibi mikrodilüsyon plakları 35°C'de 48 saat inkübe edildi.

Sonuçların değerlendirilmesi: Kökenlerin MİK değerleri amfoterisin B için gözle, azoller için ise göz ve spektrofotometrik olarak 24. ve 48. saatlerde belirlendi (7, 10). Özellikle *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* izolatları için 24. saatte yeterli üreme gözlenmemesi nedeniyle son değerlendirmede 48 saatlik veriler esas alındı. MİK değeri amfoterisin B için üremenin tamamen inhibe olduğu, azoller için ise üreme kontrolüne göre üremede belirgin azalmanın olduğu en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlendi (7). Azoller için 492 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik değerlendirmede üreme kontrolüne göre optik dansite (OD) değerinde %50 azalma sağlayan konsantrasyon MİK değeri olarak tanımlandı. Amfoterisin B için direnç sınırı ≥2 µg/ml olarak kabul edildi. MİK değeri ≥64 µg/ml olan izolatlar flukonazole dirençli, 16-32 µg/ml arasında olanlar ise doza bağımlı duyarlı (D-BD) olarak değerlendirildi (7).

İstatistiksel değerlendirme: İki farklı yöntem ile elde edilen MİK değerleri "windows SPSS 8.0" programı kullanılarak Pearson'ın korelasyon analizi ile karşılaştırıldı. Korelasyon değerinin düşük olması durumunda, iki grup sonuçları arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı, aynı program kullanılarak eşleştirilmiş gruplarda t testi ile araştırıldı. Her iki yöntem ile elde edilen MİK değerlerinin ±2 katı dilüsyon içerisinde bulunması durumunda sonuçlar uyumlu olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmadaki iki kalite kontrol suşu için iki farklı yöntem ile elde edilen MİK değerleri ±1 dilüsyon içerisindeydi (*C. albicans* ATCC 90028: amfoterisin B: 0.5 µg/ml ve 0.5

µg/ml; flukonazol: 0.25 µg/ml ve 0.25 µg/ml; ketokonazol: 0.25 µg/ml ve 0.25 µg/ml ve *C. krusei* ATCC 6258: amfoterisin B: 1 µg/ml ve 0.5 µg/ml; flukonazol: 32 µg/ml ve 32 µg/ml; ketokonazol: 0.5 µg/ml ve 0.25 µg/ml). Bu sonuçlar aynı zamanda NCCLS tarafından belirtilen limitler içerisindeydi.

Yüz doksan dört kökünde belirlenen MİK değeri aralığı amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol için RPMI 1640 besiyerinin kullanıldığı yöntemde sırasıyla, 0.06-4 µg/ml, 0.125-128 µg/ml, 0.015-8 µg/ml iken, HR besiyerinin kullanıldığı yöntemde 0.03-4 µg/ml, 0.06-128 µg/ml ve 0.015-16 µg/ml şeklindeydi. Antifungal ilaçların MİK

aralıkları ile izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Antifungal ilaçların MİK değerlerinin dağılımı ise Tablo 2'de yer almaktadır.

Kırk sekizinci saatte göz ile okuma sonucunda belirlenen değerlere göre, iki yöntem arasında en iyi uyum amfoterisin B için elde edildi. HR besiyeri ile sonuçların değerlendirilmesinde flukonazol MİK değerlerinin daha kolay okunabildiği gözlemlendi. Amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol için ±2 dilüsyon içerisindeki MİK değerlerinin uyum oranları sırasıyla %84, %62 ve %81 olarak saptandı (Tablo 3). *C. guilliermondii* dışındaki türlerin uyum oranları Tablo 4'te belirtilmekte olup, bu türden az

Tablo 1. İki farklı besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yönteminin göz ile değerlendirilmesinde maya türleri için elde edilen MİK sınırları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

