

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Flukonazol E Test Duyarlılıklarının CLSI Referans Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırılması

Mehmet Veysel Coşkun, İclal Ağan, M. Hamidullah Uyanık, Hayrünisa Hancı, Kemalettin Özden

ÖZ

Özellikle invaziv *Candida* enfeksiyonu etkeni izolatlar için duyarlılık testi yapılması son yıllarda antifungal ajanlara karşı artış gösteren dirençle birlikte büyük bir önem taşımaktadır. Ancak antifungal duyarlılık testi olarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından standardize edilen sıvı mikrodilüsyon yönteminin (Broth Mikrodilüsyon; BMD) uygulanmasındaki zorluklar araştırmacıları rutin laboratuvarında kullanılabilecek daha pratik yöntem arayışına itmektedir. Bu çalışmanın amacı hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* izolatlarında, sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajan olan flukonazole karşı duyarlılığın belirlenmesinde E test yönteminin standart BMD yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma süreci içerisinde biriktirilen izolatların tiplendirilmesi ile hastanemizde en sık kandidemi etkeni olan *Candida* türlerinin oranı da belirlenmiştir.

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2012-Aralık 2015 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürlerinden (BACTEC 9000 Sistemi; Becton Dickinson*) izole edilen 74 *Candida* izolatı (49 adet *C. albicans*, 15 adet *C. parapsilosis*, 6 adet *C. tropicalis*, 4 adet *C. glabrata*) dahil edilmiştir. *Candida* türlerini tanımlamak için kromojenik agar ve VITEK 2 otomatize sisteminin (BioMerieux*,Fransa) ilgili tiplendirme kartları kullanılmış, gerekli olması durumunda şuşların mısır unlu Tween 80 agar besiyerinde morfolojik görünümüne bakılmıştır. *Candida* türlerinin flukonazol duyarlılıkları CLSI tarafından tanımlanan standart BMD yöntemi ve E test yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 74 izolatın 49'nun (%66.2) *albicans* ve 25'inin ise (%33.8) *albicans* dışı türler olduğu görülmüştür. En sık izole edilen *albicans* dışı türün *C.parapsilosis* (%20.2) olduğu tespit edilmiştir. MİK değerlerine göre *C.albicans* ve *C.glabrata* izolatlarında her iki yöntemle de flukonazol direncine rastlanmamıştır. Bununla birlikte 15 *C.parapsilosis* izolatının 2'si her iki yöntemle flukonazole dirençli olarak gözlenirken; 6 *C.tropicalis* izolatından 2'si E test yöntemi ile dirençli olarak yorumlanmıştır. BMD yöntemi ile ise aynı *C.tropicalis* izolatlarından biri duyarlı diğeri ise doz bağımlı duyarlı (S-DD) olarak tespit edildi. Buna göre *Candida* türlerinde toplam direnç oranı E test yöntemi ile %5.4 iken bu oran BMD yönteminde %2.7 olarak belirlenmiştir. *C.tropicalis* türlerinde E test yöntemi ile dirençli BMD yöntemi ile duyarlı olan sonuç "büyük hata" (ME); E test yöntemi ile dirençli BMD yöntemi ile doz bağımlı duyarlı (S-DD) olan sonuç ise "küçük hata" (mE) şeklinde değerlendirilmiştir. *Candida* türlerinde E test ile flukonazol duyarlılığı bakılmasında "çok büyük hata"ya (VME) rastlanmamış, toplam uyum (EA) %85.1 olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz veriler E test yönteminin rutin laboratuvarında *Candida* türleri için alternatif bir antifungal duyarlılık testi olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte her ne kadar E test yöntemi, BMD yöntemine göre kolay kullanıma sahip olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması avantajlarını taşısa da, antifungal duyarlılık testi olarak kullanılırken uygulama ve yorumlama aşamalarında dikkat ve deneyim gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Candida*, E-test, flukonazol, mikrodilüsyon testi

Mehmet Veysel Coşkun, İclal Ağan, M. Hamidullah Uyanık
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Erzurum

Hayrünisa Hancı
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim
Dalı, Erzurum

Kemalettin Özden
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı,
Erzurum

Corresponding Author:

