

Yatan Hastalardan İzole Edilen *Candida* Türlerinin ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Alper Togay¹, Banu Bayraktar¹, Dilek Yıldız Sevgi², Emin Bulut¹

ÖZET:

Yatan hastalardan izole edilen *candida* türlerinin ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi

Amaç: Son yıllarda mantar enfeksiyonları, özellikle immünsüpresif tedavi alan ya da altta yatan bir risk faktörü nedeniyle hastanede yatan hastalarda başlıca enfeksiyon etkeni olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada farklı klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve duyarlılıklarının retrospektif olarak incelenmesi ve kullanılmış olan ticari kitlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ocak 2011-Aralık 2013 tarihleri arasında laboratuvarımıza gelen hasta örneklerinden, maya mantarı soyutlanan 45'i kan, 12'si steril vücut sıvısı, 10'u idrar, üçü bronkoalveolar lavaj, biri kateter olmak üzere toplam 71 klinik örnek incelemeye alınmıştır. Çalışmaya alınan örneklerden soyutlanan maya mantarları; germ tüp yöntemi, CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France) ve AuxaColor (Bio-Rad SDP, Paris, France) ticari kitiyle tiplendirilmiştir. Maya mantarlarının antifungal duyarlılıkları Fungitest (Bio-Rad SDP, Paris, France) ticari kiti ile belirlenmiştir.

Bulgular: AuxaColor ile değerlendirilen toplam 71 *Candida* suşunun 28'i (%39) *Candida albicans*, 13'ü (%18.3) *C. parapsilosis*, 11'i (%15.5) *C. glabrata*, 10'u (%14.1) *C. tropicalis*, dördü (%5.6) *C. krusei*, üçü (%4.2) *C. lusitanae*, birer tane ise (%1.4) *C. kefyr* ve *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır. Fungitest ile değerlendirilen 47 suşun Amfoterisin B'ye orta duyarlı olan bir *C. parapsilosis* suşu ve dirençli olan bir *C. tropicalis* Etest metodu ile incelenmiş, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) 1.5 µg/ml bulunmuştur. Flukonazole (FLU) orta duyarlı üç *C. albicans* suşu Etest metodu ile değerlendirilmiş ikisinin MİK değeri 256 µg/ml olarak, biri 32 µg/ml olarak bulunmuştur. FLU'ya dirençli olan bir adet *C. albicans* suşu MİK değeri Etest metodu ile 256 µg/ml olarak bulunmuştur. Dirençli olan *C. tropicalis* suşunun MİK değeri ise 0,38 µg/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda fungal enfeksiyonların kontrolü için tür tayini ve antifungal duyarlılık test sonuçlarının bilinmesi önemli olduğu ve antifungal ajanlara karşı gittikçe artan direnç oranları nedeniyle tedavi planlamasında duyarlılık testlerinin giderek daha önem kazandığı sonucuna varılmıştır. Kullandığımız Auxacolor ve Fungitest'in uygulanmasının ve değerlendirilmesinin kolay ve pratik bir test olduğu görülmüştür. Fungitest duyarlılık sonuçları mevcut guidelinelerde ki antifungal dilüsyonlar ile uyumluluk göstermediğinden dikkatle değerlendirilmelidir. Ayrıca orta duyarlı ve dirençli sonuçların referans yöntemlerle teyit edilmesi uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: Antifungal duyarlılık, *Candida* türleri, hastane enfeksiyonu

ABSTRACT:

Determination of candida species and their antifungal susceptibilities isolated from inpatients

Objective: Fungi have emerged as major causes of human disease recently, especially among the immunocompromised patients and those hospitalized with serious underlying diseases. The aim of this study was to identify *Candida* species isolated from different cultures and determine their antifungal susceptibilities retrospectively and define of value of using commercial system.

Material and Method: Test results of yeasts that were isolated from 45 blood, 10 urine, three bronchoalveolar lavage and one catheter samples of the patients during the period January 2011-December 2013 in our laboratory were evaluated. The yeasts were identified by germ tube test, CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France) and AuxaColor (Bio-Rad SDP, Paris, France) commercial identification system. The antifungal susceptibility tests were performed using Fungitest (Bio-Rad SDP, Paris, France) commercial system.