Suşlar (n)	Antifungal ilaçlar	Besiyeri	Sınır (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
<i>C. albicans</i> (78)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.06-4	0.25	1
		HR	0.03-1	0.25	0.5
	Flukonazol	RPMI 1640	0.125-128	2	16
		HR	0.06-128	0.5	16
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.015-8	0.03	0.5
		HR	0.015-8	0.03	1
<i>C. glabrata</i> (42)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.06-1	0.5	1
		HR	0.125-2	0.5	1
	Flukonazol	RPMI 1640	4-128	8	64
		HR	0.5-128	8	64
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.06-8	0.5	4
		HR	0.03-16	1	8
<i>C. tropicalis</i> (33)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.125-1	0.5	1
		HR	0.03-2	0.25	1
	Flukonazol	RPMI 1640	0.5-128	4	32
		HR	0.125-32	1	8
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.03-2	0.03	0.5
		HR	0.015-1	0.03	0.5
<i>C. parapsilosis</i> (18)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.25-1	0.5	1
		HR	0.06-1	0.5	1
	Flukonazol	RPMI 1640	0.25-128	16	32
		HR	0.125-32	4	32
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.03-2	0.06	1
		HR	0.015-4	0.125	1
<i>C. krusei</i> (11)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.125-2	1	1
		HR	0.25-4	1	2
	Flukonazol	RPMI 1640	4-128	64	128
		HR	1-32	32	32
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.03-1	0.5	1
		HR	0.03-1	0.5	0.5
<i>C. guilliermondii</i> (3)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.25-1	-	-
		HR	0.25-0.5	-	-
	Flukonazol	RPMI 1640	8	-	-
		HR	1	-	-
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.03	-	-
		HR	0.03	-	-
<i>Trichosporon spp.</i> (9)	Amfoterisin B	RPMI 1640	0.125-1	0.5	0.5
		HR	0.03-0.5	0.25	0.5
	Flukonazol	RPMI 1640	1-128	2	8
		HR	0.25-32	1	32
	Ketokonazol	RPMI 1640	0.03-1	0.125	0.5
		HR	0.03-2	0.06	0.5

Tablo 2. Antifungal ilaçların çalışılan maya suşları için elde edilen MİK değerlerinin dağılımları

Antifungal ilaç	Besiyeri	MİK (µg/ml)													
		128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
Amfoterisin B	RPMI 1640	-	-	-	-	-	1	3	35	75	50	21	9	-	-
	HR besiyeri	-	-	-	-	-	1	4	34	62	46	26	7	14	-
Flukonazol	RPMI 1640	14	12	11	22	32	29	41	20	8	3	2	-	-	-
	HR besiyeri	7	1	22	21	17	24	15	26	18	19	23	1	-	-
Ketokonazol	RPMI 1640	-	-	-	-	5	3	7	20	29	19	12	18	78	3
	HR besiyeri	-	-	-	1	6	6	9	21	29	15	10	5	65	27

Tablo 3. Mikrodilüsyon yöntemlerinin antifungal ilaçlar için elde edilen uyum oranları

Antifungal ilaç	Yöntem	% Uyum ^a	% Uyum ^b
Amfoterisin B	RPMI göz ile/HR göz ile	84	95
Flukonazol	RPMI göz ile /HR göz ile	62	70
	RPMI göz ile /HR spektrofotometrik	51	67
	RPMI spektrofotometrik /HR göz ile	52	58
	RPMI spektrofotometrik /HR spektrofotometrik	50	57
Ketokonazol	RPMI göz ile /HR göz ile	81	-
	RPMI göz ile /HR spektrofotometrik	78	-
	RPMI spektrofotometrik /HR göz ile	73	-
	RPMI spektrofotometrik /HR spektrofotometrik	70	-

^a ±2 kat dilüsyon içerisindeki uyum oranları^b Duyarlılık kategorilerine göre uyum oranları**Tablo 4.** HR ve RPMI 1640 besiyerleri ile 48. saatte göz ve spektrofotometrik değerlendirmede elde edilen sonuçların yüzde uyumları

