

# Kan Kültürlerinden Soyutlanan Candida Suşlarının Amfoterisin B ve Flukonazole in Vitro Duyarlılıkları

Nurver ÜLGER TOPRAK (\*), Seda ERDOĞAN (\*\*), Cennet ÇELİK (\*), Candan JOHANSSON (\*\*\*)

(\*)Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

(\*\*) Biofarma İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul

(\*\*\*) Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

Bu çalışmada, kan kültürlerinden soyutlanan Candida suşlarının amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıkları araştırılmış ve ampirik tedaviye yön vermek amaçlanmıştır. Mayıs 1999- Kasım 2000 tarihleri arasında 60 hastanın kanından izole edilen Candida kökenleri çalışmaya alınmıştır. Kökenler standart mikoloji yöntemleriyle tanımlanmıştır. Antifungal duyarlılık testleri, NCCLS'nin önerdiği makrodilüsyon yöntemine göre uygulanmış ve yorumlanmıştır. Elli yedi hastadan saf , üçünde ise karışık Candida kültürü elde edilmiştir. Toplam altmış üç izolatın %97' si Candida türleri, %3'ü ise Trichosporon asahii şeklinde tanımlanmıştır. Candida albicans çoğunluğu oluştururken(%40) bunu Candida parapsilosis (%35) ve Candida tropicalis (%13) izlemiştir. Tüm Candida suşları amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur. Doğal dirençli Candida krusei'ler dışındaki hiçbir Candida kökeni flukonazole dirençli bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Kandidemi, Candida, antifungal duyarlılık, amfoterisin B, flukonazol,

## SUMMARY

In Vitro Susceptibility to Amphotericin B and Fluconazole of Candida Strains Isolated from Blood Cultures

The aim of this study was to evaluate the susceptibilities of Candida strains isolated from blood cultures to amphotericin B and fluconazole and to get a view for the empirical treatment. Candida strains isolated from 60 patients' blood cultures within the time period of May 1999- November 2000 were included in the study. The strains were identified by standard mycological methods. Antifungal susceptibility tests were performed and interpreted in accordance with the macrodilution method recommended by NCCLS (M27A). Pure Candida spp. were isolated from 57 patients' blood, and three specimens exhibited mixed Candida culture. Of 63 test isolates, 97% were Candida spp and the remaining 3% Trichosporon asahii. Candida albicans constituted the most common species (40%), followed by C.parapsilosis (35%) and C.tropicalis (13%). All Candida strains. were susceptible to amphotericin B. Except the intrinsically fluconazole resistant C.krusei, non of Candida isolates were resistant to fluconazole.

Key words: Candidemia, Candida, antifungal susceptibility, amphotericin B, fluconazole

## GİRİŞ

Kandidemi olgularında son on yılda belirgin bir artış gözlenmiştir. Günümüzde yeni ve güçlü antibiyotiklerin sık kullanılması, kemik iliği ve organ nakillerinin yaygınlaşması, bağışık yanıtı baskılayıcı sitotoksik tedavi, damar içi kateterlerin ve parenteral beslenmenin uygulanması kandidemi riskini arttırmıştır. Konak savunması azalmış bu bireylerde gelişen kandideminin kişiyi uzun süreli hastanede yatmayı zorunlu kıldığı ve %38'lere va-

ran oranda ölüme neden olduğu saptanmıştır (1).

Bildirilen çalışmalara göre, fungemi olgularında sıklıkla Candida türleri izole edilmekte, Candida albicans birinci sırada yer almaktadır. Ancak son dönemlerde C.albicans dışındaki türlerin de sıklıkla üretilmeye başlandığı gözlenmektedir. Flukonazol gibi birtakım antifungallere daha az duyarlı olan C.albicans dışındaki bu türlerin tedavide sorunlar yarattığı bilinmektedir (2).

Kandidemi olgularının yüksek ölüm riski taşımaları, "non-albicans" Candida'ların iki antifungale farklı oranda duyarlılık göstermeleri nedeniyle, başarılı bir tedavinin sağlanabilmesi için, kandidemiye neden olan risk faktörlerinin değerlendirilmesi, kandidanın tür düzeyinde tanımlanması ve etkenin antifungallere in vitro duyarlılığının bilinmesi gerekmektedir(3,4).