Results: The distribution of 71 candida species was as follows: 28 *Candida albicans* (39%), 13 *Candida parapsilosis* (18.3%), 11 *Candida glabrata* (15.5%), 10 *Candida tropicalis* (14.1%), four *Candida krusei* (5.6%), three *Candida lusitanae* (4.2%), one *Candida kefyr* (1.4%) and one *Candida dubliniensis* (1.4%). A intermediate *C. parapsilosis* strain to Amfoterisin B and a resistant *C. tropicalis* strain to Amfoterisin are evaluated using E-test and found resistant with a minimum inhibitor concentration (MIC) value of 1.5 µg/ml for both of them. The MIC rates of two out of three fluconazole (FLU) intermediate and one resistant *C. albicans* strains were evaluated using E-test and all three strains were found resistant with a MIC value of 256 µg/ml. The MIC of a FLU intermediate *C. albicans* strain to FLU was 32 µg/ml. The MIC of a *C. tropicalis* strain that was FLU resistant with Fungitest was 0,38 µg/ml and was evaluated as susceptible.

Conclusion: In our study, it is important knowledge of species and antifungal susceptibility test results for control of fungal infections and plan of treatment. We used Auxacolor and Fungitest in our study. And this tests were easy to use and to evaluate. It should be carefully evaluated of the Fungitest results which don't accord with the actual guidelines. It would be appropriate to confirm intermediate and resistant results using reference methods.

Key words: Antifungal susceptibility, *Candida* species, hospital infection

Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni 2015;49(4):266-73



¹Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul - Türkiye

²Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to:
Alper Togay,
Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul - Türkiye

E-posta / E-mail:
togayalper@yahoo.com

Geliş tarihi / Date of receipt:
22 Eylül 2015 / September 22, 2015

Kabul tarihi / Date of acceptance:
18 Kasım 2015 / November 18, 2015

GİRİŞ

Mantar infeksiyonları, immünsüpresif tedavi alan ya da altta yatan bir risk faktörü nedeniyle hastanede yatan hastalarda önemli mortalite ve morbidite nedenleridir (1). Son yıllarda hastane kökenli mantar infeksiyonlarında artış görülmüştür ve bu infeksiyonların %80'inin etkeni *Candida* türleridir (2). Artan öneminden dolayı etken olan mantarlarda tür tayini ve antifungal ilaç direnci ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (3). Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda erken tanı ve tedavi, yüksek mortalite hızını düşürmek açısından önemlidir. Dissemine kandidiyazın premortem tanı olasılığı düşüktür ve tanı genellikle klinik olarak konur. Yaklaşık olarak olguların %15-40'ı erken tanı alarak uygun tedaviye ulaşabilmektedir (4). Referans yöntemlerin yanı sıra klinik laboratuvarların bu konuda gereksinimlerini karşılamak üzere ticari bazı kitler de geliştirilmiştir. Çalışmamızda identifikasyon için şeker asimilasyon ticari kiti olan AuxaColor (Bio-Rad SDP, Paris, France) ve antifungal duyarlılık saptanmasında Fungitest (Bio-Rad SDP, Paris, France) ticari kiti kullanılarak, çeşitli servislerde yatmakta olan hastalardan izole edilen *Candida* cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal duyarlılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ocak 2011-Aralık 2013 tarihleri arasında çeşitli hasta örneklerinden izole edilen *Candida* suşları retrospektif olarak incelenmiştir. Aynı örnekten soyutlanan farklı türlere ait suşlar çalışmaya dahil edilirken, aynı hastaya ait aynı türden suşlar çalışma dışı bırakılmıştır.

Tür tayini germ tüp yöntemi ve CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France) besiyerindeki koloni görünümleri ve renkleri ile AuxaColor (Bio-Rad SDP, Paris, France) ticari kitiyle üretici firma talimatlarına uyularak yapılmıştır. Kolonilerden hazırlanan 1.5 McFarland bulanıklığındaki maya süspansiyonu, ilk kuyucuğu negatif kontrol, geriye kalan 15 kuyucuğu kolorimetrik biyokimyasal testleri içeren, 16 kuyucuktan oluşan tek kullanımlık plastik mikropklara eklenmiştir. Kuyucuklardan 13'ü şeker (glikoz, mal-

toz, sükröz, galaktoz, laktoz, rafinoz, inozitol, cellobioz, trehaloz, adonitol, melezitöz, ksiloz, arabinoz) kullanımını, biri, son kuyucuk ise fenoloksidaz enzim aktivitesini test etmektedir. Sonuçlar, mikropklaklar 30°C'de inkübe edilerek 24 ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir.