İzolatlar (n)	Antifungal ilaç	Göz ile		Spektrofotometrik	
		% Uyum ^a	% Uyum ^b	% Uyum ^a	% Uyum ^b
<i>C. albicans</i> (78)	Amfoterisin B	78	96	-	-
	Flukonazol	47	82	54	81
	Ketokonazol	81	-	77	-
<i>C. glabrata</i> (42)	Amfoterisin B	88	98	-	-
	Flukonazol	88	60	43	33
	Ketokonazol	83	-	60	-
<i>C. tropicalis</i> (33)	Amfoterisin B	79	97	-	-
	Flukonazol	70	82	46	61
	Ketokonazol	79	-	67	-
<i>C. parapsilosis</i> (18)	Amfoterisin B	100	100	-	-
	Flukonazol	61	61	56	39
	Ketokonazol	67	-	56	-
<i>C. krusei</i> (11)	Amfoterisin B	91	64	-	-
	Flukonazol	82	9	73	9
	Ketokonazol	91	-	91	-
<i>Trichosporon spp.</i> (9)	Amfoterisin B	89	100	-	-
	Flukonazol	44	56	33	56
	Ketokonazol	100	-	67	-

^a ±2 katı dilüsyon içerisindeki uyum oranları^b Duyarlılık kategorilerine göre uyum oranları

sayıda suş bulunması nedeniyle uyum oranları hesaplanmadı. Amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol için elde edilen MİK sonuçlarının korelasyon değerleri sırasıyla $r=0.03$, $p=0.66$; $r=0.59$, $p=0.000$; $r=0.75$, $p=0.000$ olarak belirlendi. İki farklı besiyeri kullanılarak elde edilen amfoterisin B MİK değerleri, eşleştirilmiş gruplarda t testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı ($t=0.65$, $p=0.52$). Dolayısı ile amfoterisin B MİK değerleri arasında korelasyonun düşük olmasına karşın, değerlerin istatistiksel açıdan önemli oranda bir farklılık göstermediği saptandı.

Kırk sekizinci saatte elde edilen OD değerlerine göre, ± 2 dilüsyon içerisindeki MİK sonuçlarının uyum oranları flukonazol için %50, ketokonazol için ise %70 olarak bulundu (Tablo 3). Bu şekilde değerlendirme ile elde edilen flukonazol ve ketokonazol MİK'leri için korelasyon değerleri sırasıyla $r=0.41$, $p=0.000$; $r=0.31$, $p=0.000$ idi. Göz ile değerlendirilen referans yöntem sonuçları ile spektrofotometrik olarak değerlendirilen HR yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında, flukonazol ve ketokonazol için sırasıyla $r=0.54$, $p=0.000$ ve $r=0.4$, $p=0.000$ korelasyon değerleri elde edildi.

RPMI 1640 ve HR besiyerlerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemlerinde, sırasıyla dört (%2.1) ve beş (%2.6) izolatta amfoterisin B'ye direnç saptandı. Referans yöntem ile kökenlerin 26'sı (%13.4) flukonazole dirençli, 33'ü (%17) D-BD bulundu. HR besiyerinin kullanıldığı yöntemde ise, kökenlerin sekizi (%4.1) flukonazole dirençli saptanırken, 43'ü (%22.2) D-BD olarak saptandı. Referans yöntem ile dirençli olarak belirlenen 18 kökenin 10'u HR yöntemi ile D-BD olarak saptandı. İki yöntem arasında, duyarlılık kategorilerine göre amfoterisin B için %95, flukonazol için %70 uyum oranları elde edildi. Farklı maya mantarı türlerine göre elde edilen bu değerler Tablo 4'te sunulmaktadır.

TARTIŞMA

Maya mantarlarının antifungal duyarlılık testi için NCCLS tarafından yayınlanmış standart bir yöntem bulunmasına rağmen, azoller için MİK değerinin belirlenmesi halen sorunludur. Duyarlılık testinde en kritik basamak olan üremenin belirgin olarak inhibe olduğu kuyucuğun gözle belirlenmesi kısmen subjektif bir değerlendirmedir. Ayrıca, bazı *Candida* türlerinin kısmi inhibisyon etkisi göstermesi, bu değerlendirmeyi daha zor hale getirmektedir (5, 6). HR besiyeri flukonazol duyarlılığının belirlenmesinde daha kesin MİK son noktaları elde etmek için geliştirilmiştir (10). Amfoterisin B'ye dirençli *Candida* kökenlerini referans yöntemle belirlemede zorluklar bulunmakla birlikte bu antifungal için direnç sınırının $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

