

Çocuk Hastalardan İzole Edilen Candida Türlerinin Çeşitli Antifungallere Duyarlılıklarının Araştırılması (*)

Semiha ÖZKAN(**), Fatma KAYNAK(**), Ufuk ABBASOĞLU(**), Deniz GÜR(***)

(*)3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi'nde (27-30 Mayıs 2003, Bodrum) poster olarak sunulmuştur.

(**) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

(***) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

ÖZET

Haziran 2001-Mart 2002 tarihleri arasında, 0-18 yaş grubu 80 çocuktan izole edilen toplam 80 Candida izolatu [67 (%84) *Candida albicans*, 13 (%16) *albicans* dışı *Candida*: *C. tropicalis*(2), *C. parapsilosis*(2), *C. krusei*(1), *C. kefyr*(1), *Candida spp.* (7)] ile çalışılmıştır. *Candida albicans* ATCC 10231 kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Bu türlerin amfoterisin-B (AMB), flukonazol (FLU), ketokonazol (KET) ve klotrimazole (KLO) duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A'nın önerdiği mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

İzolatların %54'ü flukonazole duyarlı, %23'ü doza bağlı duyarlı ve %23'ü dirençli bulunmuştur. Amfoterisin-B için iki izolat (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) dışında MİK değeri $\leq 1\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. İzolatların MİK₉₀ değerleri, flukonazol, ketokonazol, klotrimazol ve amfoterisin-B için sırasıyla 64 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ ve $\leq 0.5\text{mg/ml}$ olarak belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Candida* türleri, Antifungal duyarlılık

SUMMARY

The Susceptibility of *Candida* Strains Isolated from Pediatric Patients to Various Antifungal Agents.

Eighty *Candida* isolates that were isolated from children of ages 0-18 years from June 2001 through March 2002 were studied. Of the 80 *Candida* isolates 67 (84%) were *C. albicans* and 13 (16%) were non-*albicans* *Candida*, [*C. tropicalis*(2), *C. parapsilosis*(2), *C. krusei*(1), *C. kefyr*(1) and other *Candida spp.* (7)]. *C. albicans* ATCC 10231 was used as the control strain. Antifungal susceptibility testing of amphotericin B, fluconazole, ketoconazole and chlotrimazole to *Candida* isolates was performed by the reference broth microdilution method described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (M27 A).

Fiftyfour percent of the *Candida* isolates were sensitive 23% were susceptible - dose dependent and 23% were resistant to fluconazole. MIC's of amphotericin-B were $\leq 1\mu\text{g/ml}$ for all the isolates except two (*C. albicans*, *C. parapsilosis*). MIC₉₀ values of fluconazole, ketoconazole, chlotrimazole and amphotericin-B were 64 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ and $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$ respectively.

Key Words: *Candida* species, Antifungal susceptibility

GİRİŞ

Son yıllarda, steroidler, kemoterapi veya AIDS sebebiyle bağışıklığı baskılanmış konak sayısı artmaktadır. Diğer taraftan mantar enfeksiyonu sayısı da artmakta, patojen mantar türleri ve direnç paternleri değişmektedir. Risk altındaki hastaların bulunduğu ünitelerde mikozların %10-25'inden sorumlu olan *Candida*'lar ilk sıralarda yer alan patojenlerdir ve

mortalite %38-75 arasında değişmektedir (1,2).

Nozokomiyal fungal enfeksiyonları kontrol etmek amacı ile antifungallerin hem profilaksi hem de tedavide kullanılması sonucunda, türe bağlı olarak özellikle azol grubundan flukonazole karşı görülen direnç gelişimi gelecek için endişe yaratmaktadır (3).

Bu çalışmada, çocuk yaş grubunda *Candida* enfeksiyonlarına neden olan türlerin saptanması ve bu türlerin,

İletişim : Semiha Özkan

e- posta sozkan@gazi.edu.tr

kandidozların tedavisinde altın standart olarak kabul edilen amfoterisin B, direnç sorunu yaratan flukonazol ve azol grubundan ketokonazol ve klotrimazole karşı olan in vitro duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta örnekleri. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden, Haziran 2001-Mart 2002 tarihleri arasında, 0-18 yaş grubu 80 çocuktan izole edilen toplam 80 *Candida* türü [67 *Candida albicans*, 13 *albicans* dışı *Candida*: *C. tropicalis* (2), *C.parapsilosis* (2), *C. krusei*(1), *C.kefyr*(1), *Candida spp.* (7)] ile çalışılmıştır. Çalışmada *Candida albicans* ATCC 10231 kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Antifungal duyarlılık. Antifungal duyarlılık testleri National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) M27 A, 1997 standardına göre yapılmıştır (4). Mikrodilüsyon yönteminde; 0.165mol/l 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) ile tamponlanmış RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Antifungal ilaçlar dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürülerek istenilen final konsantrasyonlara göre sulandırım yapılmıştır. Flukonazol için 0.12-64µg/ml, amfoterisin B, ketokonazol ve klotrimazol için ise 0.03-16µg/ml'ler arasındaki sulandırımlar kullanılmıştır.

