

ÖZGÜN ÇALIŞMA
CANDIDA TÜRLERİNİN AMFOTERİSİN B'YE DUYARLILIĞININ
E-TEST VE İKİ FARKLI BESİYERİ İLE ÖNERİLMİŞ OLAN DİRENÇ
SINIR DEĞERLERİNE GÖRE ARAŞTIRILMASI*

ORIGINAL ARTICLE

DETERMINATION OF IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *CANDIDA* SPECIES
 TO AMPHOTERICIN B BY E-TEST AND PREVIOUSLY PROPOSED MIC
 BREAKPOINTS ON TWO DIFFERENT MEDIA

Şehnaz ALP¹, Banu SANCAK¹, Sevtap ARIKAN¹

ÖZET: *Candida* türlerinde amfoterisin B'ye in vitro direncin saptanması ile ilgili teknik sorunlar halen devam etmektedir. Bu çalışmada, 212 *Candida* suşunun (57 *C.glabrata*, 53 *C.lusitaniae*, 51 *C.krusei* ve 51 *C.tropicalis*) amfoterisin B minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri E-test yöntemiyle %2 glukozlu RPMI 1640 (RPG) agar ve %2 glukozlu antibiyotik medium 3 (AM3) agarda saptanmış, önceden önerilmiş olan direnç sınır değerlerine göre (RPG agarda $\geq 0.38 \mu\text{g/ml}$, AM3 agarda $>1 \mu\text{g/ml}$) duyarlılık profilleri belirlenmiş ve her iki besiyerinde elde edilen duyarlılık kategorileri arasındaki uyum oranı hem tüm suşlar için hem de türe göre belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların tümü E-test yöntemiyle 48 saat inkübasyonun ardından AM3 besiyerinde amfoterisin B'ye duyarlı bulunurken, RPG besiyerinde %36.3'ü amfoterisin B'ye dirençli bulunmuştur. RPG besiyerinde amfoterisin B'ye direnç oranı *C.krusei* izolatlarında %94.1, *C.tropicalis* izolatlarında %35.3, *C.glabrata* izolatlarında %17.5 olarak saptanırken, *C.lusitaniae* izolatlarının tamamına yakınının (%98.1) duyarlı olduğu belirlenmiştir. AM3 ve RPG agarda elde edilen amfoterisin B duyarlılık profilleri arasında 48 saat inkübasyon sonrası *C.lusitaniae* ve *C.glabrata* izolatlarında sırasıyla, %98.1 ve %82.5 oranında uyum gözlenirken, uyumun *C.tropicalis*'te %64.7, *C.krusei*'de ise %5.9 olduğu görülmüştür. Bu bulgular, *Candida* suşlarında AM3 ve RPG agarda amfoterisin B E-test için önerilen direnç sınır değerleri dikkate alınarak belirlenen duyarlılık profilleri arasında önemli ölçüde uyumsuzlukların ortaya çıkabildiğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Candida, duyarlılık, amfoterisin B, E-test, direnç sınır değeri.

ABSTRACT: Although much work has concentrated on defining a reliable and reproducible method for determining in vitro susceptibility of *Candida* species to amphotericin B, there still has been limitations of the proposed techniques. In this study, amphotericin B minimal inhibitory concentrations (MIC) and susceptibility

* Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından (Proje no: 05 D 09 101 001) desteklenmiştir.