Bu çalışmada, klinisyene ampirik tedavi seçiminde yardımcı olmak amacıyla, yaklaşık 20 aylık süre içinde, mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden soyutlanan mayalar tür düzeyinde tanımlanmış, amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıkları araştırılmıştır.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Mayıs 1999- Kasım 2000 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına kültür amacıyla gönderilen kan örnekleri BACTEC ( Becton Dickinson) otomatik kültür sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Maya üremesi tespit edilen 60 hastanın Candida suşları çalışmaya alınmıştır. Üreme sinyali veren ve Gram boyamasında maya görülen kan örnekleri eş zamanlı olarak CHROMagar Candida ve Sabouraud dekstroza agar (SDA) ekilmiş 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Oluşan kolonilerin, CHROMagar Candida'daki renk ve morfolojileri, çimlenme borusu oluşturabilme, mısır unlu - tween 80 agarda blastospor yapabilme, 42°C'de üreyebilme özellikleri araştırılmış, API 20 C AUX sistemiyle tür düzeyinde tanımları yapılmıştır.

Kökenlerin amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıkları, NCCLS'in M27-A'ya göre makrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışma için L-glutaminli, pH indikatörü içeren, MOPS ile tamponlanmış, bikarbonatsız RPMI 1640 besiyeri hazırlanmıştır. Amfoterisin B' nin (Bristol Myers Squibb) 0.015-16 µg/ml, flukonazolün (Pfizer) 0.06-64 µg/ml'lik konsantrasyon aralıklarında sulandırılmaları yapılmıştır (5,6).

Kontrol kökenleri olarak C. albicans ATCC 90028 ve C.parapsilosis ATCC 90018 kullanılmıştır.

Sonuçlar değerlendirilirken, amfoterisin B için 0 (hiç bulanıklığın olmadığı), flukonazol için 2 skoru (bulanıklıkta %80 azalmanın olduğu) minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilmiştir.

#### BULGULAR

Altmış hastanın 57'sinde tek tip, üçünde ise karışık maya türleri izole edilmiştir. Karışık kültürlü hastaların ikisinde C.parapsilosis ile C.albicans, bir hastada ise C.parapsilosis ile Trichosporon asahii beraber soyutlanmıştır.

C.albicans %40'lık oranla birinci sırada yer alırken bunu, %35'lik oranla C.parapsilosis, %13 ile C.tropicalis, %3 ile C.krusei izlemiş ve birer hastada ise C.pelluculosa, C.guilliermondii, C.famata, C.lusitaniae ve Trichosporon asahii üretilmiştir.

Candida türlerinin kliniklere göre dağılımı incelendiğinde saf kültür elde edilen kan örneklerinin %40'ının yenidoğan ve pediatri servislerinden, %28'inin ise yoğun bakım biriminden geldiği görülmektedir (Tablo 1). Dahiliye servisinde C.albicans, yenidoğan ve pediatri servisinde ise C.parapsilosis birinci sırada yer almıştır. Karışık maya üreyen kan örneklerinden birisi yenidoğan servisinde diğer ikisi ise yoğun bakım biriminden gelmiştir.

Tablo 1.Candida türlerinin kliniklere göre dağılımı.

Servisler	Yenidoğan,	Yoğun Bakım	Dahiliye	Cerrahi	Toplam
Türler	Pediatri			Bilimler	hasta sayısı
C.albicans	9	6	8	-	23
C.parapsilosis	10	3	2	4	19
C.tropicalis	1	5	-	2	8
C.krusei	-	1	1	-	2
Diğerleri*	3	-	1	-	4
T.asahii	-	1	-	-	1
Toplam hasta Sayısı (%)	23 (% 40)	16 (% 28)	12 (% 21)	6 (% 11)	57 (% 100)