Mehmet Veysel Coşkun
e-posta: coskun.veysel@gmail.com
Tel. (0442) 231 69 32

Submitted / Gönderilme: 30.10.2016 Revised / Düzeltme: 05.01.2017

Accepted / Kabul: 06.01.2017

Giriş

İnvaziv *Candida* enfeksiyonları yüksek mortalite ve morbidite oranları ile birlikte hastanede yatış süresini ve tedavi maliyetlerini arttırması nedeniyle tüm dünyada halen önemli bir sağlık problemi olarak görülmektedir (1). Kandidemi olgularının insidansı maligniteler, immünsüpresif hastalıklar veya tedaviler, geniş spektrumlu antibiyotik ve kortikosteroid kullanılması, agresif kemoterapiler ve bazı major cerrahi prosedürler ile artmaktadır (2,3). Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) ve The National Healthcare Safety Network (NHSN) verilerine göre *Candida* türleri Amerika ve Avrupa'da sepsis etkenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (2, 4-6). Bununla birlikte antifungal ajanlara karşı artmakta olan direncin varlığı antifungal duyarlılık testlerinin

önemini artırmaktadır. Her ne kadar antifungal ajan seçimi öncelikle fungal identifikasyona dayansa da özellikle invaziv *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde antifungal duyarlılık testleri (AFDT) doğru antifungal ajanın seçimi için önemli bir rol oynamaktadır (7, 8).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) *Candida* türlerinde flukonazol in vitro duyarlılığını test etmek için broth mikrodilüsyon yöntemini (BMD) yıllar önce standardize etmiştir (9). Bununla birlikte BMD yönteminin zaman alıcı olması ve uygulanmasında bazı zorluklarla karşılaşılmasının yanısıra rutin kullanıma uygun olmaması laboratuvarlarda antifungal duyarlılık tayininde rutin kullanılacak pratik yöntem arayışına neden olmaktadır. Bunların içerisinde rutin uygulamada standardize edilmemiş olsa da E test yöntemi, pratik kullanıma sahip olması ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması avantajları ile antifungal duyarlılık tayininde önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (10).

Bu çalışma ile hastanemizde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* izolatlarında, sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajan olan flukonazole karşı duyarlılığın belirlenmesinde E test yönteminin standart BMD yöntemi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma süreci içerisinde laboratuvarımıza gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *Candida*'ların tiplendirilmesi ile hastanemizde en sık kandidemi etkeni olan *Candida* türlerinin oranı da belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Candida kökenleri: Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2012-Aralık 2015 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürlerinden (BACTEC 9000 Sistemi; Becton Dickinson)* izole edilen 74 *Candida* izolatu (49 adet *C.albicans*, 15 adet *C.parapsilosis*, 6 adet *C.tropicalis*, 4 adet *C.glabrata*) dahil edilmiştir. İzole edilen *Candida* türlerini tanımlamak için kromojenik agar ve VITEK 2 otomatize sisteminin (BioMerieux*,Fransa) ilgili tiplendirme kartları kullanılmış, gerekli olması durumunda mısır unlu Tween 80 agar besiyerindeki morfolojik görünümüne bakılmıştır. Tiplendirilen suşlar çalışmanın planlandığı tarihe kadar stok besiyeri süspansiyonları hazırlanarak -80 °C'de saklanmıştır. Duyarlılık testi öncesinde suşlar oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra optimal üreme ve saf kültür elde edilmesi amacı ile Saboraud Dekstroz Agar'da (Oxoid, İngiltere) iki kez pasajlanmıştır. *Candida* türlerinin flukonazol duyarlılıkları BMD ve E test yöntemleri ile incelenmiştir.

