

# Antifungal Duyarlılığın Belirlenmesinde “High Resolution” Besiyerinin Kullanıldığı Mikrodilü- yon Yöntemi(\*)

Mine YÜCESOY (\*\*), Esvet MUTLU (\*\*)

(\*) 5. Antimikrobik Kemoterapi Günleri'nde (1-3 Nisan 2002, İstanbul) sunulmuştur.

(\*\*) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

## ÖZET

Bu çalışma, *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığının saptanması amacıyla uygulanan mikrodilüsyon yönteminde “high resolution” besiyerinin kullanılabilirliğini araştırmak amacı ile yapılmıştır. Araştırmada, 105 *C.albicans* suşu incelenmiştir. Suşların amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıkları, hem NCCLS M27-A standartlarına uygun olarak MOPS ile tamponlanan RPMI 1640 besiyerinin, hem de fosfat tampon ile tamponlanan “high resolution” besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Farklı besiyerleri ile belirlenen MİK değerlerinin dağılımları t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bunun yanında her iki besiyeri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, +2 dilüsyon içindekiler uyumlu kabul edilmiştir. Ayrıca suşların MİK değerlerine göre duyarlılık kategorileri ve buna göre tutarlılık oranları belirlenmiştir. Amfoterisin B ve flukonazol için iki farklı besiyeri ile elde edilen MİK değerleri dağılımı arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (amfoterisin B için p=0.183; flukonazol için p=0.130). Sonuçlarımızda +2 dilüsyon içindeki tutarlılık oranları amfoterisin B ve flukonazol için sırasıyla %82 ve %89 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar, suşların duyarlılık kategorileri göz önüne alındığında amfoterisin B için %94, flukonazol için ise %95 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız ışığında; *C.albicans* suşlarının amfoterisin B ve flukonazole duyarlılığın belirlenmesi için uygulanan mikrodilüsyon yönteminde “high resolution” besiyerinin de kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: RPMI 1640 besiyeri, “high resolution” besiyeri, *Candida albicans*, mikrodilüsyon yöntemi

## SUMMARY

### Microdilution Method Using “High Resolution” Medium for Determining the Antifungal Susceptibility

This study was undertaken to evaluate the usefulness of high resolution medium in microdilution method when determining the susceptibilities of *Candida albicans* strains against antifungal agents. Hundred and five *C.albicans* strains were included in the study. The susceptibilities of the strains against amphotericin B and fluconazole were determined by microdilution method using two different media, RPMI 1640 medium buffered with MOPS according to NCCLS M27-A standards and high resolution medium buffered with phosphate buffer. The distribution of MIC values determined with two different media were compared with t test. At the same time overall results of both methods were considered to be in agreement when the MIC values were within +2 fold dilutions. On the other side the susceptibility categories of the strains and the agreement rates were determined. No statistical difference was observed between the distribution of MIC values of two different media for amphotericin B and fluconazole (p=0.183 for amphotericin B and p=0.130 for fluconazole). The agreement rates of MIC values within +2 fold dilutions were 82% and 89% for amphotericin B and fluconazole, respectively. These rates were detected to be 94 and 95% for amphotericin B and fluconazole when susceptibility categories were considered. According to our results, we conclude that high resolution media can be used in microdilution method for determining the susceptibilities of *C.albicans* strains against amphotericin B and fluconazole.

Key Words: RPMI 1640 medium, high resolution medium, *Candida albicans*, microdilution method

## GİRİŞ

Mikozların insidansının ve ciddiyetinin artması, bir yandan antifungal ajanların gelişimine ve daha sık kullanımına neden olurken, diğer yandan da antifun-

gallere duyarlı suşların daha az duyarlı olanları ile yer değiştirmesine yol açmıştır. Tüm bu noktaların sonucu olarak laboratuvarlarda antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önemli hale gelmiştir (1). “Na-

tional Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), mayalar için antifungal duyarlılık testlerinin standartlarını belirlemiş ve RPMI 1640 besiyerinin kullanıldığı mikro ve makrodilüsyon yöntemlerini referans olarak kabul etmiştir (2). Ancak bu besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yönteminde en kritik aşama olan minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) noktası gözle değerlendirilmekte ve bu da, sonuçların belirlenmesine kısmen bir subjektiflik getirmektedir (1). Değerlendirme zorluğu, özellikle kısmi inhibisyon etkisinin izlendiği ve +2 (kontrole göre belirgin inhibisyon sağlayan konsantrasyon) değerinin MİK olarak kabul edildiği azollerde daha da önem kazanmaktadır. Bu açıdan standart yöntemde farklı besiyerlerinin ve değerlendirme kriterlerinin araştırılması ve referans yöntem ile karşılaştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır.

