

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA SPP. SUŞLARININ ANTİFUNGAL İLAÇLARA KARŞI DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİNDE BUYUYON MİKRODİLÜSYON İLE E-TEST YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF BROTH MICRODILUTION AND E-TEST METHODS FOR THE ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF *CANDIDA* SPP. STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES

Sema KEÇELİ ÖZCAN¹, Birsen MUTLU², Devrim DÜNDAR¹, Ayşe WİLLKE²

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli. (keceliozcan@yahoo.com)

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli.

ÖZET

Son yıllarda, immünsüpresif tedavi alan hasta sayısındaki artışa bağlı olarak, ciddi fungal enfeksiyonların, özellikle invazif *Candida* enfeksiyonlarının insidansında da artış gözlenmekte ve bu durum da antifungal ajanlara karşı direnç oranlarında belirgin artış beraberinde getirmektedir. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde, E-test yönteminin standart buyyon mikrodilüsyon (BMD) yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında kan kültürlerinden (BACTEC 9000; Becton-Dickinson, ABD) izole edilen ve konvansiyonel yöntemler ve API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) sistemi ile tanımlanan toplam 46 *Candida* suşu (23 *C.albicans*, 10 *C.parapsilosis*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C.krusei*, 2 *C.famata*, 1 *C.glabrata*, 1 *C.guilliermondii*, 1 *C.kefyr*) alınmıştır. İzolatların antifungal duyarlılıkları, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M27-A3)" tarafından tanımlanan BMD yöntemi ve E-test ile belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatlardan ikisi (*C.albicans* ve *C.glabrata*) E-test ile flukonazole dirençli; BMD ile duyarlı saptanmıştır. E-test ile kaspofungin minimum inhibitör konsantrasyonu (MLK) değerleri, *C.parapsilosis* suşlarında diğer *Candida* türlerine kıyasla daha yüksek (MLK= 1-2 µg/ml) bulunmuştur. Vorikonazole karşı sadece bir *C.albicans* izolatı E-test ile dirençli (MLK= 4 µg/ml), BMD ile ise duyarlı (MLK= 0.08 µg/ml) olarak saptanmıştır. Amfoterisin B için kesinleşmiş direnç sınırı olmadığından yöntemlerin karşılaştırılmasında MLK değerleri dikkate alınmış ve tüm izolatların amfoterisin B için her iki yöntemle de aynı düşük MİK aralıklarına (< 0.002-0.5) sahip olduğu izlenmiştir. E-test yöntemi ile elde edilen MLK değerleri, standart BMD sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, flukonazol için %80.4; amfoterisin B için %84.7; vorikonazol için %93.4 ve kaspofungin için %95.6 uyum olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, kan kültürlerinden en sık izole edilen *Candida* türünün *C.albicans* olduğu, bunu *C.parapsilosis*'in izlediği ve izolatların antifungal direnç oranlarının oldukça düşük olduğu

saptanmıştır. Bununla birlikte, özellikle yeni antifungal ajanlar olan vorikonazol ve kaspofungine karşı duyarlılık değerlendirildiğinde, flukonazol ve amfoterisin B'ye kıyasla, her iki yöntem arasındaki uyumun %90'ın üzerinde olması umut verici bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida*, E-test, buyyon mikrodilüsyon testi, amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, kaspofungin.