Çalışmada *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 suşları kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi: CLSI M27-A3 önerilerine göre *L*-glutaminli, bikarbonatsız, RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) kullanılarak referans mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (11). Bu besiyeri %2 dekstroz ilave edilip 0.165 M morfolin-propan-sülfonik asit (MOPS; Sigma) ile pH'ı 7 olarak ayarlandıktan sonra BMD testinde kullanılmıştır. Bu yöntem doğrultusunda önce flukonazol toz etken maddesi (Pfizer) BMD testinde kullanılacak son konsantrasyonunun 10 katı olacak şekilde çözülüp stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra %2 dekstroz ilave edilip MOPS ile tamponlanmış *L*-glutaminli, bikarbonatsız, RPMI 1640 ile dilüe edilip steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu mikropaklara her kuyucukta 100 µl besiyeri-ilaç çözeltisi olacak şekilde iki kat azalan seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Otomatik ölçüm cihazı ile % 0.85 sodyum klorür içerisinde 0.5 McFarland süspansiyonları hazırlanan suşlar CLSI M27-A3 standartlarına uygun olarak dilüe edilip sadece sondan bir önceki kuyucuk boş bırakılacak şekilde tüm kuyucuklara 100'er µl dağıtılmıştır (11). Sondan bir önceki kuyucuk sterilite kontrol kuyucuğu ve en sondaki kuyucuk üreme kontrol kuyucuğu olarak ayrılmıştır. Böylece son flukonazol konsantrasyonunun 64 µg/mL-0.125 µg/mL aralığında olması sağlanmıştır. Plaklar 24 saatlik inkübasyondan sonra ön değerlendirmeye alınmış üreme olmaması durumunda 48 saatlik inkübasyon ardından üç farklı araştırmacı tarafından çıplak gözle değerlendirilmiştir. Üreme kontrol kuyucuğuna göre %50 ve daha az üreme olan en küçük ilaç konsantrasyonuna sahip kuyucuk MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Araştırmacılar tarafından ortak MİK değeri belirlenemeyen suşlar yeniden çalışılmıştır.

E test Yöntemi: Bu test için flukonazol E test (BioMerieux*, Fransa) stripleri kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda %2 glikoz ve %1.5 agar içeren RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyerine % 0.85 sodyum klorürde 0.5 McFarland standard bulanıklığına göre süspansiyonları hazırlanmış *Candida* izolatları eküvyon ile agar yüzeylerine inokule edilmiştir. Agar plakların yüzeyleri kuruduktan sonra flukonazol (0.016 µg/mL-256 µg/mL) içeren E-test şeritleri yerleştirilmiştir. Daha sonra plaklar 37°C'de 24 saat, eğer yetersiz üreme varsa 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında E test şeridinde %80 üreme inhibisyonu sağlayan en küçük değer MİK (µg/mL) değeri olarak belirlenmiştir.

Değerlendirme: Flukonazol MİK değerleri CLSI M27-S4 sınır değerlerine göre değerlendirilmiş ve *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C. tropicalis* için MİK değeri ≤ 2 µg/mL, 4

$\mu\text{g/mL}$ ve $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ olan izolatlar sırasıyla duyarlı (S), doza bağlı duyarlı (S-DD) ve dirençli (R) olarak yorumlanırken; *C.glabrata* için MİK değeri $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ olan suşlar SS-D ve $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ olan suşlar R olarak yorumlanmıştır (12). E test ve BMD yöntemlerinden elde edilen MİK değerleri arasında ± 2 kat dilüsyona kadar fark olması yöntemler arası mutlak uyum (EA) olarak değerlendirilmiştir. MİK değerleri karşılaştırılırken 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlar dikkate alınmıştır. Daha geniş MİK aralığına sahip E-testten elde edilen MİK değerleri, karşılaştırmanın kolay olması amacıyla, BMD ile elde edilen MİK değerinin en yakın bir üst konsantrasyon değerine eşitlenmiştir. Duyarlılık sonuçları farklı olan suşlar için VME (Very Major Error), ME (Major Error) ve mE (minor error) belirlenmiştir. Bunun için E-test ile duyarlı ancak BMD ile dirençli bulunan suşlar için VME; E-test ile dirençli ancak BMD ile duyarlı bulunan suşlar için ME; bir suşun bir yöntemle dirençli veya duyarlı bulunup diğer yöntemle doza bağlı duyarlı bulunması için de mE değerlendirmesi yapılmıştır .

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 74 *Candida* izolatı hastanemizdeki 16 farklı klinikte yatmakta olan hastalara ait kan kültürlerinden izole edilen suşlardır. Bunların büyük çoğunluğunu Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım (%27), Dahiliye Yoğun Bakım (%14.8), Dahiliye Hematoloji (%10.8), Pediatri Yoğun Bakım (%9.5), Medikal Onkoloji (%8.1) ve Nöroloji Yoğun Bakım (%6.8) kliniklerinde yatmakta olan hastalar oluşturmaktadır. İzole edilen *Candida* türlerinin servislere göre dağılımı Tablo 1'de özetlenmiştir.

