

KISA BİLDİRİ:
ASPERGILLUS TÜRLERİNİN KASPOFUNGİNE KARŞI İN VİTRO
DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA MİNİMUM İNHİBİTÖR VE MİNİMUM
ETKİLİ KONSANTRASYON DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SHORT COMMUNICATION:
 COMPARISON OF MINIMUM INHIBITORY AND MINIMUM EFFECTIVE
 CONCENTRATION VALUES FOR THE DETECTION OF IN VITRO
 SUSCEPTIBILITIES OF *ASPERGILLUS* SPECIES AGAINST CASPOFUNGIN

Aydan ÖZKÜTÜK¹, Dilek Yeşim METİN², Cem ERGON¹
Mine YÜCESOY¹, Süleyha HİLMİOĞLU POLAT²

ÖZET: Kaspofungin, özellikle dirençli invazif aspergilloz tedavisinde ümit verici olan ekinokandin grubu antifungal ilaçlardandır. *Aspergillus* türlerinin kaspofungine karşı in vitro duyarlılığının araştırılmasında "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından tanımlanmış standart bir yöntem bulunmamaktadır. Üremede belirgin azalmanın görüldüğü minimum inhibitör konsantrasyon (MİK-2) ve minimum etkili (effective) konsantrasyon (MEK) değerleri, kaspofunginin duyarlılık test sonucunu belirlemede en sık kullanılan ölçümlerdir. Bu çalışmanın amacı kaspofunginin CLSI M-38A belgesine göre *Aspergillus* türlerine karşı in vitro aktivitesinin değerlendirilmesi ve MİK okuma değeri olarak MİK-2 ile MEK değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmasıdır. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen 18 *A.fumigatus*, yedi *A.flavus*, beş *A.niger* ve iki *A.versicolor* olmak üzere 32 suş alınmıştır. Suşların in vitro duyarlılığı, sıvı mikrodilüsyon testiyle %2 glikozlu RPMI 1640 besiyeri kullanılarak, 0.03-16 µg/ml kaspofungin konsantrasyon aralığında CLSI önerilerine göre araştırılmıştır. Çalışılan suşların MİK-2 ve MEK değerleri arasındaki uyum, 24 saatlik inkübasyon sonunda ±1 dilüsyonda %53 iken, 48 saatlik inkübasyonda %100 olarak belirlenmiştir. Kırksekiz saatlik inkübasyon sonunda suşların %93'ünde MEK ve MİK-2 değeri aynı olarak saptanmış, %7'sinde ise ±1 dilüsyon farkı bulunmuştur. MEK değerlerinin, her iki inkübasyon süresinde de MİK-2'ye göre daha stabil kaldığı izlenmiştir. Sonuç olarak MEK değeri, MİK-2 skoruna göre *Aspergillus* türlerinde in vitro kaspofungin aktivitesinin araştırılmasında daha kolay ve objektif olarak belirlenebilen stabil bir ölçüm değeridir.

Anahtar sözcükler: Kaspofungin, antifungal duyarlılık testleri, minimum etkili konsantrasyon.

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (aydan.ozkutuk@edu.edu.tr)

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

ABSTRACT: Caspofungin is a promising echinocandin-group antifungal agent used especially in the treatment of resistant invasive aspergillosis. The guidelines for in vitro susceptibility testing of *Aspergillus* species against caspofungin are not described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The minimum inhibitory concentration that showed a prominent reduction of growth (MIC-2) and minimum effective concentration (MEC) endpoints are frequently used for the susceptibility testing of caspofungin as MIC determination criteria. The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of caspofungin against *Aspergillus* species and to compare MIC-2 and MEC endpoints in the determination of MICs. A total of 32 *Aspergillus* species (18 *A.fumigatus*, seven *A.flavus*, five *A.niger*, and two *A.versicolor*) isolated from different clinical samples were included to the study. In vitro susceptibilities of the strains against 0.03-16 µg/ml caspofungin concentrations were searched by broth microdilution method as recommended by CLSI M-38A document, with the use of glucose supplemented 2% RPMI 1640 media. The MIC-2 and MEC endpoints were determined both at 24 and 48 hours. The concordance between MIC-2 and MEC endpoints of the strains at 24 and 48 hours incubations was found as 53% and 100%, respectively, with the difference of ±1 dilution. MIC-2 and MEC measurements showed the same values at the end of 48 hours, whereas 7% showed differences in ±1 dilution. MEC endpoints were also found to be more stable than MIC-2 in both of the incubation periods. In conclusion, MEC value is a more objective and stable endpoint and easier to use than MIC-2 for testing in vitro caspofungin activity against *Aspergillus* species.