ABSTRACT

The incidence of serious fungal infections, particularly invasive *Candida* infections exhibit an increasing trend in the last decades since the number of patients receiving immunosuppressive treatment is increasing. This situation eventually results in an increment in resistance to antifungal agents. The aim of this study was to compare the standard broth microdilution (BMD) and E-test methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from blood cultures in our hospital, against fluconazole, voriconazole, caspofungin and amphotericin B. A total of 46 *Candida* strains isolated from the blood cultures by BACTEC 9000 (Becton Dickinson, USA) and identified by conventional techniques and API 20C AUX (BioMerieux, France) during January 2006-December 2007, were included into this study. The identification results of the isolates were as follows: *C.albicans* (23), *C.parapsilosis* (10), *C.tropicalis* (5), *C.krusei* (3), *C.famata* (2), *C.glabrata* (1), *C.guilliermondii* (1), *C.kefyr* (1). The antifungal susceptibilities were determined by BMD method described in Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 document and E-test. Only two isolates (*C.albicans* and *C.glabrata*) were found to be resistant to fluconazole with E-test but susceptible with BMD. The minimal inhibitory concentration (MIC) values of caspofungin were higher (MIC= 1-2 µg/ml) in *C.parapsilosis* compared to other *Candida* species using E-test. Only one *C.albicans* was resistant to voriconazole by E-test (MIC= 4 µg/ml), but it was susceptible by BMD (MIC= 0.08 µg/ml). Since definite resistance breakpoints do not yet exist for amphotericin B, MIC values were considered for amphotericin B and it was found that all strains had identical low MIC values (< 0.002-0.5). When E-test results were compared with the standard BMD results, MIC values were in agreement 80.4% for fluconazole, 84.7% for amphotericin B, 95.6% for voriconazole and 93.4% for caspofungin. These results indicated that the most frequently isolated *Candida* species among blood cultures was *C.albicans*, followed by *C.parapsilosis* and these isolates had low antifungal resistance rates. When voriconazole and caspofungin susceptibilities were considered, both E-test and BMD susceptibility results were in good agreement in comparison to fluconazol and amphotericin B. E-test can be considered as a compatible method for the antifungal susceptibility testing of *Candida* species compared to standard broth microdilution method.

Key words: *Candida*, E-test, broth microdilution, amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin.

GİRİŞ

Son yıllarda, immünsüpresif tedavi alan hasta sayısının artmasına bağlı olarak, ciddi fungal enfeksiyonların, özellikle invazif *Candida* enfeksiyonlarının insidansında da artış gözlenmektedir¹. Bu artışın, önemli fırsatçı fungal patojenlerin sık kullanılan antifungal ajanlara karşı duyarlılık paternlerinin değişmesine yol açtığı ve hatta buna paralel olarak direnç oranlarındaki belirgin artışı da beraberinde getirdiği rapor edilmektedir². Dolayısıyla antifungal tedavi seçiminde ve tedavi izleminde antifungal duyarlılık testlerini uygulamak oldukça önem kazanmaktadır.

Candida türlerinin beş farklı antifungal ilaca karşı duyarlılığının belirlenmesinde, standart yöntem olarak sıvı dilüsyon yöntemi (Broth Microdilution; BMD) , "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M27-A3 dokümanı kaynak alınarak kullanılmakta-

dır³. Bu yöntem, özellikle iş yükü fazla olan laboratuvarlarda uygulaması pratik olmayan ve oldukça zaman alan bir yöntem olarak görülmektedir. Ayrıca, bu yöntem ile azol türevi antifungallerde rastlanan ve "trailing end phenomen" olarak tanımlanan 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonrası minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerindeki belirgin farklılıklar yüzünden, elde edilen sonuçların yorumlanması her zaman kolay olmamaktadır. Bu sorunlar, son yıllarda in vitro duyarlılık testi olarak daha basit bazı yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

MİK değerlerinin belirlenmesinde kullanılan E-test yöntemi, kolay uygulanması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması ve uygulama için özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması nedeniyle ilgi çekmektedir. *Candida* türlerinin azol türevi antifungal ajanlara karşı duyarlılığının test edilmesinde E-test ve standart CLSI yöntemleri kullanıldığında, her iki testin iyi bir uyum gösterdiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir⁴⁻⁶.