İzole edilen suşlar içerisinde *albicans* türlerinin (%66.2) *albicans* dışı türlerden (%33.8) daha fazla olduğu görüldü. En sık izole edilen *albicans* dışı tür *C.parapsilosis* (%20.2) idi.

Çalışmamızda E-test ve standart BMD yöntemleri ile elde edilen MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralıklarının *Candida* türlerine göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi en düşük MİK değeri *C.albicans* türlerinde saptanırken (MİK:0.094 $\mu\text{g/ml}$) en yüksek MİK değerleri *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* türlerinde (MİK:16 $\mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir.

Tablo 1. *Candida* türlerinin izole edildikleri servislere göre dağılımı (n=74).

Servisler	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.glabrata</i>	Toplam
Anestezi YB*	11	5	4	-	20
Dahiliye YB	9	1	-	1	11
Dahiliye Hematoloji	5	2	-	1	8
Genel Pediatri YB	6	-	1	-	7
Medical Onkoloji	6	-	-	-	6
Nöroloji YB	3	2	-	-	5
Organ Nakli	2	-	1	1	4
Pediyatrik Enfeksiyon	1	2	-	-	3
Yeni Doğan YB	1	1	-	-	2
Enfeksiyon Hastalıkları	2	-	-	-	2
Kardiyoloji YB	1	-	-	1	2
Pediyatrik Hematoloji	1	1	-	-	2
Beyin Cerrahi YB	1	-	-	-	1
Yanık Tedavi Ünitesi	-	1	-	-	1
Toplam	49	15	6	4	74

*YB: Yoğun Bakım

Tablo 2. Flukonazol için *Candida* türlerine Karşı E-test ve BMD Yöntemi ile Elde Edilen MİK₅₀, MİK₉₀ ve MİK aralığı Sonuçları (n= 74)

Tür (n)	MİK ₅₀		MİK ₉₀		MİK aralığı		Toplam uyum
	E test	BMD	E test	BMD	E test	BMD	
<i>C.albicans</i> (49)	0.25	0.125	0.38	0.25	0.094-1.5	0.125-0.5	(47) %95.9
<i>C.parapsilosis</i> (15)	0.38	0.25	8	8	0.125-16	0.125-16	(14) %93.3
<i>C.tropicalis</i> (6)	0.38	0.5	12	2	0.19-16	0.125-4	(1) %16.6
<i>C.glabrata</i> (4)	-	-	-	-	0.38-6	0.125-1	(1) %25
Bütün izolatlar (74)	0.25	0.125	2	1	0.094-16	0.125-16	(63) %85.1

MİK değerleri CLSI M27-S4 sınır değerlerine göre yorumlandığında iki *C.parapsilosis* izolatı her iki yöntemle flukonazole dirençli olarak gözlenirken (E test ve BMD MİK: 16 µg/mL); iki *C.tropicalis* izolatı E test ile dirençli olarak yorumlanmış (E test MİK: 12 µg/mL-16 µg/mL), BMD ile ise aynı izolatlardan biri duyarlı (BMD MİK: 2) diğeri ise doz bağımlı duyarlı (BMD MİK: 4) olarak tespit edilmiştir. Buna göre *Candida* türlerinde flukonazole toplam direnç oranı E test yöntemi ile %5.4 iken bu oran BMD yönteminde %2.7 olarak belirlenmiştir. *C.tropicalis* türlerinde E test yöntemi ile dirençli BMD yöntemi ile duyarlı olan sonuç “büyük hata” (ME); E test yöntemi ile dirençli BMD yöntemi ile doz bağımlı duyarlı olan sonuç ise “küçük hata” (mE) şeklinde değerlendirilmiştir. *Candida* türlerinde E test ile flukonazol duyarlılığı bakılmasında “çok büyük hata”ya (VME) rastlanmamış, toplam uyum (EA) %85.1 olarak hesaplanmıştır.