olması önerilmektedir. Çünkü bu MİK değeri, yüksek dozların verilmesi ile ulaşılabilecek serum konsantrasyonlarına sadece yaklaşmakta ve beyin-omurilik sıvısında elde edilebilecek konsantrasyon değerlerini aşmaktadır. Duyarlı ve potansiyel dirençli kökenlerin amfoterisin B MİK değerleri arasındaki farkın az olması nedeni ile sonuçların bu direnç sınır değeri ile kesin yorumlanmasının yanıltıcı olabileceği bildirilmiştir (11). Amfoterisin B için tanımlayıcı eşik değerlerinin belirlenebilmesi için standart yöntemlerdeki besiyerlerinin modifikasyonuna ve farklı yöntemlere gereksinim duyulmuştur. "Antibiotic medium 3" kullanılan mikrodilüsyon ve aynı besiyerinin agarının kullanıldığı Etest yöntemlerinin amfoterisin B'ye dirençli suşları ayırmada daha başarılı olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (12-15).

Çalışmada, MİK değerlerinin ± 2 dilüsyon içerisindeki uyum oranları amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol için sırasıyla %84, %62 ve %81 olarak bulunmuştur. İki besiyeri arasında duyarlılık kategorilerine göre uyum oranları ise amfoterisin B ve flukonazol için sırasıyla %95 ve %70 olarak belirlenmiştir. Ruhnke ve ark. (16), 56 *C. albicans* izolatının duyarlılığını RPMI 1640 ile HR besiyerlerinin kullanıldığı mikrodilüsyon ve E test yöntemleri ile araştırmışlar ve RPMI 1640 ve HR besiyeri arasında ilaçlara göre uyum sıralamasını amfoterisin B > flukonazol > flusitozin > ketokonazol > itrakonazol şeklinde bulmuşlardır. Bu çalışmada, MİK değerlerinin ± 2 dilüsyon içerisindeki uyum oranları, amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol için sırasıyla %95, %91 ve %66 olarak saptanmıştır. Tüm antifungal ilaçlar için iki mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyum, referans yöntem ve E test arasındaki uyumdan daha iyi bulunmuştur. Aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, MİK değerlerinin ± 2 dilüsyon içerisindeki uyum oranları, flukonazol ve vorikonazol için sırasıyla %93 ve %86 bulunmuştur (17). Yücesoy ve Mutlu (18), RPMI 1640 ve HR besiyerlerini, mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, MİK değerlerinin ± 2 dilüsyon içerisindeki uyum oranlarını, amfoterisin B ve flukonazol için sırasıyla %82 ve %89 bulmuşlar; duyarlılık kategorilerine göre ise bu oranları %94 ve %95 olarak saptamışlardır.

Bu çalışmada da iki besiyeri arasındaki en iyi uyum amfoterisin B için gözlenmiştir. Bu durum büyük olasılıkla amfoterisin B sonuçlarının daha net ve kolay yorumlanabilir olmasına bağlıdır. Çalışmadaki uyum değerleri diğer çalışmalardakiler ile karşılaştırıldığında, amfoterisin B için oranımızın bu çalışmalardaki sonuçlar ile paralellik taşıdığı; ancak ketokonazol için daha yüksek, flukonazol

için ise daha düşük uyum oranlarının saptandığı anlaşılmaktadır. Bu farklılığın, daha önce gerçekleştirilen çalışmaların, sadece *C. albicans* üzerinde yapılması; bu çalışmaya ise çeşitli maya türlerinin dahil edilmesi nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği görüşüne varılmıştır.