Yeni geliştirilen antifungal ajanlardan olan vorikonazol, triazol grubu bir antifungal olup, fungal ergosterol sentezini, sitokrom P450-bağımlı-14- α -lanesterol dimetilaz enzimini inhibe ederek durdurur⁷. Bu ajan güçlü in vivo ve in vitro aktivitesi nedeniyle, özellikle flukonazole dirençli ciddi *Candida* enfeksiyonları (*C.krusei* kaynaklı enfeksiyonları da içeren), invazif aspergilloz, dirençli *Fusarium* spp. ve *Scedosporium apiospermum*'un neden olduğu ciddi fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır⁸⁻¹⁰. Yeni geliştirilen bir diğer antifungal ajan olan kaspofungin ise bir ekinokandin türevidir ve azollerden farklı olarak fungal hücre duvarı komponenti olan β -(1,3)-D-glukan sentezini inhibe ederek etki gösterir. *C.albicans* ve *albicans* dışı *Candida* türlerine karşı fungusidal aktivitesinin olduğu, özellikle invazif kandidiyazlı hastaların tedavisinde kullanıldığında, klasik amfoterisin B tedavisine göre daha etkili olduğu ve daha iyi tolere edildiği gösterilmiştir^{11,12}. Vorikonazol ve kaspofunginin klinik etkinliği konusunda giderek artan yayınlar mevcut olmasına rağmen, her iki antifungal ilacın in vitro duyarlılığını E-test ile saptayan çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının flukonazol ve amfoterisin B gibi en sık kullanılan antifungal ajanların yanı sıra vorikonazol ve kaspofungine karşı olan duyarlılıklarının belirlenmesinde standart BMD yönteminin E-test yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida Suşları

Çalışmaya, Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ocak 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında kan kültürlerinden (BACTEC 9000 Sistemi; Becton Dickinson®, ABD) izole edilen 46 *Candida* suşu (23 *C.albicans*, 10 *C.parapsilosis*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C.krusei*, 2 *C.famata*, 1 *C.glabrata*, 1 *C.guilliermondii*, 1 *C.kefyr*) alındı. İzolatların tanımlanmasında germ tüp testi, mısır unlu tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünüşleri ve gerektiğinde API 20C AUX (BioMerieux®, Fransa) sistemi kullanıldı¹³. Tüm izolatlar duyarlılık testleri yapıncaya kadar -20°C'de saklandı. Her suş, duyarlılık testleri uygulanmasından önce, optimal üreme ve saf kültür elde edilmesi ama-

cıyla Sabouraud dekstroz agara iki kez pasajlandı. Hastalara ait bilgiler retrospektif tarama ile elde edildi.

Antifungal Duyarlılığın Saptanması

İzolatların flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B'ye karşı duyarlılığının belirlenmesinde E-test ve BMD yöntemleri uygulandı. Her iki yöntemde de kontrol olarak, *C.albicans* 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.krusei* ATCC 6258 standart suşları kullanıldı.

a. Standart buyyon mikrodilüsyon yöntemi: *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıkları CLSI önerilerine göre araştırıldı³. Potensi bilinen saf antifungal ilaç tozları üretici firmalardan (flukonazol ve vorikonazol: Pfizer; kaspofungin Merck-Sharp-Dohme; amfoterisin B: Sigma-Aldrich) temin edildi. Antifungal ilaçların BMD testinde kullanılacak son konsantrasyonlarının 10 katı olacak şekilde stok solüsyonları hazırlandı ve daha sonra L-glutaminli ve bikarbonatsız RPMI 1640 (Sigma) ile dilüsyonları yapıldı. Bu besiyerine %2 dekstroz ilave edilerek ve 0.165 M morfolin-propan-sülfonik asit (MOPS; Sigma) ile pH 7'ye ayarlanarak deneylerde kullanıldı.

Bu çalışmada, standart BMD ile E-test yönteminin karşılaştırılması amaçlandığından, standart dilüsyon sayısına ek olarak daha geniş dilüsyon sayısı çalışması tercih edildi ve flukonazol için 0.015-256 µg/ml; vorikonazol, kaspofungin ve amfoterisin B için ise 0.002-16 µg/ml konsantrasyon aralıkları kullanıldı. Mikroplaklar 37°C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, çıplak gözle değerlendirilerek MİK değerleri belirlendi. Antifungal içermeyen kontrol kuyucuğundaki üremeye kıyasla üremenin %50 azalma gösterdiği kuyucuktaki en düşük antifungal konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