Antifungal duyarlılık çalışması için kolorimetrik olarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değerlerini saptayan Fungitest ticari kiti kullanılmıştır. Bu kit ile suşların amfoterisin B (AMF), flukonazol (FLU), mikonazol (MIK), itrakonazol (ITR), 5-flusitozin (5-F) ve ketokonazole (KET) karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Üretici firmanın talimatlarına göre oluşturulan maya süspansiyonu, her bir antifungal için iki kritik konsantrasyon içeren 12 kuyucuğa, negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarına dağıtılmıştır. Kitteki MİK sınır değer konsantrasyonları AMF için 2-8 µg/ml, 5-F için 2-32 µg/ml, MIK için 0.5-8 µg/ml, KET ve ITR için 0.5-4 µg/ml, FLU için 8-64 µg/ml'dir. Testler 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Üreme olmayan negatif kuyucuğun mavi kaldığı ve üreme olan pozitif kontrolün pembe renge dönüştüğü mikropklaklar değerlendirmeye alınmıştır. Kuyucuklardaki mavi renk değişmeden kaldığında suş test edilen antifungale hassas, sadece düşük konsantrasyonda pembe renk oluştuğunda orta duyarlı ve her iki konsantrasyonda da pembe renk oluştuğunda dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Fungitest ticari kiti ile dirençli veya orta duyarlı bulunan AMF ve FLU sonuçları E-test şeritleri (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) ile de değerlendirilmiştir.

Verilerin değerlendirilmesi amacı ile SPSS 15.0 paket programında oranlar arasındaki farkın anlamlılık derecesi için ki-kare ve Fisher testi uygulanmış, p değerinin 0.05'ten küçük olması durumunda sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Ocak 2011-Aralık 2013 tarihleri arasında 45'i kan, 12'si steril vücut sıvısı, 10'u idrar, üçü bronkoalveolar lavaj, biri kateter kültürü olmak üzere 64 hastadan toplamda 71 *Candida* suşu izole edilmiştir.

Tablo 1: Yaş aralıklarına, servislere ve yıllara göre *Candida* türlerinin dağılımı

Türler	2	2-20	20-40	40-60	60<	Yoğun bakım	Dahili	Cerrahi	2011	2012	2013	(%)
<i>C.albicans</i> (n:28)	16	4	-	2	6	11	14	3	12	10	6	%39
<i>C.parapsilosis</i> (n:13)	9	1	-	1	2	4	8	1	3	5	5	%18.31
<i>C.glabrata</i> (n:11)	2	1	-	4	4	1	6	4	5	4	2	%15.49
<i>C.tropicalis</i> (n:10)	4	4	-	2	-	3	6	1	2	2	6	%14.08
<i>C.krusei</i> (n:4)	-	1	1	1	1	1	2	1	2	2	-	%5.63
<i>C.dublinskiensis</i> (n:1)	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	%1.41
<i>C.lusitaniae</i> (n:3)	1	-	-	-	2	1	1	1	1	2	-	%4.23
<i>C.keyfr</i> (n:1)	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	%1.41
Toplam (n:71)	33	11	1	11	15	21	38	12	27	25	19	%100

Tablo 2: Fungitest yapılan *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıkları (n)

	Amfoterisin B		Flukonazol		Mikonazol		Itrakonazol		5-flusitozin		Ketokonazol	
	O	D	O	D	O	D	O	D	O	D	O	D
<i>C. albicans</i> (n=17)	-	-	3	1	5	-	4	3	-	-	5	-
<i>C. parapsilosis</i> (n=11)	1	-	-	-	11	-	6	1	-	-	1	-
<i>C. glabrata</i> (n=6)	-	-	1	1	4	-	4	2	1	-	2	1
<i>C. tropicalis</i> (n=5)	-	1	-	1	4	-	4	1	1	1	1	-
<i>C. krusei</i> (n=3)	-	-	-	3	2	-	3	-	2	-	2	-
<i>C. dublinskiensis</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i> (n=3)	-	-	-	-	1	-	2	-	1	-	-	-
<i>C. keyfr</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam (n=47)	1	1	5	5	27	-	23	7	5	1	11	1

*O: Orta duyarlı, D: Dirençli, **Diğer suşlar hassas olarak belirlenmiştir.