Tartışma

Azoller diğer antifungal ajanlara göre daha az toksik etkiye sahip olmaları avantajı ile fungal enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu durum son zamanlarda fungal ajanlarda azole karşı direnç artışına neden olmuş ve enfeksiyon etkeni fungal izolatlar için AFDT'nin önemini arttırmıştır. Ancak AFDT olarak CLSI tarafından standardize edilen BMD yöntemi zaman alıcı olmakla birlikte değerlendirme zorluğu içeren bir yöntemdir. Bu sebeple araştırmacılar rutin laboratuvarında AFDT olarak kullanılacak daha pratik ve güvenilir yöntem arayışı içerisinde. Bu amaçla planlanan çalışmamızda mukokutanöz ve sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajan olan flukonazole duyarlılığın saptanmasında E test ve BMD yöntemleri karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlarla E test yönteminin etkinliği araştırılmıştır. Ayrıca çalışma süreci içerisinde biriktirilen izolatların dağılımı ile hastanemizde en sık kandidemi etkeni olan *Candida* türleri de belirlenmiştir.

Çalışmamızda kan kültürlerinden *C.albicans*'ın (%66.2) *albicans* dışı *Candida* türlerinden (%33.8) daha sık izole edildiği görülmüştür. İzolasyon oranları ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalardaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir (13-15). Ancak hem ülkemizde hem yurt dışında kan kültürlerinden *albicans* dışı *Candida* türlerinin *C.albicans*'tan daha sık izole edildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır(16-20).

Çalışmamızda en sık izole edilen *albicans* dışı *Candida* türünün *C.parapsilosis* (%20.2) olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte (13, 18, 21) *C.tropicalis* ve *C.glabrata*'yı da kan kültürlerinden en sık izole edilen *albicans* dışı *Candida* türü olarak belirten çalışmalar da bulunmaktadır (16, 17, 22). Hem *C.albicans-albicans* dışı *Candida* oranları arasında hem de en sık izole edilen *albicans* dışı *Candida* türleri arasında gözlenen değişkenliğin bölgesel farklılıklar ile birlikte ampirik antifungal kullanımına ve çalışmaya dahil edilen suş sayısına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Elde ettiğimiz MİK değerlerine göre çalışmamızda *Candida* türlerinde toplam direnç oranı E test yöntemi ile %5.4 ve BMD yöntemi ile %2.7 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada da flukonazole karşı direnç oranlarının düşük olduğu belirtilmiştir (13, 14, 18, 21).

AFDT yapılırken MİK değerlerinin 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyon süresine göre değişim göstermesi “trailing phenomem” olarak adlandırılmaktadır (23). *Candida* türlerinde azol duyarlılığı bakılırken sıklıkla karşılaşılan bu durum benzeri çalışmalardan elde edilen sonuç farklılığına yansımaktadır. Bazı araştırmacılar hem 24 saat sonraki hem de 48 saat sonraki değerlendirme sonuçlarını dikkate almışken bazıları sadece 24 saat sonraki değerlendirme sonuçlarını belirtmişlerdir (13, 24, 25). Yapılan birtakım çalışmalarda özellikle flukonazol için 24 saatlik inkübasyon sonrası yapılan değerlendirmenin daha uygun olduğu belirtilmiştir (26). Bizim çalışmamızda da 24 saatlik inkübasyon sonrası yapılan değerlendirme dikkate alınmıştır.

Candida türlerinde AFDT yapılmasında E test yönteminin etkinliği konusunda yurt dışında birçok çalışma yapılmışken ülkemizde bu konuda yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır (13, 27-31). Bunların içerisinde 1997 yılında Arıkan ve ark (27) tarafından yapılan bir çalışmada 101 *Candida* suşunda flukonazol ve amfoterisin B için AFDT yapılmasında E test yöntemi ile kolorimetrik dilüsyon yöntemi, standart broth makrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılmış E test yönteminin toplam uyumu 24 saatlik ve 48 saatlik değerlendirme sonrası sırasıyla %84 ve %87 olarak tespit edilmiştir. Koç ve ark (28, 29) 1998 yılında 60 ve 2000 yılında 98 *Candida* suşu ile yaptıkları iki farklı çalışmada 24 saatlik değerlendirme sonrası BMD yöntemi ile karşılaştırıldığında E test yönteminin flukonazol duyarlılığı bakılmasındaki toplam uyumunu sırasıyla %85 ve %79.4 olarak belirlemişlerdir. 2010 yılında bu amaçla yapılmış iki çalışma bulunmaktadır. Keçeli ve ark (13) 46 *Candida* suşunda flukonazol ile birlikte 4 farklı antifungal için E testin etkinliğini BMD yöntemi