\*C.pelluculosa, C.guilliermondii, C.famata, C.lusitaniae

Antifungallere karşı in vitro duyarlılıkları incelendiğinde, kökenlerin tamamının amfoterisin B'ye duyarlı olduğu saptanmıştır. Flukonazole ise Candida krusei kökenleri doza bağımlı duyarlı, diğer türlerin hepsinin duyarlı olduğu görülmüştür. Kökenlerin MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri de verilmiştir (Tablo 2). En sık izole edilen C.albicans'ın ve bunu izleyen C.parapsilosis ve C.tropicalis'in amfoterisin B MİK90 değeri 0.5 bulunmuştur. Flukonazolün MİK90 değerleri ise C.albicans'da 0.5, C.parapsilosis ve C.tropicalis'de ise 2 olarak saptanmıştır.

Tablo2.Duyarlılık test sonuçları.

## TARTIŞMA

Hematogen kandidoz yaşamı tehdit eden, hastanede uzun süre kalmayı gerektiren, yaklaşık %38 oranında ölümle sonuçlanan ağır infeksiyondur.(7) Fungemilerde en sık *C.albicans* izole edilmekle beraber

Antifungaller Maya Türleri (sayı)	Amfoterisin B(µg/ml)			Flukonazol(µg/ml)		
	MİK50	MİK90	Aralık	MİK50	MİK90	Aralık
<i>C.albicans</i> (25)	0.25	0.5	0.06- 0.5	0.25	0.5	0.06-1
<i>C.parapsilosis</i> (22)	0.125	0.5	0.03-0.5	0.5	2	<0.06-2
<i>C.tropicalis</i> (8)	0.125	0.5	0.125-0.5	0.5	2	0.125-2
<i>C.krusei</i> (2)			0.06- 0.5			8-32
<i>C.guilliermondii</i> (1)			0.125			1
<i>C.lusitanae</i> (1)			0.125			0.5
<i>C.pelluculosa</i> (1)			0.125			0.25
<i>C.famata</i> (1)			0.5			0.03
<i>T.asahii</i> (2)			0.125- 0.5			0.03

son yıllarda diğer *Candida* türlerinde belirgin bir artış gözlenmektedir. *C.albicans*'a göre daha az virulan ancak antifungallere daha dirençli "non-*albicans*" türlerine bağlı invaziv infeksiyonlar farklı merkezlerde farklı oranlarda (%14-100) bildirilmiştir. Bu farklılığın, merkezlerin tedavi şekllinden, antibiyotik rejiminden, destekleyici tedavi veya diğer yerel faktörlerden kaynaklandığı belirtilmiştir(1,2,8).

Çalışmamızda fungemilerin %40'ını *C.albicans*, ve yakın bir değerle *C.parapsilosis* (%35) oluşturmuş, bunları *C.tropicalis* (%13) izlemiştir. Hastaların ikisinde *C.krusei*, birer hastada ise *C.pelluculosa*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.lusitanae* ve *Trichosporon asahii* üretilmiştir. Sonuçlarımız pek çok çalışma ile paralel doğrultudadır.(1,2,7,8) Ülkemizden bildirilmiş kandidemi olgularında, çeşitli merkezlerden farklı oranlar (%40- 60) verilmekle beraber *C.albicans* birinci sırada yer almaktadır. (9-14) Diğer merkezlerle kıyasla-dığımızda *C.albicans* oranımız, birinci sırada yer almakla beraber biraz düşük kalmıştır. Ancak, *C.parapsilosis* oranımız daha fazla bulunmuştur. *C.parapsilosis* izole edilen hastalar irdelendiğinde, hastaların %50'sinin yenidoğan servisi, %36'sının ise yoğun bakım servisi ve genel cerrahi birimleri gibi kateter kullanımının, hiperalimentasyonun yaygın olduğu servislere tedavi edildiği gö-

rülmüştür. *C.parapsilosis*'in son yıllarda önemli nozokomiyal patojenler arasında yer aldığı, kandidemilerin %7-10'unu oluşturduğu, bazı merkezlerde %30-50 'lere varan oranlarda izole edildiği bildirilmiştir. Etkenin endojen kaynaklı olmaktan çok dış kaynaklı olduğu, mikroorganizmanın doğrudan damar içine verilmesiyle infeksiyonun geliştiği belirtilmektedir.