Key words: Caspofungin, antifungal susceptibility tests, minimum effective concentration.

GİRİŞ

Kaspofungin, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde diğer tedavilere dirençli invazif aspergilloz ve ösofajiyal *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması onaylanmış ümit vadeden ekinokandin grubu ilaçlardandır¹. Bu grupta yer alan ilaçlar, mantar hücre duvarındaki β-1,3-D-glukan sentezini inhibe ederek etki göstermektedirler².

Günümüzde *Aspergillus* türlerinin kaspofungine in vitro duyarlılıklarının araştırılmasında "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından tanımlanmış standart bir yöntem bulunmamaktadır. Kaspofunginin *Aspergillus* ve diğer filamentöz mantarlara karşı in vitro etkisinin araştırılmasında sıvı mikrodilüsyon testi kullanılmış, bu amaçla değişik besiyerleri, inkübasyon süreleri ve sonuç değerlendirme kriterleri uygulanmıştır²⁻⁵. Bunun yanı sıra E-test ve disk difüzyon testlerinin sıvı mikrodilüsyon testi ile karşılaştırmalı çalışmaları da mevcuttur^{5,6}.

Kaspofungin ile yapılan in vitro duyarlılık çalışmalarında, üremede belirgin azalmanın görüldüğü minimum inhibitör konsantrasyon değeri (MİK-2) ve minimum etkili (effective) konsantrasyon (MEK) değerleri, in vitro duyarlılık test sonucunu belirlemede en sık kullanılan ölçümlerdir. MEK değeri, hifal hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin (kısa, uçları güdükleşmiş ve balonlaşmış hiflerin oluşması) mikroskopik olarak gözlenmesi olarak tanımlanmıştır. Ekinokandinler için son noktanın belirlenmesinde MEK değerinin MİK değerine göre klinik sonuçlar ile daha iyi uyum gösterdiği bildirilmiştir⁵⁻⁸.

Bu çalışmada, *Aspergillus* türlerinin kaspofungine karşı in vitro duyarlılıklarının saptanmasında sıvı mikrodilüsyon testi ile farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen MİK-2 ve MEK değerlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden izole edilerek saklanmış 32 *Aspergillus* suşu (18 *A.fumigatus*, 7 *A.flavus*, 5 *A.niger* ve 2 *A.versicolor*) dahil edildi. Suşlar patates dekstroz agar (PDA) (Difco, Becton Dickinson, USA) besiyerinde canlandırıldıktan sonra çalışmaya alındı. *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C.krusei* ATCC 6258 standart suş olarak kullanıldı.

Sıvı mikrodilüsyon testi, CLSI tarafından önerilen şekilde uygulandı⁹. Besiyeri olarak, %2 glikozlu RPMI 1640 (Sigma, USA) kullanıldı. Kaspofungin, Merck Araştırma Laboratuvarı'ndan (NJ Rahway, 07065-0900, USA) toz madde olarak sağlandı ve 0.03-16 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanarak kullanıldı. İnokulum süspansiyonları *Aspergillus* türlerinin PDA'daki 7 günlük kültürlerinden CLSI önerileri doğrultusunda hazırlandı⁹. İnokulum miktarı spektrofotometrik olarak 10⁴ konidya oluşturan birim/ml'ye ayarlandı ve Sabouraud dekstroz agara (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) kantitatif ekim yapılarak koloni sayısı doğrulandı.