b. E-test yöntemi: E-test® (AB Biodisk, İsveç) yönteminde, %2 glukoz ve %1.5 agar içeren RPMI 1640 (Sigma) besiyeri kullanıldı ve sonuçlar üretici firmanın önerilerine göre belirlendi. Buna göre, her *Candida* izolatının %0.85 sodyum klorürde 0.5 McFarland standardı bulanıklığına göre süspansiyonları hazırlandı ve eküvyon ile agar yüzeylerine inoküle edildi. Agar plakların yüzeyleri kuruduktan sonra, kaspofungin ve vorikonazol (0.004-32 µg/ml), amfoterisin B (0.002-32 µg/ml) ve flukonazol (0.016-256 µg/ml) içeren E-test şeritleri yerleştirildi. Daha sonra plaklar 37°C'de 24 saat, eğer yetersiz üreme varsa 48 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında MİK (µg/ml) değerleri belirlendi¹⁴.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmanın amacı E-test ve BMD yöntemlerinin karşılaştırılması olduğu için, bu yöntemlerde CLSI ile belirlenmiş olan MİK sınır değerleri kullanıldı. Buna göre flukonazol MİK değerleri ≤ 8 µg/ml, 16-32 µg/ml ve ≥ 64 µg/ml olan izolatlar sırasıyla duyarlı, doza bağılı duyarlı ve dirençli olarak kabul edildi. Vorikonazol için ise MİK değeri ≤ 1 µg/ml olan izolatlar duyarlı, 2 µg/ml olanlar doza bağılı duyarlı ve ≥ 4 µg/ml olanlar dirençli olarak kabul edildi¹⁵. Kaspofungin için duyarlılık MİK sınır değeri ise, yapılan bir başka çalışmada belirlendiği üzere ≤ 2 µg/ml olarak alındı¹⁶.

E-test ile elde edilen MK değerleri, karşılaştırmanın kolay olması amacıyla, BMD ile elde edilen MK değerinin en yakın bir üst konsantrasyonuna yuvarlandı ve her iki yöntem ile elde edilen MK değerleri arasında $2\log_2$ dilüsyondan fazla fark olmaması testler arası uyum olarak değerlendirildi¹⁷. Sonuçlar, bir suşun bir yöntemle dirençli veya duyarlı bulunup diğer yöntemle doza bağlı duyarlı bulunması halinde “küçük hata”; E-test ile dirençli ancak BMD ile duyarlı bulunması halinde “büyük hata”; E-test ile duyarlı ancak BMD ile dirençli bulunması halinde “çok büyük hata” olarak yorumlandı¹⁷.

BULGULAR

Kan kültürlerinden *Candida* spp. izole edilen toplam 46 hastanın 31’i kanser (16’sı akut miyeloblastik lösemi, 12’si akut lenfositik lösemi, 2’si mide karsinomu, biri nöroblastom), 15’i ise bakteriyel/viral enfeksiyon (pnömoni, sepsis, bronşiyolit, bası yarası, idrar yolu enfeksiyonu) tanısı alan hastalardır. Tüm hastalar fungal enfeksiyon tanısı konulmadan önce 2-14 gün antibiyotik tedavisi almıştır. Hastaların 18’i kaybedilmiş, diğerleri ise antifungal tedavi ile iyileşmişlerdir.

Antifungal ilaçlara karşı E-test ve standart BMD yöntemleri ile elde edilen MK₅₀, MK₉₀ ve MK aralıkları Tablo 1’de gösterilmiştir. Yöntemlerin karşılaştırılmasında, 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan değerlendirmeler dikkate alınmıştır.

Tabloda görüldüğü gibi, amfoterisin B’nin tüm izolatlar için her iki yöntemle de aynı MK aralığına (< 0.002-0.5) sahip olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte iki izolat (*C.glabrata* ve *C.albicans*) E-test ile flukonazole karşı dirençli bulunurken, BMD ile duyarlı olarak belirlenmiştir.

Vorikonazole karşı duyarlılık değerlendirildiğinde; E-test ile tüm izolatlarda ve BMD ile izolatların 36 (%78)’sında, MK değeri < 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Ancak E-test ile dirençli olarak (MK= 4 µg/ml) değerlendirilen bir *C.albicans* izolatı, BMD ile duyarlı (MK= 0.08 µg/ml) bulunmuştur. BMD ile üç izolat (*C.albicans*, *C.krusei* ve *C.tropicalis*) doza bağlı duyarlılık (MK= 2 µg/ml) saptanırken, bu suşlar E-test ile duyarlı (MK= 0.02-0.05 µg/ml) olarak değerlendirilmiştir.