Hastaların 31'inin (%48) kadın, 33'inin (%52) erkek olduğu görülmüştür. Hastalardan 33'ü iki yaşın altında, 11 hasta 2-20 yaş arası, bir hasta 20-40 yaş arası, 11 hasta 40-60 yaş arası, 15 hasta 60 yaş üstüdür. Yaş aralıklarına göre *Candida* türlerinin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Toplam 71 *Candida* suşunun 28'i (%39) *C. albicans*, 13'ü (%18.31) *C. parapsilosis*, 11'i (%15.49) *C. glabrata*, 10'u (%14.08) *C. tropicalis*, dördü (%5.63) *C. krusei*, üçü (%4.23) *C. lusitaniae*, birer tane ise (%1.41) *C. keyfr* ve *C. dublinskiensis* olarak tanımlanmıştır. *Candida* türlerinin servislere göre dağılımı yıllara göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. *C. albicans* ve diğer türlerin yaşlara göre dağılımları benzer olup, iki yaş altı ve 60 yaş üstü grupta daha fazla oldukları görülmüştür.

Candida türlerinin antifungal duyarlılıkları Tablo 2'de detaylı olarak incelenmiştir. Antifungale hassas olan suşlar tabloya eklenmemiştir. Fungitest sonuçlarına göre FLU ve AMF'ye hassas olmayan suşlar E-test metoduyla değerlendirilmiş; FLU'ya orta duyarlı olan

C. albicans suşunun ikisi ve dirençli olan suş 256 µg/ml olarak elde edilmiştir. Orta duyarlı *C. albicans* suşlarından biri ise 32 µg/ml bulunmuştur. Fungitest ile FLU'ya dirençli olan *C. tropicalis* suşunun MİK değeri ise E-test ile 0.38 µg/ml bulunmuştur.

AMF'ye orta duyarlı olan bir *C. parapsilosis* suşunun MİK değeri Etest metodu ile 1.5 µg/ml bulunmuştur. AMF'ye dirençli olan bir *C. tropicalis* suşunun MİK değeri ise E-test metodu ile 1.5 µg/ml olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Hastanelerde görülen fırsatçı mantar infeksiyonları giderek artmakta, buna bağlı olarak mantar türlerinin tanımlanması ve antifungal direnç testlerinin yapılması giderek önem kazanmaktadır.

Günümüzde klinik örneklerden en sık izole edilen tür *C. albicans* olarak bildirilmekteyse de *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin oranı gittikçe artmaktadır. 1990 yılı öncesinde fungal infeksiyon etkeni ola-

rak non-albicans *Candida*'lar %10-40 oranında saptanırken, 1990 sonrasında bu oran %35-63'e ulaşmıştır (5). Bizim çalışmamızda da bu oran %61 olarak bulunmuştur.

Değişik çalışmalarda da kültürlerde en sık saptanan *Candida* türü *C. albicans* olmakla birlikte *C. albicans* dışındaki kandidaların da farklı oranlarda olduğu görülmüştür. Mokaddes ve ark.'nın (6) yaptığı çalışmada *C. albicans* %39.5, *C. parapsilosis* %30.6, *C. tropicalis* %12.4, *C. glabrata* %5.6 olarak bulunmuşken; Takakura ve ark. (7) aynı türleri sırasıyla %40.7, %23.0, %11.6, %17.9; Pfaller ve ark.(8) %63.5, %6.6, %7.5, %11.4 oranında saptamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Özbek ve ark. (9) *C. albicans*'ı %56.3, *C. parapsilosis*'i %30.9, *C. tropicalis*'i %5.45, *C. glabrata*'yı %1.81 olarak bulmuşlarken; Cömert ve ark.(10) bu oranları aynı tür sırasıyla %65.6, %11.3, %7.8, %8.8; Zer ve ark. (11) %56.09, %11.21, %10.24, %5.83; Çelebi ve ark.(12) %39.2, %21.6, %15.7, %6.9; Aslan ve ark. (13) %40, %10, %22, %17; Ergon ve ark. 14 %53.3, %6.5, %14.5, %12.2 olarak saptamışlardır. Literatüre benzer şekilde çalışmamızda da en sık izole edilen tür *C. albicans* (%39) olmuş, onu *C. parapsilosis* (%18), *C. glabrata* (%15) ve *C. tropicalis* (%14) takip etmiştir.

Üç yıllık periyotta *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* oranlarındaki artış, *C. albicans* ve *C. glabrata* oranlarındaki azalış dikkat çekmektedir. Bu değişimin sebebi ampirik olarak uygulanan antifungallere karşı türler arasında değişen direnç paterni nedeniyle olabilir.