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (sehnaz@hacettepe.edu.tr)

categories of 212 *Candida* strains (57 *C.glabrata*, 53 *C.lusitaniae*, 51 *C.krusei* and 51 *C.tropicalis*) were determined by E-test on RPMI agar (RPG) and antibiotic medium 3 agar (AM3) both supplemented with 2% glucose. The results were interpreted according to the proposed MIC breakpoints ($\geq 0.38 \mu\text{g/ml}$ on RPG, $>1 \mu\text{g/ml}$ on AM3) and discrepancies between susceptibility categories were investigated. While all *Candida* strains included in the study were determined to be susceptible on AM3 by amphotericin B E-test at 48h, 36.3% of the isolates were classified as resistant on RPG at 48 hours. On RPG, *C.krusei* strains showed the highest resistance rate (94.1% at 48 h), followed by *C.tropicalis* (35.3% at 48 h) and *C.glabrata* (17.5% at 48h). At 48h of incubation, 98.1% of *C.lusitaniae* isolates were found to be susceptible on RPG. The categorical agreement rates between the results obtained on two media and for *C.lusitaniae* and *C.glabrata* were 98.1% and 82.5% at 48 hours. For *C.tropicalis* and *C.krusei*, the rates of agreement were 64.7% and 5.9% at 48 hours. Conclusively, according to the previously proposed MIC breakpoints for amphotericin B E-test on RPG and AM3, discrepancies between susceptibility categories of *Candida* species were of remarkable significance.

Key words: Candida, susceptibility, amphotericin B, E-test, MIC breakpoint.

GİRİŞ

Sistemik mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığındaki artış ve tedavide veya profilaksizde kullanılabilecek antifungal ilaç seçeneklerinin çoğalmış olması, uygulanacak antifungal ilaç seçiminin önemini artırmıştır. Özellikle amfoterisin B'nin bazı *Candida* türleri ile oluşan enfeksiyonlardaki tedavi başarısızlığı ve flukonazol direncine ilişkin bildirimler bu konudaki ilgiyi daha da yoğunlaştırmıştır¹⁻⁴.

"Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" [eski ismiyle "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)"] tarafından maya mantarlarının antifungal duyarlılıklarının araştırılması için önerilen referans yöntem ile *Candida* türlerinde azol grubu ilaçlar ve flusitozin için direnç sınır değerleri belirlenmiş olmasına karşın, amfoterisin B için direnç sınır değeri henüz saptanamamıştır⁵. Referans yöntemin uygulanmasıyla, *Candida* türlerinde amfoterisin B için dar bir MİK aralığı elde edilebildiği ve amfoterisin B'ye dirençli *Candida* suşlarının ayırımının sağlanamadığı gözlenmiştir. Buna karşılık, %2 glukozlu antibiyotik medium 3 (AM3) agarda ve %2 glukozlu RPMI 1640 (RPG) agarda E-test yönteminin geniş bir MİK aralığı oluşturarak amfoterisin B'ye dirençli *Candida* suşlarının ayırımını sağlayabildiği öne sürülmüştür⁶⁻⁸. E-test yöntemiyle, 48 saat inkübasyon sonunda AM3 besiyerinde $1 \mu\text{g/ml}$ 'nin üzerindeki; RPG besiyerinde ise $0.38 \mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki amfoterisin B MİK değerinin *Candida* türlerinde klinik direnci yansıtılabildiği bildirilmiştir^{8,9}. Ancak, bu veriler diğer çalışmalarla desteklenip kesinlik kazanmamış, hatta şimdiye kadar denenmiş olan in vitro duyarlılık test yöntemlerinin hiçbirisinin klinik yanıtı yansıtma da yeterli olmadığına dair sonuçlar da rapor edilmiştir¹⁰.

Bu çalışma, farklı *Candida* türlerinin amfoterisin B MİK değerlerini AM3 ve RPG besiyerlerinde E-test yöntemiyle araştırılması ve Peyron ve arkadaşları⁸ tarafından önerilmiş olan direnç sınır değerlerine göre elde edilen duyarlılık sonuçları arasındaki uyum oranının saptanması amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida suşları: Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda 1998 ile 2006 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen 212 *Candida* suşu (57 *C.glabrata*, 53 *C.lusitaniae*, 51 *C.krusei*, 51 *C.tropicalis*) dahil edildi. Bu türler, amfoterisin B (AMB)'ye primer veya sekonder direnç gözlenebilen *Candida* türleri¹¹⁻¹⁸ arasında yer aldığı için tercih edildi. Suşlar, koloni morfolojisi, germ tüp oluşturma özelliği, mısır unlu Tween 80 besiyerinde oluşturdukları morfolojik özelliklerin mikroskopik olarak incelenmesi ve ID 32 C kiti (BioMerieux, Fransa) kullanılarak saptanan karbonhidrat asimilasyon profilleri esas alınarak tanımlandı ve çalışılncaya kadar -20°C'de, %20 gliserollü beyin kalp infüzyon buyyonu içinde saklandı.