Kaspofungin duyarlılığına bakıldığında, E-test ile yüksek MK değerleri (1-2 µg/ml) 17 izolat, BMD ile sadece üç izolat saptanmıştır. Yine E-test ile beş *C.parapsilosis* suşun-

Tablo 1. Antifungal İlaçların *Candida* İzolatlarına Karşı E-test ve BMD Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlarının Karşılaştırılması (n= 46)

Antifungal ilaç	MK ₅₀ (µg/ml)		MK ₉₀ (µg/ml)		MK aralığı (µg/ml)	
	E-test	BMD	E-test	BMD	E-test	BMD
Flukonazol	0.25	0.25	8	2	0.064-64	< 0.015-2
Amfoterisin B	0.008	0.125	0.03	0.5	< 0.002-0.5	< 0.002-0.5
Vorikonazol	0.016	0.25	0.125	1	< 0.002-4	0.015-4
Kaspofungin	0.5	0.125	2	0.5	0.064-2	0.015-2

MLK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, BMD: Buyyon mikrodilüsyon.

Tablo II. E-Test Yöntemi ile Elde Edilen MİK Değerlerinin Standart BMD ile Uyumu

	Küçük hata	Büyük hata	Çok büyük hata	Toplam uyum (≤ 2 dilüsyon fark uyum)
Flukonazol	0	3	0	37 (%80.4)
Amfoterisin B	0	0	0	39 (%84.7)
Vorikonazol	3	0	1	44 (%95.6)
Kaspofungin	0	1	2	43 (%93.4)

MLK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, BMD: Buyyon mikrodilüsyon.

da MİK değerlerinin 1-2 µg/ml olduğu gözlenmiş, bu izolatların BMD ile elde edilen MİK aralığı 0.015-0.5 µg/ml olarak bulunmuştur. İki *C.famata* ve bir *C.albicans* izolatında E-test ile MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Suşların 39 (%84.7)'unda E-test ile ve 44 (%95.7)'ünde BMD ile kaspofungin MİK değerleri ≤ 1 µg/ml olarak belirlenmiştir. E-test ile MİK değeri 2 µg/ml olan bir izolatın (*C.albicans*), BMD ile MİK değeri 0.125 µg/ml saptanmıştır. Bunun aksine, BMD ile MİK değeri 2 µg/ml olan *C.parapsilosis* ve *C.albicans*'ın E-test ile MİK değerleri sırasıyla 1 ve 0.064 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

E-test yönteminin standart BMD yöntemi ile uyumunun değerlendirilmesi amacıyla tüm MİK değerlerinin log₂ dönüşümlerinin karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlar Tablo II'de gösterilmiştir. Buna göre, E-test ile MİK sonuçlarının flukonazol için %80.4, amfoterisin B için %84.7, vorikonazol için %95.6 ve kaspofungin için %93.4 oranında uyumlu olarak saptandığı gözlenmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde bir yıllık dönemde hematolojik maligniteli ve enfeksiyonlu hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımını, antifungal duyarlılıklarını ve duyarlılık testleri olarak kullanılan E-test yönteminin standart BMD yöntemi ile karşılaştırmasını içermektedir. Çalışmamızda, kan kültürlerinden en sık izole edilen *Candida* türünün *C.albicans* olduğu belirlenmiştir. Gerek ülkemizden gerekse yurt dışından yapılan çalışmalarda, *C.albicans*'ın kan kültürlerinden en sık izole edilen tür olduğu ifade edilmekte, ancak *albicans* dışı *Candida* türlerinin dağılımında farklılıklar bulunmaktadır^{1,18,19}. Bazı araştırmacılar²⁰⁻²² ikinci sırayı *C.glabrata*'nın aldığını belirtirken, bazıları^{19,23,24} *C.parapsilosis*'in en sık izole edilen *albicans* dışı *Candida* türü olduğunu vurgulamaktadır.