İnfeksiyon etkenleri arasında albicans dışı Candida türlerinin sıklığı artmakla birlikte yine de en sık soyutlanan tür olarak Candida albicans kabul edilmektedir (1). Bu açıdan çalışmamızda C.albicans izolatları kullanılmıştır. Araştırmamızda C.albicans suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığının saptanması amacıyla uygulanan mikrodilüsyon yönteminde “high resolution” (HR) besiyerinin kullanılabilirliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar: Çalışmamıza, çeşitli klinik örneklerden (41 idrar, 21 dil, ağız, oral plak sürüntüsü, 13 balgam, trakeal sekret, bronkoalveoler lavaj, 11 kan, 8 yara, dren örneği, 7 vajinal-servikal akıntı, 2 periton sıvısı, 2 kulak akıntısı) soyutlanan 105 C.albicans izolatı ile kalite kontrol amacıyla C.albicans ATCC 90028, C.parapsilosis ATCC 90018 ve C.krusei ATCC 6258 suşları alınmıştır.

Antifungal Duyarlılık Testleri: a) RPMI 1640 besiyeri kullanılarak: Suşların amfoterisin B (Sigma) ve flukonazole (Pfizer) duyarlılıkları NCCLS M27-A kriterlerine uyularak 0.165 M morfolin-propan sulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış fenol kırmızılı, L-glutaminli ve sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyerinin (Sigma) kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır (2). Kullanılan amfoterisin B ve flukonazol konsantrasyon aralığı sırasıyla 0.03-32 µg/ml ve 0.06-64 µg/ml şeklindedir.

b) “High resolution” besiyeri kullanılarak: Suşların aynı antifungallere duyarlılıkları HR besiyeri (Oxoid) kullanılarak Troke ve Pye(3)’nin yöntemine göre mikrodilüsyon tekniği ile çalışılmıştır. Bu besiyeri üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlanmıştır. Şöyle ki; besiyerinden 29.3 gram tartılıp, 900 ml distile suda çözölmüştür. Ortama 2.0 gram sodyum bikarbonat eklendikten sonra 0.2 M fosfat tampon ile pH:7.5’e tamponlanmıştır. Daha sonra hacim 1 litreye tamamlanmış ve filtre edilerek steril edilmiştir. Bu yöntem için Sabouraud dekstroz agarda üretilmiş 24 saatlik kolonilerden sentetik HR besiyeri ile  $1-2 \times 10^3$  maya/ml olacak şekilde inokulum hazırlanmıştır. Bu inokulumdan iki misli oranında antifungal içeren mikroplak kuyucuklarına 100’er ml eklenmiştir. Antifungal ajan konsantrasyonları referans mikrodilüsyon yöntemindeki gibi hazırlanmıştır. Mikroplaklar 35°C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Her iki yöntemin de sonuçları 48 saat sonra NCCLS önerisi doğrultusunda gözle okunarak amfoterisin B’nin üremeyi tam inhibe ettiği, flukonazolün ise kontrole göre belirgin inhibisyon sağladığı nokta (+2 değeri) MİK olarak değerlendirilmiştir. Amfoterisin B için belirlenen MİK değeri  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  olanlar duyarlı,  $>1 \text{ mg/ml}$  olanlar ise dirençli; flukonazol için MİK değeri  $\leq 8 \text{ mg/ml}$  olanlar duyarlı, 16-32 µg/ml olanlar doza bağımlı duyarlı,  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$  olanlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir (2).

İstatistiksel Analiz: Farklı besiyerleri ile belirlenen MİK değerlerinin dağılımları SPSS versiyon 8.0 programında t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bunun yanında her iki besiyeri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak,  $\pm 2$  dilüsyon içindeki sonuçlar uyumlu kabul edilmiştir. Ayrıca suşlar MİK değerlerine göre duyarlı, doza bağımlı duyarlı ya da dirençli olarak kategorilere ayrılmış ve her iki besiyeri ile elde edilen sonuçlar bu açıdan da karşılaştırılarak tutarlılık oranları belirlenmiştir.