Çalışmamızda üçüncü sırada izole edilmiş olan *C. glabrata* izolasyon oranı (%15) ülkemizde yapılan çalışmalardan %17 bulunan bir çalışma hariç (13), diğer çalışmalara göre (9-12,14) yüksek bulunmuştur. Yurt dışındaki çalışmalarda *C. glabrata* izolasyon oranlarının çalışmada saptadığımız orana yakın (7,15-17) ya da daha yüksek (6,8,9) oldukları görülmüştür. Çalışmanın kapsadığı yıllar incelendiğinde *C. glabrata* suş oranında azalma gözlenmiştir.

Meletiadis ve ark.'nın (18) yaptığı çalışmada yaygın olarak kullanılan üç mantar tanımlama sistemi (API ID32C, Auxacolor, Vitek 2-YST) referans moleküler yöntem ile karşılaştırılmış ve tüm izolatlarda Auxacolor'un %80 oranında doğru tanımlama yaptığı bulunmuştur. Bu oran diğer ticari tanımlama sis-

temleri ile benzerdir (API ID32C %83, Vitek 2-YST %84). Türler sık ve nadir türler olarak ikiye ayrılmıştır. Auxacolor'un sık izole edilen *Candida* türlerinde (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) %94.5, nadir *Candida* türlerinde %43 oranında doğru tanımlama yaptığı bildirilmiştir (18). Sık olarak izole edilen türlerin nadir olarak izole edilen türlere göre bu ticari kitlerle tanımlanmasının daha doğru sonuç vereceği ortaya koyulmuştur. Bizim çalışmamızın %93'ünü sık olarak görülen türlerin oluşturması laboratuvarımızda tür tayininin doğru yapılma ihtimalini artırmaktadır.

Yaş dağılımları değerlendirildiğinde iki yaş altı ve 60 yaş üstü gruplarda hastalar yoğunlaşmaktadır. İki yaş altında ki 33 hastanın %80'i bir yaşın altındadır. Bu hastalar genel olarak yoğun bakımlarda ve çocuk infeksiyon kliniğinde takip edilen hastalardır. Bunun sebebi bu hasta gruplarında yoğun şekilde antibiyoterapinin yapılması ve hastaların bağışıklık sistemindeki baskılanma ile fırsatçı enfeksiyon olarak mantar infeksiyonlarının ortaya çıkması olabilir. *Candida* türlerinin yaşlara göre dağılımı benzerdir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Mantar infeksiyonunun sıklığının ve buna bağlı mortalite ve morbidite oranlarının yükselmesi, ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uygun ve etkin antifungal tedavinin seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerine gereksinim artmaktadır (19). Bu yüzden mayalar için altın standart mikrodilüsyon yöntemi için "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından standartlar belirlenmiştir. Çalışmamız sırasında CLSI M27-A3 ve M27-S3 (20) dökümanları ile EUCAST tarafından "clinical breakpoints-fungi v3.0" (21) ve son olarak v.7.0 (22) yayınlanmıştır.

Çalışmamızda duyarlılık çalışması için kullandığımız kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi olan Fungitest uygulaması ve değerlendirmesi üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Diğer ticari kitlerin aksine Fungitest antifungal ilaçları iki dilüsyon olarak test etmektedir. Fungitest, besiyeri ve mikropalak özelliği açısından CLSI M27-A3'te belirtilen kriterlere uymakta iken, MİK sınır değerleri ile karşılaştırıldığında FLU için uygun konsantrasyonları içermekte, ITR ve 5-F için içermemektedir. AMF B, KET, MİK

Tablo 3: FUNGİTEST ticari kitinin test ettiği konsantrasyonlar ile referans yöntem mikrodilüsyon için CLSI ve EUCAST'ın belirlediği standartlar MİK'lerin karşılaştırılması

