

VAJİNAL ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MAYA TÜRLERİNİN BAZI ANTİFUNGAL MADDELERE DUYARLILIKLARI

SUSCEPTIBILITIES OF YEASTS ISOLATED FROM VAGINAL DISCHARGE SPECIMENS TO SOME ANTIFUNGAL AGENTS

Demet KAYA*, Nuri KİRAZ*

Özet: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 520 vajinal akıntı örneği incelenmiş ve 100 adet maya izole edilmiştir. İzolatlardan 65'i (% 65) *C.albicans*, 14'ü (% 14) *C.glabrata*, 8'i (% 8) *C.krusei*, 3'ü (% 3) *C.guillermundii*, 3'ü (% 3) *T.stellata*, 2'si (% 2) *C.pseudotropicalis*, 2'si (% 2) *C.tropicalis*, 2'si (% 2) *S.cerevisiae* ve 1'i (% 1) *C.parapsilosis* olarak tanımlanmıştır.

Maya izolatlarının nistatin, klotrimazol ve mikonazol gibi antifungal ajanlara duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen MİK değerleri ile nistatin'in *C.albicans* suşlarının tümüne, diğer izolatların % 88.6'sına; klotrimazol'un tüm maya suşlarına; mikonazol'ün *C.albicans* suşlarının % 98.5'ine ve diğer izolatların tümüne etkili olduğu belirlenmiştir.

Summary: Hundred yeast strains were isolated from 520 vaginal discharge specimens that were sent to Osmangazi University Medical Faculty Microbiology Laboratory, Eskişehir. The isolates were identified as follows: 65 (65%) *C.albicans*, 14 (14%) *C.glabrata*, 8 (8%) *C.krusei*, 3 (3%) *C.guillermundii*, 3 (3%) *T.stellata*, 2 (2%) *C.pseudotropicalis*, 2 (2%) *C.tropicalis*, 2 (2%) *S.cerevisiae* and 1 (1%) *C.parapsilosis*.

The susceptibilities of the yeast isolates to some antifungal agents such as nystatin, clotrimazole and miconazole were detected by using microdilution method. The MIC values showed that; nystatin was effective to all *C.albicans* strains and 88.6% other isolates; miconazole was effective to the 98.5% of *C.albicans* strains and also effective to all of other isolates. All yeast isolates were found susceptible to clotrimazole.

G İ R İ Ş

Doğada 50.000'den fazla mantar bulunmasına karşın, yaklaşık 100 kadarı insanlar için patojendir. İnsanlar mantarlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı oldukça

* Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

dirençlidir; fakat konağın bağışıklık sisteminin baskılanması, normal koşullarda patojen olmayan mantarların enfeksiyon oluşturmaya yol açmaktadır. Günümüzde tıbbi gelişmelerin hasta yaşamını uzatmaya yönelik yaklaşımları, mantarlar tarafından oluşturulan enfeksiyonların insidansında artışa neden olmaktadır (1, 2). Mantar enfeksiyonlarında kronikleşme eğilimi yetersiz ve yanlış ilaç kullanımı ile de ilişkilidir. Mikotik enfeksiyonlarda laboratuvar tanının derhal yapılarak tedavinin antifungal ilaçlara duyarlılık sonuçlarına göre, yeterli doz ve sürede yapılması son yıllarda çoğalmakta olan dirençli suşlara karşı mücadelede başarıyı artıracaktır (3-5).

Bu amaçla çalışmamızda vajinal akıntı örneklerinden izole ettiğimiz 100 maya suşu tiplendirilerek, izolatların antifungal maddelerden nistatin, klotrimazol ve mikonazol'e duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen vajinal akıntı örnekleri incelendi. 100 örnekte maya üremesi saptandı. İzole edilen suşlar; koloni morfolojileri, sıvı Sabouraud besiyerinde üreme özellikleri, siklohekzimit direnci, üreaz enzim aktivitesi, mısır unlu agar morfolojileri, klamidospore oluşumu, germ tüp oluşturma ve fermentasyon ile asimilasyon özelliklerine göre tiplendirildi (1, 6).

Maya izolatlarının vulvovajinit tedavisinde kullanılan nistatin, klotrimazol ve mikonazol'e duyarlılıkları MİK değerleri saptanarak araştırıldı. Duyarlılık deneylerinde mikrodilüsyon yöntemi uygulandı.

Mikrodilüsyon Yönteminin Uygulanışı

Maya Suşlarının Hazırlanması: Sabouraud Dextrose Agar (SDA)'da üretilen 24-48 saatlik kültürler kullanıldı. Maya suşları spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda % 95 transmittans verecek şekilde steril distile suda süspanse edildi.