Suşların üretilmesi: Suşların, -20°C'de saklanmakta oldukları derin dondurucudan çıkarılıp, oda sıcaklığında çözünmeleri beklendikten sonra Sabouraud dekstroz agara (SDA) (Merck) ardışık iki kez pasajları yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası duyarlılık testleri uygulandı.

İnokulum hazırlanması: İnokulum, CLSI tarafından maya mantarlarının mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal duyarlılıklarının araştırılması için önerilen M27-A2 referans metottaki inokulum hazırlama prosedürü esas alınarak hazırlandı⁵. Bu amaçla, çalışmaya dahil edilen tüm klinik suşlar ile testler sırasında kullanılacak olan kalite kontrol suşu *C.krusei* ATCC 6258 ve in vivo dissemine kandidoz hayvan modelinde AMB'ye dirençli olduğu saptanmış bir izolat olan *C.lusitaniae* 2887 (CL2887)² duyarlılık testlerinin uygulanacağı günden 24 saat önce SDA'ya pasajlandı ve 37°C'de inkübe edildi. CL2887 suşu, Dr. John H. Rex'in (University of Texas at Houston, Houston, TX, USA) laboratuvar koleksiyonundan temin edildi.

Steril tüplere 5 ml steril %0.9'luk NaCl (serum fizyolojik=SF) konuldu ve üretilen *Candida* kolonileri yuvarlak öze yardımıyla alınıp, SF içine homojenize edilerek eklendi. Elde edilen süspansiyonlar 15 saniye vortekslendikten sonra, spektrofotometrik ölçümlerle (Helios ϵ ThermoSpectronic) gerektiğinde steril SF, gerektiğinde *Candida* kolonilerinin homojenize edilerek eklenmesiyle, 530 nm'de %75-80 geçirgenlikte, yaklaşık 10^6 blastokonidya/ml içerecek şekilde hazırlandı.

E-test yönteminin uygulanması: Test edilecek her bir suşa ait inokulum, eküvyon aracılığıyla AM3 ve RPG besiyerlerinin yüzeyine düzgün ve eşit dağılım sağlanacak şekilde yayıldı ve kurumaları için yaklaşık 15 dakika beklendikten sonra AMB E-test şeritleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) plakların ortasına yerleştirildi. Plaklar 37°C'de 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından iki farklı araştırmacı tarafından değerlendirildi. E-test şeridi çevresinde oluşan inhibisyon elipsinde, üremenin %100 inhibe olmasını sağlayarak E-test şeridini kesen en düşük konsantrasyon AMB MİK değeri olarak kaydedildi.

Sonuçların değerlendirilmesi: Her suş için AM3 ve RPG besiyerinde elde edilen AMB MİK değerleri karşılaştırıldı. Peyron ve arkadaşları⁸ tarafından yapılan çalışmada belirtilen direnç sınır değeri önerileri doğrultusunda, AM3