Candida enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanım endikasyonu olan ve kullanılması önerilen antifungal ilaçlar amfoterisin B ve kaspofungindir. Duyarlılık testlerinde amfoterisin B için kesinleşmiş direnç sınır değerleri olmadığından, çalışmamızda sadece E-test ve BMD yöntemleri ile alınan MİK değerleri karşılaştırılmış ve tüm izolatlar için amfoterisin B'nin her iki yöntemle de aynı düşük MİK aralığına (< 0.002-0.5) sahip olduğu görülmüştür. İzolatların flukonazole karşı duyarlılığı değerlendirildiğinde; *C.albicans* suşlarının sadece 1 (%4)'inde E-test yöntemiyle flukonazol direnci belirlenmiş ve bu oran daha önce bildirilen düşük flukonazol direnç oranı (%3) ile uyumlu bulunmuş-

tur²⁵. E-test ile flukonazole dirençli, BMD ile duyarlı bulunan iki *C.krusei* suşu ise, bulunan MİK değerleri ne olursa olsun her koşulda flukonazole dirençli kabul edildiğinden, bu suşlar için yöntemlerin MİK değerlerine göre karşılaştırması yapılmamıştır. Tüm suşlar dikkate alındığında, E-test ile flukonazole dirençli saptanan üç izolatin, yine E-test ile vorikonazol ve kaspofungine karşı düşük MİK değerlerinin (0.125-0.5 µg/ml) saptanmış olması, vorikonazol ve kaspofunginin, flukonazole dirençli izolatlarla karşı daha etkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda, tüm izolatlar için elde edilen vorikonazol MİK değerleri, daha önce rapor edilenlere benzer bulunmuştur^{26,27}. Genelde tüm *Candida* türleri içinde, *C.krusei* ve *C.glabrata* dahil olmak üzere vorikonazol MİK₅₀ değeri ≤ 0.125 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuç, ülkemizde Uzun ve arkadaşlarının²⁶ 250 klinik izolatta yaptığı vorikonazol duyarlılık sonuçları ile paraleldir. Bazı araştırmacılar flukonazole dirençli *C.albicans* ve *C.glabrata*'ya karşı vorikonazolün amfoterisin B kadar etkin olduğunu bildirirken, bazıları da E-test yöntemi ile *C.krusei* ve *C.glabrata*'ya karşı yüksek vorikonazol MİK₉₀ değerlerinin saptandığını rapor etmektedir^{26,27}. Çalışmamızda, vorikonazol direnci BMD yöntemi ile sadece bir *C.albicans* izolatında saptanmış, bu izolat E-test ile ilaca duyarlı bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni, özellikle *C.albicans*'ta rastlanan "trailing growth" olarak adlandırılan durumun (24 ve 48 saatte değerlendirilen MİK sonuçlarında belirgin farklılık) varlığı olabilir. Rex ve arkadaşları²⁸, "trailing" saptanan suşların 24 saat gibi erken inkübasyon döneminde elde edilen MİK değerlerinin kabul edilebileceği ileri sürülmektedir. Vorikonazol direncine çok sık rastlanmamasına rağmen, bu antifungalın özellikle hematolojik maligniteli ve febril nötroopenili hastaların antifungal tedavisinde kullanılması nedeniyle, vorikonazol MİK değerlerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Çalışma sonuçlarımıza göre tüm suşlarda kaspofungin için elde edilen MİK değerleri, kullanılan yöntemle bağlı olarak 0.015-2 µg/ml arasında değişiklik göstermektedir. Arkan ve arkadaşlarının²⁹ çalışmasına benzer bir şekilde, özellikle *C.parapsilosis* izolatlarının MİK değerleri daha yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte kaspofunginin, tüm *Candida* türlerine karşı oldukça etkili olduğu ve E-test ile test edildiğinde standart BMD ile uyumunun oldukça iyi olduğu izlenmiştir.