Antifungal ilaç	Kandida türü	CLSI M27S3 (µg/ml)			CLSI M27S4 (µg/ml)			EUCAST v7.0*		FUNGİTEST**		
		H	DBH	D	H	DBH	D	H	D	8-64 µg/ml		
Fluconazole	<i>C. albicans</i>	≤8	16-32	≥64	≤2	4	≥8	≤2	>4	H	0	D
	<i>C. glabrata</i>	≤8	16-32	≥64	-	≤32	≥64	≤0,002	>32	≤8	16-32	>64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	64		
	<i>C. parapsilosis</i>	≤8	16-32	≥64	≤2	4	≥8	≤2	>4			
	<i>C. tropicalis</i>	≤8	16-32	≥64	≤2	4	≥8	≤2	>4			
Amphotericin B	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	≤1	>1	2-8 µg/ml		
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	≤1	>1	H	0	D
	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	≤1	>1	≤2	4-8	>8
	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	≤1	>1			
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	≤1	>1			
Itraconazole	<i>C. albicans</i>	≤0.125	0.25-0.5	≥1	-	-	-	≤0.06	>0,06	0.5-4 µg/ml		
	<i>C. glabrata</i>	≤0.125	0.25-0.5	≥1	-	-	-	IE	IE	H	0	D
	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	IE	IE	≤0.5	1-2-4	>4
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0.125	0.25-0.5	≥1	-	-	-	≤0.12	>0.12			
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.125	0.25-0.5	≥1	-	-	-	≤0.12	>0.12			
Flucytosine	<i>C. albicans</i>	H	O	D								
	<i>C. glabrata</i>	≤4	8-16	≥32	-	-	-	-	-	2-32 µg/ml		
	<i>C. krusei</i>	≤4	8-16	≥32	-	-	-	-	-	H	0	D
	<i>C. parapsilosis</i>	≤4	8-16	≥32	-	-	-	-	-	≤2	4-8	>32
	<i>C. tropicalis</i>	≤4	8-16	≥32	-	-	-	-	-	16-32		

*Çalışmamızın başladığı yılda verilen v3.0'dan itibaren ITR MİK'leri ve *C. glabrata* için FLU MİK'leri eklenmiştir.

**Fungitest ticari kitinde test edilen MİK ve KET için referans dökümanlarda konsantrasyonlar yer almamaktadır.

***H: Hassas, DBH: Doza bağımlı hassas O: Orta duyarlı, D: Dirençli

için 2008 CLSI M27-A3'te kriter belirtilmemiştir. Belirtilen dışında kalan antifungaller için duyarlılık testlerinin yapılmasının rutinindeki geçerliliği ve önemi bilinmemektedir (20).

Tablo 3'te de gösterildiği gibi CLSI M27-S3'deki ITR için hassas ≤0.125 µg/ml, doza bağımlı hassas 0.25-0.5 µg/ml ve dirençli ≥1 MİK sınır değerleri iken, test edilen ilaç konsantrasyonları 0.5-4 µg/ml'dir. Bu durum ITR için Fungitest'in orta duyarlı olarak saptadığı 22 suşun ilacın 1µg/ml konsantrasyonunda test edilmediğinden dirençli de olma olasılığı göz ardı edilmemelidir. Benzer şekilde ITR hassas MİK sınır değeri olarak test edilen 0,5 µg/ml ile 17 hassas suşu sadece doza bağımlı hassas olarak belirlemek mümkün olmaktadır.

5-F için CLSI M27-A3 kriterlerine göre hassas MİK sınır değeri ≤4 µg/ml, orta duyarlı suşların MİK aralı-

ğı 8-16 µg/ml'dir. Fungitest'te hassas MİK sınır değeri 2 µg/ml olup çalışmamızda orta duyarlı olarak saptanan beş suşun duyarlı olma olasılığı vardır.

Yapılan Fungitest ile CLSI broth mikrodilüsyon uyumluluk çalışmalarında FLU duyarlılık testi için %0,6-16,6 arasında değişen farklılık bildirilmiştir. Tür düzeyinde bu uyumsuzluklar değişkenlikler göstermektedir (23-27). Yapılan bir çalışmada daha çok küçük farklılık (%23), daha az büyük farklılık (%1) saptanmış, toplam 164 uyumsuz sonucun 84'ü *C. glabrata* nedeniyle olduğu belirlenmiştir (24).

Eucast prosedürleri ile ticari testlerin uyumunun gösterildiği bir çalışmada ise, AMF B ve FLU dirençli izolatlar Sensititre YeastOne, Etest ve Fungitest tarafından doğru bir şekilde tespit edilmiş, özellikle Etest ve Fungitest, kandida klinik izolatların antifungal duyarlılık testi için EUCAST prosedürüne uygun bir

alternatif olarak belirlenmiştir (28).

Aralık 2012'de yayınlanan CLSI M27-S4 (29) dökümanı ile Fungitest karşılaştırıldığında ise FLU dışındaki antifungaller için kriter belirtilmemiştir ve MİK değerleri türlere göre farklılıklar gösterip, değerleri düşürülmüştür. Bu nedenle Fungitest ticari kitinin yeni referanslara göre revize edilmesi gerekmektedir.