ve RPG besiyerinde MİK değerleri sırasıyla $>1 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 0.38 \mu\text{g/ml}$ olarak saptandığı takdirde suş AMB'ye dirençli, belirtilen sınır değerlerin altında MİK değerleri elde edilmiş ise duyarlı olarak yorumlandı. Her iki besiyerinde elde edilen duyarlılık profilleri arasındaki uyum yüzdeleri hem tüm suşlar için hem de türe göre belirlendi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 212 *Candida* izolatının AM3 ve RPG besiyerinde E-test yöntemiyle elde edilen amfoterisin B (AMB) MİK değerleri Tablo I'de verilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, 24 saat inkübasyon sonunda, *C.krusei* ve *C.glabrata* için iki besiyerinde elde edilen sonuçların benzer olduğu, *C.tropicalis* için RPG'de elde edilen MİK değerlerinin AM3'te elde edilenlerden daha yüksek, *C.lusitaniae* için ise RPG'de elde edilen MİK değerlerinin AM3'te elde edilenlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, *C.lusitaniae* ve *C.glabrata* için her iki besiyerinde elde edilen değerlerin benzer olduğu, *C.krusei* ve *C.tropicalis* için ise RPG'de elde edilen MİK değerlerinin AM3'te elde edilenlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, RPG ve AM3 besiyerlerinde elde edilen AMB MİK değerlerinin, türe ve inkübasyon süresine göre değişkenlik gösterebildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, AM3 besiyerinin, çalışılan türler içerisinde sadece *C.lusitaniae* için ve yalnızca 24 saat inkübasyon sonucunda yüksek MİK değerleri oluşturma eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir.

Tablo I. Çalışılan *Candida* İzolatlarının AM3 ve RPG Besiyerinde E-test Yöntemiyle Elde Edilen Amfoterisin B MİK Değerleri

Suşlar (n)	Besiyeri	MİK ($\mu\text{g/ml}$)					
		MİK aralığı		MİK ₅₀		MİK ₉₀	
		24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
<i>C.glabrata</i> (57)	AM3	0.012-0.38	0.023-0.38	0.094	0.125	0.19	0.25
	RPG	0.012-0.50	0.023-0.50	0.125	0.19	0.25	0.38
<i>C.lusitaniae</i> (53)	AM3	0.012-0.50	0.023-0.50	0.125	0.125	0.25	0.25
	RPG	0.012-0.25	0.023-0.38	0.032	0.064	0.047	0.094
<i>C.krusei</i> (51)	AM3	0.047-0.50	0.047-0.75	0.19	0.25	0.38	0.38
	RPG	0.064-2	0.125-4	0.38	0.50	1.0	3
<i>C.tropicalis</i> (51)	AM3	0.012-0.125	0.016-0.125	0.032	0.047	0.064	0.094
	RPG	0.032-0.75	0.047-1.0	0.125	0.25	0.38	0.75

AM3 besiyerinde 48 saat inkübasyon sonrası, çalışmaya dahil edilen izolatların tümünün AMB E-test için önerilen direnç sınır değerinin ($>1 \mu\text{g/ml}$) altında MİK değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatların AM3 besiyerinde E-test yöntemiyle AMB'ye duyarlı bulunmuş olmasına karşın, RPG besiyerinde E-test yöntemi için önerilen direnç sınır değerinin ($\geq 0.38 \mu\text{g/ml}$) üstünde AMB MİK değerine sahip izolatların olduğu saptanmıştır. RPG besiyerinde E-test yöntemiyle AMB'ye dirençli olduğu belirlenen izolatların türlere göre dağılımı

Tablo II'de verilmiştir. *C.krusei* izolatlarında RPG besiyerinde E-test yöntemiyle saptanan AMB'ye direnç oranının yüksekliği dikkati çekmiştir. *C.tropicalis*'te 48 saat inkübasyon sonrası suşların 1/3'ünden fazlasında AMB direnci saptanırken, AMB'ye doğal veya kazanılmış direnç gözlenebilen *C.lusitaniae* izolatlarında direnç oranının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

Tablo II. RPG Besiyerinde Önerilmiş Olan MİK Direnç Sınır Değeri Kullanılarak 48 Saatte E-test Yöntemiyle Amfoterisin B'ye Dirençli Olduğu Belirlenen *Candida* İzolatlarının Türlere Göre Dağılımı