İnokulasyon yoğunluğu; 0.5×10^3 - 2.5×10^3 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı.

Klinik örnek	C.albicans	Non-albicans Candida	Toplam
İdrar	18	4	22
Pü	18	2	20
Boğaz salgısı	11	-	11
Balgam	5	2	7
Vajinal sekresyon	6	-	6
Kan	3	2	5
Trakeal aspirasyon	2	3	5
Üretral akıntı	1	-	1
Bronkoalveolar lavaj	1	-	1
Böbrek taşı	1	-	1
Parasentez sıvısı	1	-	1
Toplam	67	13	80
Antifungal ajanlarda, flukonazol için MİK $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ dirençli, MİK $> 16-32 \mu\text{g/ml}$ doza bağlı duyarlı ve			

MİK $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ duyarlı olarak kabul edilmiştir (4). Diğer ajanlar için NCCLS'de sınır değerler verilmiştir.

BULGULAR

İdrar örneklerinin %77'si yeni doğan yaş grubundan, %5'i 11-18 arası yaş grubundan, pü örneklerinin ise %57'si yeni doğan grubundan, %24'ü 11-18 yaş grubundan elde edilmiştir. Altı vajinal örneğin tümü (%100) 11-18 yaş grubuna, beş kan örneğinin tümü (%100) yeni doğan yaş grubuna aittir. Boğaz salgısı örneklerinin çoğu (%60) yeni doğan yaş grubundan, balgam örneklerinin çoğu (%66.6) 4-10 yaş grubundan elde edilmiştir. Trakeal aspirasyon örneklerinin yarısı (%50) yeni doğan, diğer yarısı (%50) 4-10 yaş grubuna aittir. Bronko alveolar lavaj ve böbrek taşı örnekleri yeni doğan yaş grubundan, üretral akıntı ve parasentez sıvısı örnekleri ise 4-10 yaş grubundan elde edilmiştir.

Seksen klinik izolattan 67'si (%84) *Candida albicans*, 13'ü (%16) ise *albicans* dışı *Candida* olarak belirlenmiştir. Tablo 2'de suşların çalışılan dilüsyonlara göre sayısal dağılımı verilmiştir.

Flukonazole 18 izolat (%23) dirençli ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$), 44 izolat (%54) duyarlı ($\leq 8 \mu\text{g/ml}$), 18 izolat (%23) ise doza bağlı duyarlı ($16-32 \mu\text{g/ml}$) bulunmuştur. Dirençli olan 18 izolatin üçü (%17) *Candida spp.*, 15'i (%73) *C.albicans*'dır. Kırkdört duyarlı izolatin ise beşi (%11) *Candida spp.*, ikisi (%5) *C.tropicalis*, birer tanesi (%3) *C.parapsilosis* ve *C.kefyr*, 35'i (%81) *C. albicans* olarak bulunmuştur. Tüm izolatların flukonazol için MİK₉₀ değeri $64 \mu\text{g/ml}$ 'dir.

İzolatların ketokonazol ve klotrimazol için MİK₉₀ değeri $16 \mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. Ketokonazole karşı MİK'u $0.06 \mu\text{g/ml}$ bulunan 24 izolat içinde dört izolat (%17) *albicans* dışı *Candida*, 20 izolat (%83) *C. albicans*'dır. Klotrimazol için MİK'u $0.06 \mu\text{g/ml}$ bulunan 20 izolat belirlenmiştir ve bunlardan dört izolat (%20) *albicans* dışı *Candida*, 16 izolat (%80) *Candida albicans*'dır.

AMB için MİK değeri bir *C.albicans* izolatu için $4 \mu\text{g/ml}$, bir *C.parapsilosis* izolatu için $2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. İzolatların AMB için MİK₉₀ değeri $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ dir.

Tablo 2. Suşların çalışılan dilüsyonlara göre sayısal dağılımı.

Antifungal madde	Dilüsyon aralıkları (µg/ml.)											
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03
Flukonazol	18*	3	15	9	6	6	5	3	1	14	-	-
Ketokonazol	-	-	26	6	3	2	4	7	2	-	24	6
Klotrimazol	-	-	43	-	-	2	4	7	3	-	20	1
AmfoterisinB	-	-	-	-	1	1	2	13	4	-	18	41

* : Suş sayısı

C. albicans ve albicans dışı *Candida* suşları ayrı ayrı değerlendirildiğinde; *C.albicans* suşlarının %73'ü, albicans dışı türlerin ise %17'si flukonazole dirençli bulunmuştur. MİK değeri ketokonazol için albicans dışı izolatların %15'inde, *C. albicans* izolatlarının %81'inde 16 µg/ml olarak belirlenmiştir. Klotrimazol için MİK değeri albicans dışı izolatların %2'sinde, *C. albicans* izolatlarının %92'sinde 16 µg/ml olarak bulunmuştur. *Candida albicans* izolatlarında flukonazol için MİK₉₀ değeri 64 µg/ml, ketokonazol ve klotrimazol için MİK₉₀ değeri 16 µg/ml bulunmuştur. Albicans dışı izolatların flukonazol, ketokonazol ve klotrimazol için MİK₉₀ değerleri 16 µg/ml bulunmuştur.