Araştırmada, *C. krusei* kökenlerinde flukonazol için duyarlılık kategorilerine göre iki yöntem arasında elde edilen uyum oranı düşük (%9) bulunurken; ± 2 dilüsyon içerisindeki oran %82 olarak belirlenmiştir. MİK sonuçlarının bir kısmı ± 1 dilüsyon içinde olmasına rağmen duyarlılıklarına göre farklı kategorilerde yer almışlardır. *C. krusei* için iki farklı besiyeri ile bu sonuçlar elde edilmesine karşın, pratiğe uygulanabilirlik yönünden pek bir önem taşımamaktadır. Çünkü NCCLS önerileri doğrultusunda, bu tür için MİK değeri ne olursa olsun flukonazole dirençli olarak yorumlanmalıdır (7).

Çalışmada, HR besiyeri ile duyarlılık testi $0.5-2.5 \times 10^3$ KOÜ/ml final inokulumu ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar 48 saat sonra değerlendirilmiştir. Nenoff ve ark. (19), 159 maya kökeninin duyarlılığını "Clinical Mycology of

the German Speaking Mycological Society" önerileri doğrultusunda, HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışmışlar ve sonucunda 10^2 KOÜ/ml'lik inokulum ve 18-24 saatlik inkübasyon süresini önermişlerdir.

HR besiyeri kullanılması RPMI 1640 kullanımına göre flukonazol MİK değerlerinin daha kolay yorumlanmasına olanak sağlamaktadır. Flukonazol için elde edilmiş olan ± 2 dilüsyon içerisindeki uyum oranları kısmen düşük olmasına rağmen, duyarlılık kategorileri göz önüne alındığında bu oranlar daha yüksek olarak saptanmıştır. Flukonazol sonuçlarının gözle belirlenmesi ve kısmi inhibisyona bağlı değerlendirme zorlukları göz önüne alındığında, antifungal duyarlılık testlerinde flukonazol sonuçlarının yorumlanması diğer antifungallere göre daha zor olmaktadır. Sonuç olarak, mikrodilüsyon yönteminde "high resolution" besiyerinin *Candida* ve *Trichosporon* türlerinin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazole karşı duyarlılıklarının, özellikle kategorilerinin belirlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* **1996**; 9: 499-511.
2. Beck-Sague CM, Jarvis WR. The National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* **1993**; 167: 1247-51.
3. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44: 747-51.
4. Stevens DA, Bennet JA. Antifungal agents. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, **2000**: 448-59.
5. Rinaldi MG. Laboratory evaluation of antifungal agents: A brief overview. *Clin Infect Dis* **1992**; 14 (Suppl 1): 130-3.
6. Sheehan DJ, Espinel-Ingroff A, Moore LS, Webb CD. Antifungal susceptibility testing of yeasts: A brief overview. *Clin Infect Dis* **1993**; 17 (Suppl 2): 494-500.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-second edition. NCCLS document M27-A2 Vol 22, No. 15, Wayne, PA: NCCLS, **2002**.
8. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, **2003**: 1693-711.
9. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 4th ed. Washington, DC: ASM press, **2002**: 111-43.
10. Troke PF, Pye GW. Antifungal Susceptibility Testing. A Manual of Methods in Development (FLU-92-010MM). Sandwich, UK: Pfizer Central Research, **1992**.
11. Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods: Yeasts and filamentous fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press, **2003**: 1880-93.
12. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstro A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 339-42.
13. Rex JH, Cooper Jr, CR, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 906-9.
14. Law D, Moore CB, Denning DW. Amphotericin B resistance testing of *Candida* spp.: a comparison of methods. *J Antimicrob Chemother* **1997**; 40: 109-12.

15. **Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH.** Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: Enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 2520-2.
16. **Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Engelmann E, Trautmann M.** Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *J Clin Microbiol* **1996**; 34: 3208-11.
17. **Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Trautmann M.** *In vitro* activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole-susceptible and – resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 41: 575-7.
18. **Yücesoy M, Mutlu E.** Antifungal duyarlılığın belirlenmesinde "high resolution" besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* (yayına kabul edilmiştir).
19. **Nenoff P, Oswald V, Hauste U.** *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses* **1999**; 42: 629-39.

İLETİŞİM

Prof. Dr. Mine YÜCESOY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
35340 İnciraltı, İZMİR
e-posta: mine.yucesoy@deu.edu.tr