Suşlar (n)	AMB'ye Dirençli suşlar n (%)
<i>C.glabrata</i> (57)	10 (17.5)
<i>C.lusitaniae</i> (53)	1 (1.9)
<i>C.krusei</i> (51)	48 (94.1)
<i>C.tropicalis</i> (51)	18 (35.3)
Toplam (212)	77 (36.3)

İzolatların AM3 ve RPG besiyerinde AMB E-test yöntemiyle ve önerilen direnç sınır değerleri kullanılarak saptanan duyarlılık kategorileri arasındaki uyum Tablo III'te verilmiştir. *C.lusitaniae* ve *C.glabrata* izolatlarında uyum oranının yüksek olduğu görülmüştür. *C.krusei* izolatlarında ise iki farklı besiyerinde AMB için belirlenen duyarlılık profilleri arasındaki düşük uyum oranı dikkati çekmiştir.

Tablo III. *Candida* İzolatlarının AM3 ve RPG Besiyerinde 48 Saat İnkübasyon Sonrası Amfoterisin B'ye Duyarlılık Kategorileri Arasındaki Uyum

Suşlar (n)	Duyarlılık kategorisi uyumu n (%)
<i>C.glabrata</i> (57)	47 (82.5)
<i>C.lusitaniae</i> (53)	52 (98.1)
<i>C.krusei</i> (51)	3 (5.9)
<i>C.tropicalis</i> (51)	33 (64.7)
Toplam (212)	135 (63.7)

Çalışmada kullanılan kalite kontrol suşu (*C.krusei* ATCC 6258) ve AMB'ye dirençli olduğu bilinen izolatın (*C.lusitaniae* CL2887) AM3 ve RPG besiyerlerinde E-test yöntemiyle elde edilen AMB MİK değerleri Tablo IV'te verilmiştir. Her iki besiyerinde 48 saat inkübasyon için önerilen direnç sınır değerlerine göre E-test yöntemiyle AMB'ye dirençli izolatta (*C.lusitaniae* CL2887) AMB direnci saptanabilmiştir. Kalite kontrol suşu için (*C.krusei* ATCC 6258) elde edilen MİK değerleri AMB duyarlılığı açısından yorumlandığında, suş RPG besiyerinde AMB'ye dirençli, AM3 besiyerinde ise duyarlı bulunmuştur.

Tablo IV. Çalışmada Kullanılan Standart Suşun (*C.krusei* ATCC 6258) ve Amfoterisin B'ye Dirençli Olduğu Bilinen Referans İzolatın (*C.lusitaniae* CL2887)² AM3 ve RPG Besiyerinde E-test Yöntemiyle Farklı Çalışma Günlerinde Elde Edilen MİK Değerleri

Suşlar	Besiyeri	MİK aralığı (µg/ml)	
		24 saat	48 saat
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	AM3	0.19-0.75	0.19-0.75
	RPG	0.38-0.75	0.38-3
<i>C.lusitaniae</i> CL2887	AM3	1.5-3	1.5-4
	RPG	0.38-3	0.50-4