Hiperalimentasyon tedavilerinde glukozdan zengin çözeltilerde rahatlıkla çoğalabildiği, diğer yandan deride sıklıkla kolonize olabildiği, bu nedenle invaziv girişimlerle kan akımına karıştığı saptanmıştır. Ayrıca katater yüzeyinde oluşturduğu biyofilm nedeniyle katetere bağlı infeksiyonlarda sıklıkla rastlanmaktadır(1,2)

İn vitro antifungal duyarlılıklarını araştırdığımız kökenlerin hepsi amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur. Flukonazole duyarlılıkları incelendiğinde *C.krusei*'lerin doza bağımlı duyarlı, diğer kökenlerin hepsinin ise duyarlı olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler hastanemizde sık kullanılan antifungallere henüz bir direncin gelişmediğini göstermektedir. Geçmiş yıllarda hastanemiz yenidoğan servisinde, prematüre bebeklerden izole edilen *Candida* kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazole duyarlı oldukları bulunmuş, tedavilerinde %100'lük bir başarı sağlanmıştır (15).

Amfoterisin B' ye karşı direnç nadir görülmekle beraber, *C.guilliermondii*, *C.lusitanae* gibi türlerde primer direncin olduğu bilinmektedir. Pfaller ve arkadaşları (2) *C.lusitanae* kökenleri arasında amfoterisin B'ye sıklıkla direnç görülmesine karşın tüm kökenlerin dirençli olmadığını gözlemişlerdir. Çalışmamızda yer

alan birer *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae* kökeni amfoterisin B' ye duyarlı bulunmuştur. Benzer şekilde ülkemizde farklı merkezlerde izole edilen *C.guilliermondii*'lerin amfoterisin B' ye duyarlı olduğu bildirilmiştir (11,12,14). Diğer merkezlerin verileri gözden geçirildiğinde, kandidemiye neden olan kökenlerin amfoterisin B'ye duyarlı oldukları görülmektedir, ancak Coşkun ve ark (16) çalışmasında kandidemi etkenlerinin amfoterisin B'ye %38 oranında dirençli oldukları bildirilmiştir. Bu oran ülkemizde bildirilen en yüksek direnç oranıdır.

Yapılan çalışmalarda kandidoz tedavisinde flukonazolün amfoterisin B kadar güçlü bir klinik iyileşme sağladığı ve daha az toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (17,18). Bu özelliklerinin yanı sıra kullanım kolaylığı nedeniyle flukonazol, kandidoz tedavilerinde ve HIV'le infekte kişilerde profilaktik amaçla sıkça kullanılmaktadır. Flukonazolün yaygın şekilde kullanılmasıyla flukonazole doğal dirençli *C.krusei* ve *C.glabrata*'ya bağlı infeksiyon oranlarında artış gözlenmektedir (19). Bunun yanı sıra, 1990'lı yıllarda flukonazole dirençli *C.albicans* ve diğer türler de saptanmıştır (20). Ülkemizde de çeşitli merkezlerden dirençli kökenler tespit edilmiştir. Coşkun ve ark(16) kandidemi etkenlerinin %35'inde flukonazole direnç saptadıklarını bildirmişlerdir. Ermertcan ve ark (9) kan kültüründen izole ettikleri *C.albicans* kökenlerinin %7'sini, *C.tropicalis*'lerin ise %9'unu doza bağımlı duyarlı bulmuşlardır. Arıkan ve ark (14) kandidemi etkeni 57 *C.albicans* kökeninden birini ve 18 *C.tropicalis* kökeninden birini flukonazole doza bağımlı dirençli olarak bildirmişlerdir. Koç ve ark (12) yaptıkları çalışmada 14 *C. glabrata* kökeninin 6'sı flukonazole doza bağımlı duyarlı, 8'i ise dirençli, 4 *C.krusei* kökeninden 1'i doza bağımlı duyarlı 3' ü ise dirençli bulunmuştur.