#### BULGULAR

Tüm C.albicans suşlarının mikrodilüsyon sonuçları 48 saat içinde değerlendirilecek kadar üremiştir. Çalışılan 3 kontrol suşunun MİK değerleri her iki yön-

tem ile de NCCLS'in belirttiği sınırlar içindedir. Genel olarak çalışma sonuçlarına bakıldığında, özellikle flukonazol sonuçlarının değerlendirilmesinde HR besiyeri sonuçlarının, RPMI 1640'ınkilere göre daha belirgin ve kolay okunabilir olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda amfoterisin B ve flukonazol için elde edilen ortalama MİK, MİK50, MİK90 değerleri ve MİK aralığı tablo 1'de gösterilmiştir. Araştırdığımız suşların her iki besiyeri ile çalışıldığında elde edilen MİK değerlerinin dağılımları ise tablo 2'de gösterilmiştir.

Hem RPMI 1640 hem de HR besiyeri kullanıldığında, 105 C.albicans suşunun 102'si (%97) amfoterisin B'ye duyarlı, 3'ü (%3) ise dirençli bulunmuştur. RPMI 1640 besiyeri kullanıldığında suşların 102'si (%97) flukonazole duyarlı, 3'ü ise doza bağımlı du-

yarlı ve flukonazol için sırasıyla %82 ve %89 olarak belirlenmiştir.

Suşların duyarlı, doza bağımlı duyarlı ya da dirençlilik durumları göz önüne alındığında, bu tutarlılık oranları amfoterisin B için %94, flukonazol için ise %95 olarak bulunmuştur. HR besiyeri sonuçlarında, amfoterisin B için 3 suşta çok büyük hata, 3 suşta ise büyük hata saptanırken, flukonazol için 5 suşta küçük hata izlenmiştir.

## TARTIŞMA

Son yıllarda insidansı oldukça artan Candida infeksiyonlarının sağaltımına yön verebilmek amacıyla yapılan antifungal duyarlılık testlerinin önemi daha da belirginleşmiştir. Antifungal duyarlılık testlerinden mikrodilüsyon yöntemi, hem standardize edilmiş olması hem de uygulananın makrodilüsyona

Tablo 1. Amfoterisin B ve flukonazol için elde edilen ortalama MİK, MİK50, MİK90 değerleri ve MİK aralığı

Besiyeri / Antifungal madde	Ortalama MİK±Standart sapma (mg/ml)	MİK50 (mg/ml)	MİK90 (mg/ml)	MİK Aralığı (mg/ml)
RPMI 1640 amfoterisin B	0.38 ± 0.38	0.250	1.00	0.015-2.00
HR besiyeri amfoterisin B	0.26 ± 0.81	0.125	0.250	0.06-8.00
RPMI 1640 flukonazol	1.35 ± 3.03	0.500	2.00	0.06-8.00
HR besiyeri flukonazol	0.74 ± 2.18	0.500	1.00	0.015-16.00

Tablo 2. Suşların farklı iki besiyeri ile elde edilen MİK değerlerinin dağılımları

Besiyeri / Antifungal madde	Belirtilen MİK Değerine (mg/ml) Sahip Suş Sayısı										
	0.015	0.03	0.06	0.125	0.250	0.500	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00
RPMI 1640 amfoterisin B	1	2	14	17	30	29	9	3	-	-	-
HR besiyeri amfoterisin B	-	-	17	62	18	5	-	2	-	1	-
RPMI 1640 flukonazol	-	-	1	10	41	28	10	8	-	4	3
HR besiyeri flukonazol	-	-	-	7	41	43	10	2	-	-	2

yarlı; HR besiyeri kullanıldığında ise 103'ü (%98) flukonazole duyarlı, 2'si (%2) doza bağımlı duyarlı olarak saptanmıştır.

Amfoterisin B ve flukonazol için iki farklı besiyeri ile elde edilen MİK değerleri dağılımı arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (amfoterisin B için p=0.183; flukonazol için p=0.130). Sonuçlarımızda ±2 dilüsyon içindeki tutarlılık oranları ise amfoteri-

göre daha kolay olması nedeni ile laboratuvarlarda kullanılmaktadır. NCCLS, referans olarak belirlediği mikrodilüsyon yönteminde MOPS ile tamponlanan fenol kırmızılı, L-glutaminli ve sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyerinin kullanılmasını önermektedir (2). HR besiyeri ise, kimyasal olarak belirlenmiş bir besiyeri olup, primer olarak mayaların flukonazole duyarlılığının belirlenmesinde kullanılmak üzere ge-

liştirildiği bildirilmiştir (4).

Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının flukonazol ve amfoterisin B'ye duyarlılıkları RPMI 1640 ve HR besiyerinin kullanıldığı iki farklı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımızda +2 dilüsyon içindeki tutarlılık oranları amfoterisin B ve flukonazol için sırasıyla %82 ve %89 olarak belirlenmiştir. Suşların duyarlılık kategorileri göz önüne alındığında bu oranlar amfoterisin B için %94, flukonazol için ise %95 olarak bulunmuştur.