Antimikotik Maddelerin Hazırlanması: Kullanılacak antimikotik maddelerin dimetilsulfoksit (DMSO)'te 1000 µg/ml'lik konsantre ana çözeltileri hazırlanıp, 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı. Deneyde her antimikotik madde için 50 µg/ml ile 0.05 µg/ml arasında ikişer kat azalan 11 dilüsyon uygulandı. Kontrol olarak antifungal madde içermeyen besiyerine ekim yapıldı. Dilüsyon işleminde mayaların üremesini sağlamak üzere katkılı Yeast Nitrogen Base (YNB) besiyeri kullanıldı.

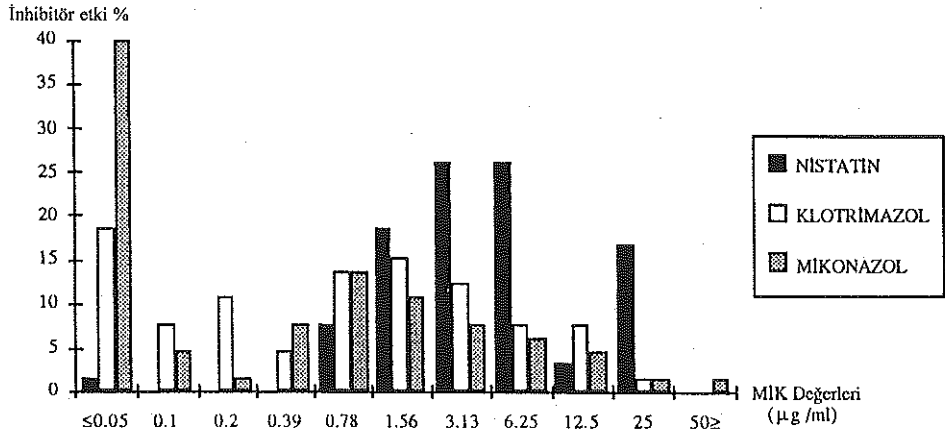
Mikrodilüsyon Yönteminin Uygulanması: Mikrodilüsyon yöntemi için 96 çukurlu U tipi mikropleytler kullanıldı. Birinci aşamada antimikotik maddelerin YNB'deki 11 dilüsyonundan 200'er µl çukurlara mikropipet ile konuldu. 12. çukura ise antifungal madde eklenmedi. İkinci aşamada 530 nm dalga boyunda % 95 transmittans verecek şekilde hazırlanmış maya süspanسیونundan çukurlara 10'ar µl ilave edildi. Üçüncü aşamada mikropleytlerin yüzeyi sterilize edilmiş cam plaklar ile kapatıldı ve seloteyle

hava almaması sağlandı. Mikropleytlar 37 °C'de 48 saat süreyle inkübe edildi ve bu süre sonunda üremenin gözle görülmediği en küçük dilüsyon saptanarak MİK değerleri belirlendi (7, 8).

B U L G U L A R

İncelenen 520 vajinal akıntı örneğinden 100 (% 19.2) adet maya izole edilmiştir. İzolatların 65'i (% 65) *C.albicans*, 14'ü (% 14) *C.glabrata*, 8'i (% 8) *C.krusei*, 3'ü (% 3) *C.guillermoidii*, 3'ü (% 3) *T.stellata*, 2'si (% 2) *C.pseudotropicalis*, 2'si (% 2) *C.tropicalis*, 2'si (% 2) *S.cerevisiae* ve 1 (% 1)'i *C.parapsilosis* olarak tanımlanmıştır.

Nistatin, klotrimazol ve mikonazol'e duyarlılıkları denenmiş *C.albicans* (% 65) suşlarının MİK değerleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1