ile kıyaslamış ve flukonazol için E test yönteminin toplam uyumunu 24 saatlik değerlendirme sonrası %80.4 olarak bulmuşken Evcı ve ark (31) bu oranı 86 *Candida* suşu için 24 saatin sonundaki değerlendirme ile %85.5, 48 saatin sonundaki değerlendirme ile %73.3 olarak gözlemişlerdir. Bu sonuçlara göre bizim çalışmamız dahil ülkemizde yapılmış benzeri çalışmalarda *Candida* türlerinde flukonazol için antifungal duyarlılık bakılmasında E test yönteminin toplam uyum oranı %79.4-%94.1 aralığında seyretmektedir.

Yurt dışında yapılan benzeri çalışmalarda da E test yönteminin *Candida* suşlarında AFDT olarak güvenilirliği hem 24 saatlik hem de 48 saatlik değerlendirmeler sonrasında yüksek olarak bulunmuştur (toplam uyum: %90-%99.5)(10, 24, 25, 32-34).

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre hastanemizin çeşitli kliniklerinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşları için flukonazol direnç oranının düşük olduğu gözlenmiştir. Bu

suşlar içerisinde en sık *C.albicans* türü izole edilirken en sık izole edilen *albicans* dışı *Candida* türü *C.parapsilosis*'tir. *Candida* türlerinde E test yöntemi ile flukonazol duyarlılığı bakılmasında VME rastlanmazken; bir *C.tropicalis* suşu için ME ve başka bir *C.tropicalis* suşu için mE tespit edilmiş, E test yönteminin toplam uyumu %85.1 olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz veriler E test yönteminin rutin laboratuvarında *Candida* türleri için alternatif bir AFDT olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte her ne kadar E test yöntemi BMD yöntemine göre kolay kullanıma sahip olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması avantajları taşısa da, AFDT olarak kullanılırken uygulama ve yorumlama aşamalarında dikkat ve deneyim gerektirmektedir. Ayrıca çalışmamız suş sayısı ve antifungal çeşitliliği açısından sınırlılık taşıdığından sonuçlarımız daha çok sayıda suşla ve farklı antifungal ajanlarla yapılacak geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmelidir.

Comparison of the E test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Fluconazole against *Candida spp.* Isolated from Blood Cultures

Abstract

Increased resistance against antifungal agents recently shows the importance of antifungal susceptibility testing especially to *Candida spp.* isolated from invasive infections. Although the Broth Microdilution (BMD) method has been standardized as an antifungal susceptibility testing by "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", difficulties in the practice of the this method pushed the researchers to seek more practical methods that can be used in routine laboratories. The aim of this study was to compare E-test method with standard BMD method for antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* isolated from blood cultures in our hospital, against fluconazole which is commonly used in the treatment of systemic *Candida* infections. In addition by the distribution of the accumulated isolates in the process of the study, the most common species of *Candida* causes Candidemia in our hospital were determined.

74 *Candida* strains (49 *C. albicans*, 15 *C.parapsilosis*, 6 *C.tropicalis*, 4 *C. glabrata*) isolated from blood cultures (BACTEC 9000 System, Becton Dickinson *) sent from various clinics to Atatürk University Hospital Medical Microbiology Laboratory between April 2012-December 2015 were included in the study. Chromogenic agar, automated VITEK 2 system (BioMerieux®, France) and if necessary the morphological appearance on Corn Meal Agar with Tween® 80 were used to identify *Candida spp.* Fluconazole susceptibility of *Candida* species were

determined by standard BMD method defined by CLSI and E test method.