Ruhnke ve ark (4) HIV enfeksiyonlu olgulardan soyutlanan *C.albicans* suşlarının flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, flusitozin ve amfoterisin B'ye duyarlılıklarını hem NCCLS'in önerdiği (M27-P) hem de HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi ile incelemiş ve bu sonuçların flukonazol sağaltımına yanıt ile korelasyonunu araştırmıştır. Çalışmada M27-P yöntemi ile HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi arasında en iyi korelasyonun amfoterisin B ve flukonazol için elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada,  $\pm 2$  dilüsyon içinde saptanan tutarlılık oranları amfoterisin B ile flukonazol için sırasıyla %95 ve %93 şeklindedir. Ruhnke ve ark (5) yaptığı bir başka çalışmada, benzer *C.albicans* izolatlarının flukonazol ve vorikonazole duyarlılıkları yine aynı yöntemler ile araştırılmış ve sonuçlarda  $\pm 2$  dilüsyon içindeki tutarlılık oranları flukonazol için yine %93, vorikonazol için ise %86 olarak belirlenmiştir. Bizim oranlarımız bu sonuçlar ile paralel olmakla birlikte biraz daha düşüktür. Bu durum çalışmalardaki suş sayısının farklı oluşundan ya da suşların duyarlılık durumlarının farkından kaynaklanabilir. Ayrıca her iki çalışmada da flukonazol için elde edilen MİK50 ve MİK90 değerlerine bakıldığında HR besiyerinin kullanıldığı yöntem sonuçlarının diğerlerinden biraz daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bizim bulgularımız da benzer doğrultudadır. Bunun yanında, araştırmacılar ilk çalışmalarında flukonazol ile sağaltıma yanıt ve in vitro bulgular arasındaki en iyi korelasyonu HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemi ile elde etmiştir (4).

Metzger ve Hofmann'ın (6) yaptığı antifungal duyarlılık çalışmasında, HR besiyeri ile RPMI 1640'ın kullanıldığı mikrodilüsyon yöntemlerinin sonuçlarının flukonazol için benzer ancak ketokonazol ve itrakonazol için ise RPMI 1640 sonuçlarının daha yüksek ol-

duğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, özellikle flukonazol sonuçlarının değerlendirilmesinde HR besiyeri sonuçlarının, RPMI 1640'ınkilere göre daha belirgin ve kolay okunabilir olduğu izlenmiştir. Bu bulgu Ruhnke ve arkadaşlarının (4) çalışmasında da dikkati çekmiştir. Wardle ve ark. (7) standart suşların bir pradisinin olan BMS-181184 ile flukonazole duyarlılığını araştırdığı bir ön çalışmada, HR besiyeri sonuçlarının RPMI'ında içinde olduğu bir grup besiyerine göre biraz daha düşük olduğunu ancak daha belirgin son nokta ölçümleri sağladığını gözlemiştir.

Flukonazole duyarlılığın araştırılmasında, HR besiyerinin kullanıldığı mikrodilüsyon yönteminin laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası uyumunun incelendiği bir çalışmada, laboratuvar içi tekrarlanabilirlik  $\pm 2$  dilüsyon içinde %95.7, laboratuvarlararası tekrarlanabilirlik ise yine aynı sınırlar içinde %84 olarak belirlenmiştir (8). Bu bulgularda elde edilen oranlar yöntemin uygulanabileceğini göstermektedir.

Sonuçlarımız ışığında; *C.albicans* suşlarının amfoterisin B ve flukonazole duyarlılığın belirlenmesi için uygulanan mikrodilüsyon yönteminde "high resolution" besiyerinin de kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Espinel-Ingroff A, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV: Comparison of two alternative microdilution procedures with the 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).
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa (1997).
3. Troke PF, Pye GW: Antifungal susceptibility testing. A manual of methods in development (FLU-92-010MM). Pfizer Central Research, Sandwich, United Kingdom (1992).
4. 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 flukonazole therapy. *J Clin Microbiol* 34:3208 (1996).

5. 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* 41:575 (1997).

6. Metzger S, Hofmann H: Fluconazole-resistant *Candida* species from HIV infected patients with recurrent *Candida* stomatitis: cross resistance to itraconazole and ketoconazole. *Mycoses* 40:56 (1997).

7. Wardle HM, Law D, Denning DW: In vitro activity of BMS-181184 compared with those of fluconazole and amphotericin B against various *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2229 (1996).

8. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Muller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, Shadomy S, Troke PF, Walsh TJ, Warnock DW: Standardized susceptibility of fluconazole : an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1805 (1992).