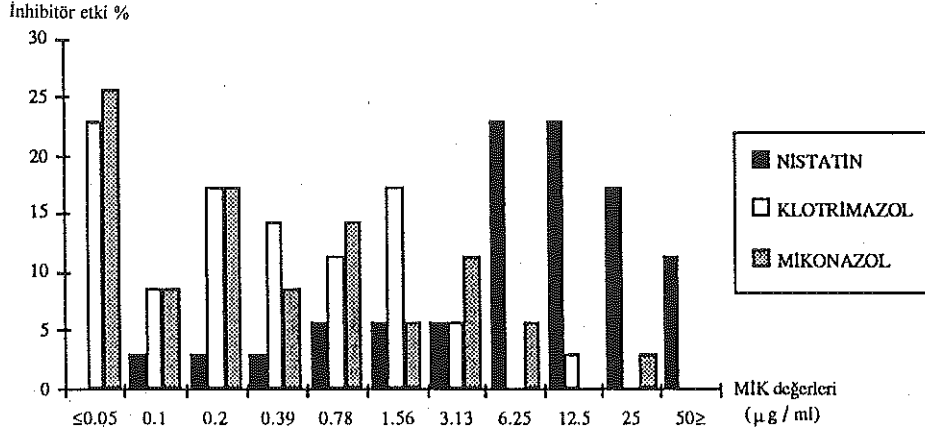
Antimikotik maddelerin *C.albicans* (65 suş)'a inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonların dağılımı.

C.albicans dışı izolatların (% 35) belirlenmiş olan MİK değerleri Şekil 2'de görülmektedir.

Antifungal maddelerden nistatin ile alınan sonuçlar Tablo 1'de, klotrimazol ile alınan sonuçlar Tablo 2'de ve mikonazol ile alınan sonuçlar Tablo 3'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çeşitli araştırmalarda vulvovajinit olgularında lokal olarak uygulanan antimikotik maddelerin vajina mukozası düzeyi ortalama 25 µg/ml olarak bildirilmiştir (7, 9). Çalışmamızda bu düzey dikkate alınarak yapılan değerlendirmede nistatin ile *C.albicans* suşlarının tümünde, diğer maya suşlarının % 88.6'sında; klotrimazol ile tüm maya suşlarında ve mikonazol ile *C.albicans* suşlarının % 98.5'inde, diğer suşların tümünde etkinlik saptanmıştır. Antifungal ajanların etkinliği sırasıyla klotrimazol, mikonazol ve nistatin olarak belirlenmiştir.

MAYA TÜRLERİNİN DUYARLILIĞI



Şekil 2 Antimikotik maddelerin *C.albicans* dışı (35 suş) izolatlarda inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonların dağılımı.

Tablo 1 Nistatin Konsantrasyonlarının (µg/ml) İnhibisyon Etkisine Göre Suşların Dağılımı

Suş	MİK Değeri (µg/ml)		≤ 0.05		0.10		0.20		0.39		0.78		1.56		3.13		6.25		12.5		25		50 ≥		
	Suş Sayısı	Sayı %	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
<i>C.albicans</i>	65	1 1.5	--	--	--	--	5	7.7	12	18.5	17	26.2	17	26.2	2	3.1	11	16.8	--	--	--	--	--	--	--
<i>C.glabrata</i>	14													4	28.6	5	35.7	3	21.4	2	14.3				
<i>C.krusei</i>	8													1	12.5	3	37.5	2	25	2	25				
<i>C.guillermoidii</i>	3				1	33.3					1	33.3	1	33.3											
<i>T.stellata</i>	3						1	33.3					1	33.3											
<i>S.cerevisiae</i>	2		1	50													1	50							
<i>C.tropicalis</i>	2						1	50									1	50							
<i>C.pseudotropicalis</i>	2										1	50										1	50		
<i>C.parapsilosis</i>	1										1	100													

Tablo 2 Klotrimazol Konsantrasyonlarının (µg/ml) İnhibisyon Etkisine Göre Suşların Dağılımı

Suş	MİK Değeri (µg/ml)		≤ 0.05		0.10		0.20		0.39		0.78		1.56		3.13		6.25		12.5		25		50 ≥		
	Suş Sayısı	Sayı %	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
<i>C.albicans</i>	65	12 18.5	5	7.7	7	10.8	3	4.6	9	13.8	10	15.4	8	12.3	5	7.7	5	7.7	1	1.5	--	--	--	--	
<i>C.glabrata</i>	14	1 7.1	2	14.3	1	7.1	3	21.4	2	14.3	3	21.4	1	7.1			1	7.1							
<i>C.krusei</i>	8	2 25			1	12.5	2	25	1	12.5	1	12.5	1	12.5											
<i>C.guillermoidii</i>	3	1 33.3			2	66.6																			
<i>T.stellata</i>	3				2	66.6					1	33.3													
<i>S.cerevisiae</i>	2	1 50	1	50																					
<i>C.tropicalis</i>	2	1 50											1	50											
<i>C.pseudotropicalis</i>	2	1 50											1	50											
<i>C.parapsilosis</i>	1												1	100											