FLU'nun yaygın kullanımı, beraberinde azol direncinin ortaya çıkmasına, etken *Candida* türlerinin sıklık sırasının azollere karşı duyarlılığı düşük olan türlere kaymasına veya azollere hassas *C. albicans* veya *C. tropicalis* gibi suşların MİK değerlerinde yükselmeye yol açmıştır (30). Çalışmamızda kliniklerde ampirik olarak en sık kullanılan antifungal olan FLU'ya dirençli suş %10.6, orta duyarlı suş %10.6 bulunmuştur. Literatüre bakıldığında bu oran %19 FLU direnci bulan İris ve ark. (31) dışında diğer çalışmalardan yüksektir. Diğer çalışmalarda Boschman ve ark. (32) %8.6, Zepelin ve ark. (15) %3.7, Mokaddes ve ark. (6) %2.8, Cömert ve ark. (10) %2.5, Bakır ve ark. (33) %0.7 bulmuşlardır.

FLU'ya orta duyarlı üç *C. albicans* suşunun ikisi ve FLU'ya dirençli olan bir adet *C. albicans* suşunun MİK değerleri Etest metodu ile değerlendirilmiş MİK değerleri 256 µg/ml olarak bulunmuştur. FLU'ya orta duyarlı bir *C. albicans* suşunun MİK değeri ise 32 µg/ml bulunmuştur. Dirençli olan *C. tropicalis* suşunun MİK değeri ise 0,38 µg/ml bulunmuştur. *Candida* suşlarının referans yöntem ile Etest antifungal duyarlılık uyumunun araştırıldığı çalışmada FLU duyarlılığı uyumu %79.4 olduğu göstermişlerdir (34). Bu sonuçlara göre FLU için orta duyarlı ve dirençli sonuçların referans yöntemlerle teyit edilmesi yararlı olacaktır.

Çalışmamızda flukonazole *C. glabrata* suşlarının biri orta duyarlı, biri dirençli bulunmuştur. Üç *C. krusei* suşunun biri orta duyarlı, ikisi dirençli bulunmuştur. Bu türlerden *C. krusei* flukonazole doğal dirençli, *C. glabrata* flukonazole dirençli ya da doza bağlı duyarlı olabilmektedir (1). Raporlama sırasında bu göz önünde bulundurulmalıdır.

AMF direnci çalışmamızda %2.1 bulunmuştur. Benzer olarak Adiloğlu ve ark. (35) AMF direncini %2.63 bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda AMF direnci iki çalışmada daha düşük olarak Mokaddes

ve ark. (6) %0.70, Boschman ve ark. (32) %0.99, Zepelin ve ark. (15) %0.5 bulunmuştur. İris ve ark. (31), Bakır ve ark. (33), Özbek ve ark. (9) AMF dirençli suş saptamamışlardır.

C. lusitaniae suşlarında amfoterisin B direncine daha sık rastlanmaktadır (1). Çalışmamızdaki *C. lusitaniae* suşlarının üçü de hassasken, bir *C. tropicalis* suşu dirençli, bir *C. parapsilosis* suşu orta duyarlı bulunmuştur. AMF'ye karşı, orta duyarlı olan bir *C. parapsilosis* suşu ve dirençli olan bir *C. tropicalis* suşunun MİK değerleri Etest metodu ile değerlendirilmiş, her iki suşun da değerleri 1.5 µg/ml bulunmuştur. *Candida* suşlarının referans yöntem ile Etest antifungal duyarlılık uyumunun araştırıldığı çalışmada AMF duyarlılığı uyumu %93.1 olduğu göstermişlerdir (34). Amfoterisin B potansiyel direnci en iyi Etest ile belirlenebildiği kabul eden çalışmalar (36) olmakla birlikte bu konu tartışmalıdır.