Mayalarımızdan iki *C. krusei* kökeni flukonazole doza bağımlı duyarlı, diğerleri ise duyarlı bulunmuştur,

Sonuç olarak hastanemizde, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* kökenlerinden *C.albicans* ilk sırayı almakla beraber, diğer *Candida* türleri çoğunluğu oluşturmaktadır. Kökenlerimiz in vitro testlerde amfoterisin B ve flukonazole duyarlı bulunmaktadır. Klinisyenle sıkı işbirliği içinde, kısa sürede yapılacak tür tayini ve türe uygun ampirik tedavide amfoterisin B veya flukonazolün güvenle uygulanabileceği görülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Wright WL, Wenzel RP: Nosocomial candida, epidemiology, transmission, and prevention. *Infect Dis Clin North America* 11: 411 (1997).
2. Pfaller MA : Nosocomial candidiasis:Emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 22 (Suppl 2): 89 (1996).
3. Jarvis WR: Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 20:1526 (1995)
4. Guiot HFL, Fibbe WE, Wout JW: Risk factors for fungal infection in patients with malignant hematologic disorders: Implications for empirical therapy and prophylaxis. *Clin Infect Dis* 18:525 (1994).
5. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE: Practice guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 30: 662 (2000).
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards.Referance method for broth dilution susceptibility testing of yeasts: Tentative Standard. NCCLS Document M27-A. Villanova, Pennsylvania, (1996).
7. Pittet P, Li N, Woolson RF, Wenzel RP: Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 24: 1068 (1997).
8. Bodey GP: Hematogenous and major organ candidiasis, "G.P. Bodey(ed): Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis", p279 Raven Press, New York (1993).
9. Ermertcan Ş, İnci R, Hilmioğlu S, Tümbay E: Kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* kökenlerinin flukonazole in vitro duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi* 12:531 (1998).
10. Güriz H, Aysev D: İnvaziv infeksiyonlarda *Candida* türlerinin Rosco tablet ile antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 29 : 186 (1999).
11. Yücesoy M, Yuluğ N: Kan kültürlerinden soyutlanan *candida* türlerinin antifungal ajanlara in vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 14:71 (2000).
12. Koç AN, Erdem F, Çetin N: Kan kültürlerinde üreyen mayaların retrospektif olarak değerlendirilmesi ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 29 : 177 (1999).
13. Ener B, Sınırtaş M, Akalın H, Hacımustafaoğlu M, Özakin C, Gedikoğlu S, Töre O, Gökırmak F: Nosokomial kandidemi etkenlerinin retrospektif analizi, *Infek Dergisi* 12:85 (1998).
14. Arıkan S, Arslan S, Haşçelik G: In vitro activity of amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against bloodstream yeast isolates in Hacettepe University Hospital, Turkey. *Clin Microbio Infect Dis* 7 (suppl 1):345 (2001).
15. Bilgen H, Özek E, Ülger N, Çerikçioğlu N, Söyletir G: Neonatal candida infections in an intensive care unit: A three year experience. *Marmara Med J* 13:201 (2000).
16. Coşkun Ö, Saraçoğlu MA, Bellioğlu BB, Gönülüm A, Yıldırım ŞT, Doğancı L, Pahsa A: Kandidemi saptanan hastalarda bilinen risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve *Candida* izolatlarının amfoterisin-B ve flukonazole in vit-

ro antifungal duyarlılıklarının incelenmesi, 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanakları, s.262 (2001).

17. Phillips P, Shafran S, Garber G, Smail F, Fong I, Salit I, Miller M, Williams K, Conly JM, Singer J, Loannou S: For the Canadian Candidemia Study Group: Multicenter randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for treatment of candidemia in non-neutropenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:337 (1997).

18. Ninane J and a multicentre study group: A multicentre study of fluconazole versus oral polyenes in the prevention of fungal infection in children with hematological or oncological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:330 (1994).

19. Denning DW, Baily GG, Hood SV: Azole resistance in candida, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:261 (1997).

20. White A, Goetz MB: Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin Infect Dis* 19:687 (1994).