Tablo 3
Mikonazol Konsantrasyonlarının ($\mu\text{g/ml}$) İnhibisyon
Etkisine Göre Suşların Dağılımı

Suş	MİK Değeri ($\mu\text{g/ml}$)																						
	Suş Sayısı	≤ 0.05		0.10		0.20		0.39		0.78		1.56		3.13		6.25		12.5		25		$50 \geq$	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>C.albicans</i>	65	26	40	3	4.6	1	1.5	5	7.7	9	13.8	7	10.8	5	7.7	4	6.3	3	4.6	1	1.5	1	1.5
<i>C.glabrata</i>	14					3	21.4	2	14.3	1	7.1	2	14.3	3	21.4	2	14.3						
<i>C.krussi</i>	8	2	25	1	12.5	2	25	1	12.5	2	25												
<i>C.guilliermondii</i>	3	2	66.6											1	33.3								
<i>T.stellata</i>	3	2	66.6	1	33.3																		
<i>S.cerevisiae</i>	2	1	50							1	50												
<i>C.tropicalis</i>	2	1	50							1	50												
<i>C.pseudotropicalis</i>	2	1	50	1	50																		
<i>C.parapsilosis</i>	1									1	100												

T A R T I Ş M A

Kandida türlerinin oluşturduğu vulvovajinit tablosu toplumda yaygın olarak görülmekte olup, tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu enfeksiyonların kronikleşme ve tekrarlama özelliği vardır (3, 4, 10-12). Tekrarlama ile ilgili olarak giyim ve kullanım malzemeleri, barsaktaki maya kolonizasyonu ve eşlerdeki kolonizasyonun rolü bilinmektedir (10, 13, 14). Enfeksiyon, bireylerde oluşturduğu olumsuz etkilerin yanısıra gebelikte bebeğe de yansıyan önemli komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu olumsuzluklardan kaçınmak için hastalığın tanı ve tedavisinin ivedilikle yapılması gerekmektedir. Maya enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antimikotik maddelerin sayısı giderek artmakta ve tedavide yeni seçenekler ortaya çıkmaktadır. Maya suşlarının uzun yıllardır kullanılan polien ve imidazol grubu bazı antimikotik maddelere direnç kazandığı bildirilmektedir. Bu nedenle bu ajanların gelişigüzel kullanılmaması ve izole edilen maya suşu ile antimikotik maddelere duyarlılık deneylerinin mutlaka yapılması gereklidir (15-18).

Antifungal duyarlılık testlerinde makro ve mikrodilüsyon, agar dilüsyon ile disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak yapılan duyarlılık testlerinde bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Bunlardan biri mantarların küf, maya ve dimorfik şekil gibi farklı morfolojik özellik göstermeleridir. Bu durum duyarlılık testlerinin standardize edilmesini güçleştiren faktörlerden biridir. İnokulum miktarı ve hazırlanışı, besiyeri içeriği, pH'sı, inkübasyon koşulları gibi faktörler test sonuçlarını etkilemektedir. Antifungal maddelerin çözünürlüğü, kimyasal stabilitesi, etki tarzı gibi özellikler sonuçlar üzerine etkili olmaktadır. Bu faktörlerin standardize edildiği test metodları henüz geliştirilmediği için invitro antimikotik duyarlılık testlerinin yorumu zor olmaktadır. Standardizasyon çalışmaları halen devam etmekte olup, mikrodilüsyon metodunun güvenilirliği açısından gelecekte gerçekleştirilecek olan standardizasyonda önemli bir basamak olduğu bildirilmektedir (6, 8, 15, 18). Çalışmamızda da mikrodilüsyon metodu ile maya izolatlarının antifungal maddelere duyarlılığı araştırılmıştır.

Vulvovajinit tedavisinde polien ve imidazol grubu antimikotik maddeler kullanılmaktadır. Yan etkilerinin en aza indirildiği ve ayrıca daha yüksek doku düzeyleri elde edilebildiği için tedavide bu ajanların lokal uygulaması daima tercih edilmelidir. Vulvovajinit tedavisinde lokal uygulama, ajanlarda doku düzeyinin yaklaşık 25 µg/ml olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda saptanan MİK değerleri bu düzey dikkate alınarak değerlendirilmiştir (7, 9, 19).

Çalışmamızda nistatine duyarlılıkları denenen maya suşlarından; *C.albicans* suşlarının tümünün MİK değerlerinin 25 µg/ml altında olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *C.glabrata* suşlarının 2'si (% 14.3) ve *C.krusei* suşlarının 2'sine (% 25) bu ajan etkili bulunmamıştır. *C.albicans* dışı izolatlar toplu olarak değerlendirildiğinde nistatin'e duyarlılığın % 88.6 oranında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (7, 16, 20).