While 49 of the 74 isolated strains (66.2%) were *albicans*, 25 of them (33.8%) were found to be non-*albicans* species. The most frequently non-*albicans* species were *C.parapsilosis* (20.2%). According to the MIC values, no fluconazole resistance was interpreted for *C.albicans* and *C.glabrata* by both methods. However, 2 of 15 *C.parapsilosis* strains were interpreted as resistant to fluconazole with both methods and 2 of 6 *C.tropicalis* strains were interpreted as resistant with E test method. While one of the same *C.tropicalis* strains was interpreted as susceptible, the other one was interpreted as susceptible-dose dependence (S-DD) with BMD method. According to these findings the total resistance rate of *Candida* species was 5.4% by E test method while it was determined as 2.7% in BMD method. In *C.tropicalis* species the result which was resistance by E test method and sensitive by BMD method was evaluated as "major error" (ME); the result which was resistance by E test method and susceptible-dose dependence (S-DD) by BMD method was evaluated as "minor error" (mE). Any "very major error" (VME) was not found and the total agreement (EA) was calculated as 85.1% in the study.

According to our results that can be suggested E test method can be used as an alternative antifungal susceptibility test in routine laboratory. However, although the E test method is easy to use and has high reproducibility advantage compared with the BMD method, it requires attention and experience in the application and interpretation phases of antifungal susceptibility testing.

Keywords: Broth microdilution, *Candida*, E-test, fluconazole

Kaynaklar

- Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 1.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
- Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10: 95-105.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
- Sievert DM, Rick P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Fridkin S. National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34: 1-14.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Grillot R. Epidemiology of candidaemia in Europe: Results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 317-22.
- Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 153-60.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Zaoutis TE. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2015; 4: 933.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing; Approved Standards. NCCLS, USA. 2002.
- Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispaill P, Lachaud L. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and E test methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 154-61.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A3. CLSI, Wayne PA, USA. 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; 4th Informational Supplement, M27-S4. CLSI, Wayne PA, USA. 2012.
- Keçeli Özcan S, Mutlu B, Dündar D, Willke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile E test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 263-71.
- Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH. Çeşitli *Candida* türlerinin iki farklı triazol duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. *Eurasian J Med* 2007; 39: 177.
- Alışkan HE, Bozkırlı ED, Çolakoğlu Ş, Demirbilek M. Hastanemizde üç yıllık süreçte kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* ve *non-albicans Candida* türlerinin etken olduğu kandidemilerdeki risk faktörlerinin irdelenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg* 2015; 73: 15-24.
- Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 478-88.
- Yılmaz G, Çiftçioğlu A, Gündüz M, Özen M, Sarıcaoğlu EM, Akan H. Kandidemi saptanan hematolojik kanserli hastalarda etken dağılımı ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 2015; 28: 117-21.
- Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2015; 29: 105-13.
- Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, Puntillo F. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: Results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* 2013; 41: 645-53.
- Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, Colombo AL. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS one* 2016; 11: e0146909.
- Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin b ve flukonazol *in vitro* duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg* 2012; 28: 149-51.
- Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg* 2013; 70: 175-80.
- Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 217-24.
- Menezes EA, Vasconcelos Júnior AAD, Ângelo MRF, Cunha MDCDS, Cunha FA. Correlation between microdilution, E test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole against *Candida sp.* blood isolates. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 106-7.
- 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 Chem* 2003; 47: 1647-51.
- Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Diekema DJ. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 845-50.
- Arikan S, Gür D, Akova M. Comparison of E test,

- microdilution and colorimetric dilution with reference broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses* 1997; 40: 291-6.
28. Koç AN, Gökahmetoğlu S, Oguzkaya M. Antifungal susceptibility testing of yeasts with broth microdilution and E-test methods. *ANKEM Derg* 1998; 12: 497-502.
 29. Koç AN, Gökahmetoğlu S, Oguzkaya M. Comparison of E test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000; 43: 293-7.
 30. Yücesoy M, Mutlu E, Yuluğ N. Antifungal duyarlılığın saptanmasında E test yönteminin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2001; 15: 670-7.
 31. Evcı C, Ener B, Göral G, Akçağlar S. Comparative evaluation of the antifungal susceptibility of *Candida* isolates from blood specimens: results of a study in a tertiary care hospital in Bursa, Turkey. *Turk J Med Sci* 2010; 40: 141-9.
 32. Jaruvongvanich V. Correlation between broth microdilution, E-test and disk diffusion methods for testing antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from Thai blood samples. *Asian Biomed* 2016; 75.
 33. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, E test, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1781-4.
 34. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ, International Fungal Surveillance Participant Group. Evaluation of E test method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1087-90.