Antifungal duyarlılık testlerinde ve mantar tiplenmesinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. FLU ve AMF gibi antifungallere karşı gittikçe artan direnç oranları bildirilmektedir. Bu çalışmada fungal infeksiyonların kontrolü için tür tayini ve antifungal duyarlılık test sonuçlarının bilinmesi önemli olduğu ve antifungal ajanlara karşı gittikçe artan direnç oranları nedeniyle tedavi planlamasında duyarlılık testlerinin giderek daha önem kazandığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Auxacolor ve Fungitest'in uygulama ve değerlendirilmesi kolay ve pratik testler olduğu görülmüştür. Ancak Fungitest'in sonuçlarının yorumlanması ve raporlanmasında antifungal MİK sınır değerlerinin güncel guidelinelerle uyumuz olması nedeniyle zorluklar mevcuttur. Ayrıca antifungallerin sadece iki konsantrasyonda test edilemesi kısıtlayıcı olmaktadır. Bu ticari kit ile belirlenen orta duyarlı ve dirençli sonuçların referans yöntemlerle teyit edilmesi uygun olacaktır. Antifungal duyarlılık testlerinin klinik yararlılıklarını ortaya koymada kritik adım, test sonuçları ile hastanın tedaviye yanıtı arasındaki ilişkinin ortaya konulmasıdır. Bunun için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür: İstatistiksel çalışmalardaki yardımları için Prof. Dr. Ethem Erginöz'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
- Beck-Sagué CM, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *The Journal of Infectious Diseases* 1993; 1247-51.
- Valente P, Ramos J, Leoncini O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can J Microbiol* 1999; 45: 949-58.
- Özyavuz-Alp ŞÜÖ. Nozokomiyal Fungal Enfeksiyonlar. Doğanay MÜS, Şardan Y (editor). *Hastane İnfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2013. p. 459-86.
- Şahin E, Ersöz G, Otağ F, Kandemir Ö, Tiftik N, Kaya A ve ark. Hematolojik maligniteli nötropenik ateşli hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20: 121-4.
- Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56: 255-9.
- Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Inuma Y, Ichiyama S, et al. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 283-9.
- Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Meis J, Gould I, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997-2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1735-45.
- Özbek E, Tekay F, Pirinçioğlu HÇ. Yoğun bakım hastalarına ait çeşitli örneklerden izole edilen *Candida* izolatlarında antifungal direnç. *Dicle Tıp Dergisi* 2012; 39:207-12.
- Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O, Ozlu N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses* 2007; 50: 52-7.
- Zer Y, Balci I, Meric G. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from intensive care unit patients. *New Microbiol* 2002; 25: 489-94.
- Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozkaya G. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. *Mycoses* 2008; 51: 248-57.
- Aslan FOG, Şen S, Özturhan H, Emekdaş G. 2003-2005 süresinde klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2005; 19: 435-43.
- Ergon MC, Yücesoy M. Yoğun bakım ünitelerinden dört yıllık dönemde izole edilen mayaların tür dağılımının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bülteni* 2005; 39: 309-18.
- Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Groß U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 424-8.
- St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault A-M, Libman M, Lemieux C, et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of 442 *Candida* Isolates from Blood and Other Normally Sterile Sites: Results of a 2-Year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 949-53.
- Pfaller M, Jones R, Doern G, Sader H, Messer S, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 747-51.
- Meletiadiis J, Arabatzis M, Bompola M, Tsiveriotis K, Hini S, Petinaki E, et al. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2722-7.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Antifungal Agents and Susceptibility Test Methods. In: Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press; 2003.p.1859-80.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd edition, 2008, CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- EUCAST Antifungal Subcommittee: http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables/. TEAS.
- EUCAST Antifungal Subcommittee: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/v7.0. TEAS. 2014.
- Willinger B, Engelmann E, Hofmann H, Metzger S, Apfalter P, Hirschl AM, et al. Multicenter comparison of Fungitest® for susceptibility testing of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 253-7.
- Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 926-30.
- Swinne D, Raes-Wuytack C, Van Looveren K, Desmet P. Comparative evaluation of Fungitest-, Neo-Sensitabs- and M27T-NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 1999; 42: 231-7.
- Willinger B, Apfalter P, Hirschl AM, Makrithathis A, Rotter M, Seibold M. Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 11-5.
- Witthuhn F, Toubas D, Beguinot I, Aubert D, Rouger C, Remy G, et al. Evaluation of the fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 864-6.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 486-92.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd edition, 2012, CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85.
- İris-Efe N, Ersöz-Arat M ŞF. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Klinik Dergisi* 2008; 2: 61-4.

32. Boschman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, Obias AA, Noskin GA, Englund K, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 734-8.
33. Bakir M, Cerikcioglu N, Barton R, Yagci A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *Apmis* 2006; 114: 601-10.
34. Koc AN, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M. Comparison of Etest with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000; 43: 293-7.
35. Adiloğlu AK, Şirin MC, Ciciođlu-Aridođan B, Can R, Demirci M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen candida kökenlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 5: 33-6.
36. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1289-90.