Üremede belirgin azalmanın görüldüğü en düşük konsantrasyon (yaklaşık %50 inhibisyon) MİK-2 değeri olarak belirlendi. Mikroskopik olarak kısa, uçları güdükleşmiş ve balonlaşmış hiflerin görüldüğü en düşük konsantrasyon ise MEK değeri olarak saptandı. MİK-2 ve MEK düzeyleri, inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde iki farklı araştırmacı tarafından değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, kaspofunginin suşlar üzerinde oldukça düşük MİK değerlerine sahip olduğu saptanmış; 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen MİK-2 ve MEK ölçümleri ile alınan değerler Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I. Kaspofunginin 24 ve 48. Saatlik İnkübasyondaki MİK ve MEK Değerleri

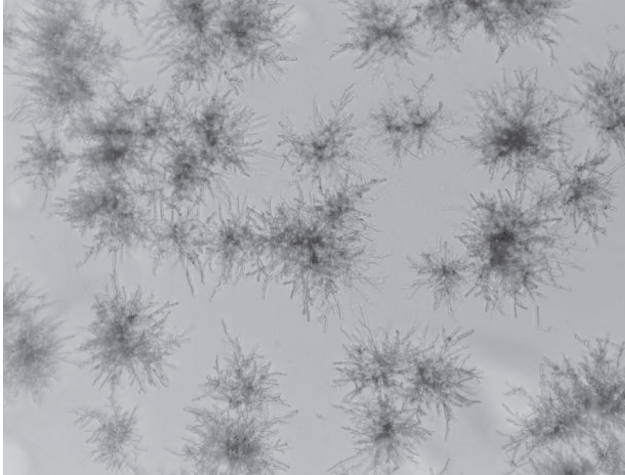
Suşlar		İnkübasyon süresi (saat)	MİK Aralıkları (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)	Geometrik ortalama (µg/ml)
<i>A.fumigatus</i>	MİK-2	24	0.03-0.125	0.125	0.08
		48	0.25	0.25	0.25
	MEK	24	0.125-0.50	0.50	0.27
		48	0.25-0.50	0.25	0.26
<i>fumigatus</i> dışı	MİK-2	24	0.03-0.125	0.25	0.12
		48	0.06-0.25	0.25	0.20
	MEK	24	0.03-0.50	0.25	0.16
		48	0.06-0.25	0.25	0.21

Tüm suşların MİK-2 değerleri incelendiğinde, inkübasyonun 24 ve 48. saatleri arasında 16 suшта (%50) 2 dilüsyon, 8 suшта (%25) 1 dilüsyonluk bir yükselme gözlenmiş, yalnızca 8 suшта (%25) aynı MİK değerinde kalmıştır. MEK değerleri ise 24 ve 48. saatler arasında suşların 18'inde (%56) aynı, 14'ünde (%44) ise 1 dilüsyon yüksek olarak saptanmıştır.

MİK-2 ile MEK değerleri karşılaştırıldığında; ± 1 dilüsyonda uyum, 24 saatlik inkübasyon sonunda %53 iken, 48 saatlik inkübasyonda %100 olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen MİK-2 değerleri, her iki inkübasyon süresinde elde edilen MEK değerleri ile daha uyumludur. 48 saatlik inkübasyon sonucunda suşların %93'ünde MEK ve MİK-2 değeri aynı saptanmış, %7'sinde ise ± 1 dilüsyon farklı bulunmuştur.

Suş sayısı tür düzeyinde analiz için yeterli olmadığından dolayı, sonuçlar *fumigatus* ve *fumigatus* dışı *Aspergillus* suşları olarak gruplandırılarak değerlendirme yapılmıştır. Her iki grupta MİK-2 ile MEK değerleri karşılaştırıldığında, 24 saatlik inkübasyon sonucunda ± 1 dilüsyonda uyum *A.fumigatus* suşlarında %28 iken, *fumigatus* dışı suşlarda %79 olarak saptanmıştır. 48 saatlik inkübasyonda ise uyum her iki grupta da %100 olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon ile elde edilen MİK-2 değerleri, her iki inkübasyon süresinde elde edilen MEK değerleri ile daha uyumludur.

MEK değerlerinin belirlenmesi, mikroskopta kolay ve objektif olarak yapılabilmektedir (Resim 1).



Resim 1. MEK değerinin saptanmasında kaspofunginin bir *Aspergillus* suşu üzerindeki mikroskopik görünümü.