TARTIŞMA

Özellikle bağımsızlığı baskılanmış hastalarda ilaç kullanımına bağlı olarak AMB ve azollere direnç gelişmeye başlamakta, bu nedenle yüksek risk grubundaki kişilerde hastane kaynaklı mikozların önemi artmaktadır (1).

Henüz yurdumuzdaki hastane kaynaklı mantar enfeksiyonlarına ilişkin geniş çaplı araştırmalar yapılmamıştır ve bu konuda yeterli veri bulunmamaktadır (5). Antifungal duyarlılık testleri, izole edilen mantara en etkili antifungalın seçimine olanak tanımaktadır. Ancak antifungallerin in vitro-in vivo uyumu her zaman tam değildir (6,7).

1982 yılında NCCLS tarafından antifungal duyarlılık testleri için bir alt komite kurulmuştur . Ancak, antifungal duyarlılık testlerinde, bazı maya mantarları dışında yine de sorunlar yaşanmaktadır çünkü de-

neyler standardize edilebilmiş değildir (8). AMB ile tedavi edilen hastalardan izole edilen suşlarda AMB direnci (MİK>2µg/ml) türe bağlı olarak değişmekte ve yavaş gelişmektedir ancak tedavi sırasında *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.lusitanea* türlerinin bazılarında direnç gelişebilir. AMB'de asıl sorun toksik etkidir (9). Israrlı kandidemisi veya dissemine enfeksiyonu olan hastalarda *C.albicans* için flukonazole karşı duyarlılık testi yararlıdır. *Candida albicans* dışı *Candida*'lar ve özellikle *C.glabrata*, *C.krusei* veya *C.parapsilosis* ile infekte olan hastalarda, hasta özellikle daha önce azol grubu bir antifungal ile tedavi edilmişse duyarlılık testi yapılmalıdır. Bazı mantar türleri AMB'ye dirençlidir ancak bu in vitro direnç hastaların tedavisinde önemli bir faktör değildir (10). Kuştimur ve ark.'larının (11) iki farklı mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada, flukonazol direnci %22,5 olarak bulunmuştur. Bu oran bizim bulgularımız ile uyumludur. Kiraz ve ark.'ları (12) çalıştıkları 300 *C.albicans* suşunun %100'ünü flukonazole duyarlı, %94'ünü AMB için ≤0.03-1µg/ml MİK aralığında bulmuşlardır.

İnsanda enfeksiyona sebep olduğu bildirilen *Candida* türleri içerisinde en sık karşılaşılan etken *C.albicans*'tır (13). Bu çalışmada da %84 *C.albicans* ve %16 albicans dışı *Candida* izole edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, rutin laboratuvar çalışmalarında antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasına gerek olmadığı görülmektedir. Çalışılan *Candida* izolatlarının amfoterisin B dışında diğer üç

antifungal ajan için $MİK_{90}$ değerleri oldukça yüksek bulunmuştur. Kandidemi ve hastane enfeksiyonlarında amfoterisin B birinci seçenek olma özelliğini sürdürmektedir. Ancak tedaviye dirençli olgularda antifungal duyarlılık testlerine başvurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1. Rangel F, Wiblin T, Blumberg HM, Siman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE, Jarvis W, Dawson J:** National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of blood stream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 29:253 (1999).
- 2. Gorbach SL:** Antimicrobial resistance in the 1990's. *Hospital Infection Control* 2:18 (1997).
- 3. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan D:** Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* 36 (Suppl 1): 156 (1998).
- 4. NCCLS:** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard NCCLS Document M27-A. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 15: 19 (1997).
- 5. Hoşoğlu S:** Nozokomiyal hematojen kandidoz, I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklar, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.36: 157 (1999).
- 6. Edwards JE:** International Conference for the Development of a Severe *Candida* Infections. *Clin Infect Dis* 25:43 (1997).
- 7. Ingroff EA:** Antimicrobial resistance *Infect Dis Clinics North America* 11:929 (1997).
- 8. Dennig DW:** Invasive aspergillosis *Clin Infect Dis* 26: 781 (1998).
- 9. Ellis D: Amphotericin B:** spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 49 (Suppl S1): 7 (2002).
- 10. Lozano Chiu M, Rex JH:** Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. "Ajello L, Hay R.J.(Ed) : Resistance to antifungal agents", p177, Arnold, London (1998).
- 11. Kuştimur S, Kalkancı A, Mansuroğlu H:** *Candida* türlerinin flukonazole duyarlılıklarının saptanmasında iki farklı mikrodilüsyon yönteminin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 15: 349 (2001).
- 12. Kiraz N, Erturan Z, Uzun M, Durmaz G, Us T, Akgün Y, Anđ Ö:** Üç yüz *Candida albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole Duyarlılıklarının araştırılması. *Klinik Derg* 11:116 (1998).
- 13. Pfaller MA:** Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis* 19:8 (1994).