Bakteriyel patojenlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan E-test yöntemi, antifungal ilaçlar için önerilen referans yöntemlerden birisi olmadığı gibi antifungal ilaçlar için E-test yönteminde belirlenmiş direnç sınır değerleri de bulunmamaktadır. Ancak antifungal duyarlılık testlerinde önerilen standart BMD yönteminin emek-yoğun ve zaman alıcı olması, rutinde uygulanabilen pratik antifungal duyarlılık yöntemlerini cazip kılmaktadır. Her ne kadar E-testin antifungal duyarlılık testi olarak rutinde uygulanma önerisi mevcut değilse de, E-test yönteminin performansının belirlenmesi amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir. E-test yönteminin standart BMD yöntemi ile karşılaştırılması sonunda, flukonazol için %6.5 oranında büyük hata; vorikonazol için %6.5 oranında küçük hata ve %2 oranında çok büyük hata; kaspofungin için ise %2 büyük hata ve %4 oranında çok büyük hata saptanmış; E-testin BMD ile uyumu flukonazol için %80.4, amfoterisin B için %84.7, vorikonazol için %95.6 ve kaspofungin

için %93.4 olarak belirlenmiştir (Tablo II). Sonuç olarak çalışmamızda, kan kültürlerinden en sık izole edilen *Candida* türünün *C.albicans* olduğu, bunu *C.parapsilosis*'in izlediği ve izolatların antifungal direnç oranlarının oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, özellikle yeni antifungal ajanlar olan vorikonazol ve kaspofungine karşı duyarlılık değerlendirildiğinde, flukonazol ve amfoterisin B'ye kıyasla, her iki yöntem arasındaki uyumun %90'ın üzerinde olması umut verici bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 133-63.
2. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1-8.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. 2008, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
4. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility of yeast species. J Clin Microbiol 2002; 40: 3841-4.
5. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1647-51.
6. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German University Hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 767-71.
7. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 40-79.
8. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. Clin Infect Dis 2003; 36: 1122-231.
9. Epsinel Ingroff A. In vitro activity of new triazole (UK-109,496) against opportunistic dimorphic and filamentous fungi and common and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol 1998; 36: 198-202.
10. Heneger P, Troke PF, Fatkenheuer G, Diehl V, Ruhnke M. Treatment of fluconazole resistant candidiasis with voriconazole in patients with AIDS. AIDS 1998; 12: 2227-8.
11. Maertens J. Caspofungin: an advanced treatment approach for suspected or confirmed invasive aspergillosis. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 457-67.
12. DiNubile MJ, Lupinacci RJ, Strohmaier KM, Sable CA, Kartsonis NA. Invasive candidiasis treated in the intensive care unit: observation from a randomized clinical trial. J Crit Care 2007; 22: 237-44.
13. Roberts GD. Laboratory Methods in Basic Mycology, pp: 752-8. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (eds), Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 1994, 9th ed. Mosby Co, St. Louis.
14. Koç AN, Gökahmetoğlu S, Oğuzkaya M. Comparison of E test with microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. Mycoses 2000; 43: 294-7.
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol 2006; 44: 819-26.
16. Epsinel-Ingroff A. Mechanism of resistance to antifungal agents of yeasts and filamentous fungi. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 101-6.
17. Quaiyumi S. Macro and microdilution methods, pp: 75-79. In: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC (eds), Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 2007. CRS Press. New York.
18. Bakır M, Cerikcioğlu N, Barton R, Yagcı A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. APMIS 2006; 114: 601-10.

19. Marchetti O, Bile J, Fluckiger U, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311-20.
20. Zepelin MB, Kunz L, Rüchel R, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungemia on Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 424-8.
21. Pfaller M, Diekema DJ, Jones RN, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3254-9.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disc diffusion and Etest methods: report from the Artemis Global Antifungal Susceptibility Programme, 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1440-6.
23. Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, et al. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 194-9.
24. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme (2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1782-7.
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. In vitro activities of caspofungin compared to those of fluconazole and itraconazole against 3950 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1068-71.
26. Uzun O, Arkan S, Kocagöz S, Sancak B, Unal S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University hospital and effect of time of reading. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 101-7.
27. Mallie M, Bastide JM, Blanchard A, et al. In vitro susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazole and other fungal agents using Etest: results of a French multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 321-8.
28. Rex JH, Nelson PW, Paetznick WL, et al. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 129-34.
29. Arkan S, Sancak B, Hascelik G. In vitro activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. *Med Mycol* 2005; 43: 171-8.