TARTIŞMA

Aspergillus türlerine karşı ekinokandinlerin in vitro duyarlılıklarının saptanmasında standart koşullar CLSI belgesinde bulunmadığı için uygun koşulların belirlenebilmesi amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Arıkan ve

arkadaşlarının⁵ kaspofungin ile yaptığı çalışmada, *Aspergillus* suşlarının RPMI 1640 besiyerine göre %2 dekstrozu RPMI 1640 besiyerinde daha yüksek, “antibiotic medium 3” besiyerinde ise daha düşük MİK değerleri gösterdiği; MİK değerinin inkübasyon süresinden etkilenmesi nedeniyle MEK değerinin son noktanın belirlenmesinde daha uygun olduğu belirtilmiştir. Kaspofunginin *Aspergillus* türlerine karşı in vitro etkisinin araştırılmasında “antibiotic medium 3” besiyerinin kullanılması, sonuçların besiyerinin üretim serisine (lot) göre değişkenlik göstermesi nedeniyle kısıtlanmaktadır¹⁰. *Aspergillus* türlerinin kaspofungine karşı in vitro duyarlılıklarının saptanabilmesi için, uygun koşulların belirlenmesi amacıyla 17 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada, kaspofunginin MİK değerlerinin belirlenmesinde sorun olduğu, buna karşın laboratuvarlar arası belirlenen MEK değerinin RPMI 1640 besiyeri ile daha iyi uyum gösterdiği bildirilmektedir¹¹. Çalışmamızda besiyeri olarak %2 glukozlu RPMI 1640 kullanılmış, MEK ve MİK-2 değerlendirilmesinde iki araştırmacı tarafından saptanan değerler arasında fark bulunmamıştır.

İnkübasyon süresinin MEK ve MİK-2 değerleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda MİK-2 değerinde inkübasyon süresine paralel olarak bir artış saptanırken, MEK değerinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir⁵. Diğer bir ekinokandin türevi olan mikafungin ile yapılan bir çalışmada da, RPMI 1640 besiyerinde 24 saatlik incelemede, MİK-2 skoru ile MEK değerinin aynı olduğu ancak 48 saatte MİK-2 skorunun arttığı ve MEK ile uyumunun bozulduğu belirtilmiştir¹². Yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Aspergillus* türlerine karşı kaspofunginin in vitro etkisinin belirlenmesinde MEK değeri MİK-2'ye göre daha stabil bir ölçüm değeri gibi görünmektedir. Çalışmamızda da bu bulgulara paralel olarak, MEK değeri MİK-2 değerine göre daha stabil bulunmuş ve her iki inkübasyon süresinde de benzer MİK değerleri elde edilmiştir. Ayrıca MEK değeri saptanmasının, MİK-2 değeri saptanmasına göre daha kolay ve objektif olduğu da gözlenmiştir.

Kaspofungin MEK değerinin düşük bulunduğu in vitro çalışmaların sonuçlarının fare aspergilloz modelinde elde edilen in vivo sonuçlarla uyumlu olduğu, kaspofungine benzer şekilde, anidulafungin için de genelde düşük MİK değerleri elde edildiği bildirilmektedir¹⁰. Ancak, yüksek MİK/MEK değerleri elde edildiğinde klinik yanıt ile uyumun nasıl olacağı henüz belirsizdir.

Sonuç olarak, *Aspergillus* türlerinin kaspofungine karşı in vitro duyarlılığının araştırılmasında, MEK değerinin MİK okuma değeri olarak kabul edilmesinin, MİK-2 değerine göre daha kolay ve objektif bir ölçüm olduğu düşünülmüş, ancak yöntemin standardize edilebilmesi için klinik korelasyonun birlikte değerlendirildiği çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Keating GM, Jarvis B. Caspofungin. Drugs 2001; 61: 1121-9.
2. Bartizal C, Odds FC. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2100-7.

3. Odds FC, Motyl M, Andrade R, et al. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3475-82.
4. Serrano MC, Valverde-Conde A, Chavez M, et al. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus spp.* *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 131-5.
5. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 327-30.
6. Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3084-7.
7. Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus spp.* to caspofungin acetate (MK-0991). *J Clin Microbiol* 2003; 41: 403-9.
8. Kurtz MB, Heath IB, Marinan J, Drekorn S, Onishi J, Douglas C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1480-9.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard, NCCLS Document M38-A. 2002. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, Pa.
10. Espinel-Ingroff A. Utility of mould susceptibility testing. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 527-32.
11. Torres HA, Rivero GA, Lewis RE, Hachem R, Raad II, Kontayiannis DP. Aspergillosis caused by non-*fumigatus Aspergillus* species: risk factors and in vitro susceptibility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 25-8.
12. Arikan S, Yurdakul P, Hasçelik G. Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of micafungin against *Aspergillus spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2640-3.