Klotrimazol'le alınan sonuçlar ise ajanın tüm izolatlara etkili olduğunu göstermektedir.

Antifungal ajanlardan mikonazol'le elde ettiğimiz sonuçlarda 1 *C.albicans* suşu (% 1.5) dışında diğer tüm maya izolatlarında bu maddeye karşı duyarlılık saptanmıştır. Mikonazol ve klotrimazol ile elde ettiğimiz sonuçlar da literatürle uyumlu bulunmuştur (7, 10, 16, 20).

Antimikotik maddelerle yapılan çalışmalarda maya suşlarının etkilendikleri inhibitör konsantrasyonların farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle etkenin izolasyonunu takiben identifikasyonun derhal yapılarak antimikotik duyarlılık deneylerinin uygulanması ile tedavide başarı şansının artacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Finegold SM, Baron EJ: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7th Ed, pp 678-774, The CV Mosby Co. 1986, St Louis.
2. Unat EK: Tıp Parazitolojisi, III. Baskı, s 751-64, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları No: 113, 1982, İstanbul.
3. Milson J, Forssman L: Repeated candidiasis: reinfection or recrudescence? A review. Am J Obstet Gynecol, 152: 946, 1985.
4. Sobel JD: Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol, 158: 924, 1985.
5. Sungur C, Akalın HE: Antifungal ajanlar. "Akalın HE (ed): Antibiyotikler". s 147-156, Türk Tabipler Birliği Yayınları, 1989, Ankara.
6. Fromting RA, Dixon DM: Fungi. "Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): Manual of Clinical Microbiology". 5th Ed, pp 579-630, Amer Soc Microb, 1991, Washington.
7. Aktan G: Gebe olan ve olmayan kadınlarda maya enfeksiyonlarının araştırılması, Doktora Tezi, 1988, İstanbul.
8. Guinet R, Nerson D, Closet FD, Camet JD, Kures L, Marjollet M, Poirot JL, Ros A, Maugein JT, Volle PJ: Collaborative evaluation in seven laboratories of a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. J Clin Microbiol, 26: 2307, 1988.

9. Warnock DW, Spellerr DC: Antifungals today. *J Antimicrob Chemother*, 10: 164, 1982.
10. Kingborn GR: Vaginal Candidiasis: an overview. "Richardson RG (ed): Fluconazole and its role in vaginal candidiasis" pp 1-6, Alden Press, 1989, Oxford.
11. Trumbare DJ, Sobel JD: Reccurent vulvovaginal candidiasis: Vaginal epithelial cell susceptibility to *C.albicans* adherence. *Obstet Gynecol*, 67: 810, 1986.
12. Segal E, Saroka A, Schechter A: Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells in vitro and candidal vaginitis. *J Med Vet Mycol*, 22: 191, 1984.
13. Elegbe IA, Batu M: A preliminary study on dressing patterns and incidence of candidiasis. *Am J Public Health*, 72: 176, 1982.
14. Elegbe IA, Elegbe I: Quantitative relationships of *Candida albicans* infections and dressing patterns in Nigerian women. *Am J Public Health*, 73: 450, 1983.
15. Bennett JE: Antifungal agents. "Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds): The pharmacological Basis of Therapeutics", 8th Ed, pp 1165-81, Permagon Press, 1990, USA.
16. Can H: *Candida* cinsinden mayaların tür tanısı ve antifungal kemoterapötik maddelere duyarlılıkları. Doktora Tezi, 1985, İstanbul.
17. Güvener Z: Çeşitli ağız hastalıklarından ve normal bireylerden izole edilen *Candida* suşları ve antifungal antibiyotiklere hassasiyetleri. Doktora Tezi, 1982, İstanbul.
18. Özalp M, Yuluğ N: Yüzeyel mikozlarda etken olan *Candida* türleri ve bazı imidazol türevlerine duyarlılıkları, *İnfeksi Derg*, 4: 645, 1990.
19. Miller PI, Humphries M, Grassick K: A single blind comparison of oral and intravaginal treatments in acute and reccurent vaginal candidiasis in general practise. *Pharmatherapeutica* 3 (9): 582, 1984.
20. Akgün Y: Klinik olgulardan izole edilen kandidaların tiplendirilmesi ve antimikotik duyarlılıklarının saptanması. Uzmanlık Tezi, 1980, Eskişehir.