TARTIŞMA

Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan sistemik antifungal ilaçlar arasında yer alan amfoterisin B (AMB) için *Candida* türlerinde gözlenen direnç oranlarının bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Yapılmış olan çalışmalarda, CLSI tarafından önerilen referans yöntemin *Candida* türlerinde AMB direncini saptamada yetersiz kaldığı, AM3 ve RPG besiyerinde uygulanan E-test yönteminin ise AMB'ye duyarlı ve dirençli suşların ayırımını sağlayabildiği gösterilmiştir⁶⁻⁸. Peyron ve arkadaşları⁸ AMB'ye duyarlı ve dirençli *C.lusitaniae* izolatlarının E-test yöntemiyle ayırımında, RPG besiyerinin AM3 besiyerine göre daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir. E-test yöntemiyle, *C.lusitaniae* izolatları test edilerek AM3 besiyerinde 1 µg/ml'nin üzerindeki; RPG besiyerinde ise 0.38 µg/ml ve üzerindeki MİK değerleri AMB'ye dirençle ilişkilendirilmiştir⁸. Ancak Park ve arkadaşları¹⁰, in vitro AMB duyarlılık testlerinin sonuçlarıyla klinik yanıt arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, çalışmaya dahil edilen izolatların %48'inin RPG besiyerinde AMB E-test MİK değerlerinin ≥ 0.38 µg/ml olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada, AMB'ye duyarlı kontrol izolatın (CL524) RPG besiyerinde E-test yöntemiyle AMB MİK değerinin 0.38 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Klinik yanıt ile AMB duyarlılık testlerinin sonuçları arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı bu çalışmada, RPG besiyerinde E-test yöntemiyle *Candida* türlerinin AMB direncinin belirlenmesinde, 0.38 µg/ml'nin oldukça düşük bir sınır değer olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰.

Çalışmamızda, farklı *Candida* türlerinin AMB MİK değerleri AM3 ve RPG besiyerlerinde E-test yöntemiyle araştırılmış ve önerilen direnç sınır değerlerine göre her suş için iki farklı besiyerindeki duyarlılık profilleri belirlenmiştir. Ardından, suşların her iki besiyerinde elde edilen duyarlılık profilleri arasındaki uyum oranları saptanmıştır. E-test yöntemiyle 24 saat inkübasyon sonrası *C.glabrata* ve *C.krusei* izolatlarında her iki besiyerinde AMB MİK değerlerinin benzer olduğu saptanırken, *C.tropicalis* için RPG agarda elde edilen MİK değerlerinin AM3 agarda elde edilen MİK değerlerinden daha yüksek, *C.lusitaniae* izolatlarında ise AM3 agardaki MİK değerlerinin RPG agardakilerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. *C.glabrata* ve *C.lusitaniae* izolatlarında 48 saat inkübasyon sonunda her iki besiyerindeki MİK değerlerinin benzer olduğu gözlenirken,

C.tropicalis ve *C.krusei* için RPG besiyerinde elde edilen MİK değerleri AM3 besiyerindekilerden daha yüksektir (Tablo I). Bu durum, kullanılan besiyerinde elde edilen MİK değerlerinin test edilen *Candida* türüne ve inkübasyon süresine göre değişebildiğini göstermiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlar AM3 besiyerinde E-test yöntemiyle AMB'ye duyarlı bulunurken, RPG besiyerinde 48 saatte suşların %36.3'ü AMB'ye dirençli bulunmuştur. RPG besiyerinde AMB'ye en yüksek direnç oranı *C.krusei* izolatlarında saptanmış, *C.lusitaniae* izolatlarının ise tamamına yakınının (%98.1) duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo II). İki farklı besiyerinde elde edilen AMB duyarlılık kategorileri arasındaki uyumun *C.lusitaniae* ve *C.glabrata* izolatları için yüksek, *C.tropicalis* ve özellikle *C.krusei* izolatları için ise düşük olduğu görülmüştür (Tablo III). Önerilen direnç sınır değerlerine göre E-test yöntemiyle kalite kontrol suşu (*C.krusei* ATCC 6258) RPG besiyerinde AMB'ye dirençli, AM3 besiyerinde duyarlı kategoride yer alırken, AMB'ye dirençli olduğu bilinen izolatta (*C.lusitaniae* CL2887) her iki besiyerinde AMB direnci saptanabilmiştir (Tablo IV). Bu bulgular, AM3 ve RPG besiyerinde AMB E-test yöntemi için ve *C.lusitaniae* suşları test edilerek önerilen direnç sınır değerlerinin, bazı *Candida* türlerinde benzer duyarlılık kategorilerinin elde edilebilmesini sağlayabilmekle birlikte, çalışmaya dahil edilen *C.tropicalis* ve özellikle *C.krusei* izolatlarında görüldüğü gibi, duyarlılık kategorisinde çarpıcı farklılıkların ortaya çıkmasına da neden olabildiğini göstermiştir. Bu uyumsuzluk, Park ve arkadaşları¹⁰ tarafından belirtildiği gibi, RPG besiyeri için önerilmiş olan direnç sınır değerinin (0.38 µg/ml) düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak, AMB'ye dirençli izolatların ayırımında RPG besiyerinin AM3 besiyerine göre daha elverişli olduğuna ilişkin bildirimler de mevcuttur^{7,8}. Bu bildirimler dikkate alındığında, AM3 besiyerinin ve bu besiyerinde AMB E-test için önerilen direnç sınır değerinin, iki farklı besiyerinde elde edilen sonuçların uyumsuzluğu üzerindeki etkisi de sorgulanmalıdır.

Çalışmamıza AMB'ye in vitro ve in vivo dirençli olduğu bilinen tek bir suşun dahil edilebilmiş olması ve dirençli suş sayısının artırılmamış olması, AMB direncinin saptanması için kullanılacak olan besiyerlerinin ve direnç sınır değerlerinin belirlenmesinde sınırlı veri elde edilebilmesine neden olmuştur. Ayrıca, çalışmamızda elde edilen in vitro sonuçlar in vivo modellerle irdelenebilmiş olsaydı, E-test yöntemiyle AMB duyarlılığının belirlenmesinde uygun besiyeri ve önerilen direnç sınır değerleri ile ilgili ek yorumlar yapmak mümkün olabilirdi.

Sonuç olarak, çalışmamızda AM3 ve RPG agarda AMB E-test için önerilen direnç sınır değerleri dikkate alınarak suşların duyarlılık profilleri belirlendiğinde sonuçlar arasında oldukça önemli uyumsuzlukların ortaya çıkabildiği saptanmıştır. Mevcut literatür bilgileri de, söz konusu in vitro duyarlılık sonuçlarının terapötik başarı veya başarısızlığı yansıtamadığı yönündedir. *Candida* türlerinde in vitro AMB duyarlılığının saptanmasında kullanılacak uygun yöntemin, besiyerinin ve direnç sınır değerlerinin belirlenmesi amacıyla in vitro ve in vivo çalışmaların sürdürülmesine gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Sterling TR, Gasser RA JR, Ziegler A. Emergence of resistance to amphotericin B during therapy for *Candida glabrata* infection in an immunocompetent host. Clin Infect Dis 1996; 23: 187-8.
2. Rex JH, Cooper CR Jr, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 906-9.
3. Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 1994; 32: 2092-8.
4. Chang HC, Chang JJ, Chan SH. et al. Evaluation of Etest for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. J Clin Microbiol 2001; 39: 1328-33.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS Document M27-A2. 2002. NCCLS/CLSI, Wayne, Pa.
6. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2520-2.
7. Pfaller MA, Messer SA, Bolmstrom A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32: 223-7.
8. Peyron J, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. J Clin Microbiol 2001; 39: 339-42.
9. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by Etest and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1289-90.
10. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, et al. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1287-92.
11. <http://www.doctorfungus.org>
12. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50: 243-60.
13. Yang YL, Li SY, Cheng HH, Lo HJ. TSARY Hospitals. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51: 179-83.
14. Drutz DJ, Lehrer RI. Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. Am J Med Sci 1978; 276: 77-92.
15. Guinet R, Chanas J, Goullier A, Bonnefoy G, Ambroise-Thomas P. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. J Clin Microbiol 1983; 18: 443-4.
16. Safe LM, Safe SH, Subden RE, Morris DC. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. Can J Microbiol 1977; 23: 398-401.
17. Krogh-Madsen M, Arendrup MC, Heslet L, Knudsen JD. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. Clin Infect Dis 2006; 42: 938-44.
18. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis 2003; 36: S31-41.