

Klinik *Candida glabrata* İzolatlarında Flukonazol ve Vorikonazol Duyarlılığının Saptanmasında Mikrodilüsyon ve Disk Difüzyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Yeni CLSI Direnç Sınır Değerleri ile Duyarlılık Sonuçlarındaki Değişimin Belirlenmesi

Comparison of Microdilution and Disk Diffusion Methods for the Detection of Fluconazole and Voriconazole Susceptibility Against Clinical *Candida glabrata* Isolates and Determination of Changing Susceptibility with New CLSI Breakpoints

Gülşen HAZIROLAN¹, Zeynep SARIBAŞ², Sevtap ARIKAN AKDAĞLI²

¹ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

¹ Ankara Numune Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışmanın bir kısmı, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS) kongresi (5-9 Ağustos 2008, İstanbul)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 12.01.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.05.2016

ÖZ

Candida enfeksiyonu etkenleri içinde *Candida albicans* en sık izole edilen türdür. Ancak, son yıllarda *albicans*-dışı *Candida* türlerinin izolasyon oranı artmıştır. Pek çok merkezde *Candida glabrata* sıklıkla izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türleri arasındadır. Flukonazol duyarlılığının azalmış olması ve diğer azollere karşı çapraz direnç göstermesi nedeniyle *C. glabrata* enfeksiyonlarının tedavisi zordur. Bu çalışmanın amacı, klinik *C. glabrata* izolatlarının flukonazol ve vorikonazole in vitro duyarlılık profilinin sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle saptanması ve sonuçların önceki ve yeni türe özgü CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) direnç sınır değerlerine göre değerlendirilmesidir. Çalışmaya, klinik örneklerden izole edilen 70 *C. glabrata* suşu alınmış ve izolatların tür düzeyinde tanımlanması, mısırlı Tween 80 agardaki morfolojik görünüm ve ID32C (BioMérieux, Fransa) kullanılarak elde edilen asimilasyon profillerine göre

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Gülşen Hazırolan, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ülkü Mahallesi, Talatpaşa Bulvarı 06100 Altındağ, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 508 4477, **E-posta (E-mail):** drgulscencetin@yahoo.com

yapılmıştır. Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri, sırasıyla, CLSI M27-A3 ve M44-A2 kılavuzuna uygun olacak şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar, CLSI M27-A3 ve M44-A2 kılavuzuna ve yeni türe özgü CLSI direnç sınır değeri önerilerine göre değerlendirilmiştir. Önceki ve yeni CLSI direnç sınır değerlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılık sonuçları saptandığında, vorikonazolün *C.glabrata* izolatlarında in vitro olarak, flukonazolden daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon yönteminde önceki ve yeni direnç sınır değerleri ile elde edilen duyarlılık kategorileri, mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak her iki ilaç için de karşılaştırıldığında, çok büyük hata saptanmamıştır. Yeni önerilen türe özgü direnç sınır değerlerinde flukonazol için “duyarlı” kategorisi olmadığından, önceki değerlendirmede duyarlı bulunan izolatlar, yeni sınır değerlere göre doza bağlı duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Vorikonazol için ise henüz yeni türe özgü direnç sınır değerleri bulunmadığından, değerlendirme yapılamamıştır. Disk difüzyon yöntemi 24. saat sonuçları mikrodilüsyon yöntemi ile önceki ve yeni CLSI direnç sınır değerleriyle karşılaştırılmış, flukonazol ve vorikonazol için sırasıyla önceki direnç sınır değerleri ile %80 ve %92.8; yeni direnç sınır değerleri ile ise %87.1 ve %94.2 oranında uyum tespit edilmiştir. Yeni direnç sınır değerleri ile elde edilen ve önceki değerlere oranla daha yüksek bulunan uyum oranları, disk difüzyon yönteminin, *C.glabrata* izolatlarında flukonazol ve vorikonazol için in vitro duyarlılığın belirlenmesinde genelde güvenilir bir alternatif yöntem olduğunu düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida glabrata*; flukonazol; vorikonazol; in vitro duyarlılık; mikrodilüsyon; disk difüzyon; CLSI M27-A3; CLSI M44-A2.

ABSTRACT

Candida albicans is the most frequently isolated species as the causative agent of *Candida* infections. However, in recent years, the isolation rate of non-*albicans* *Candida* species have increased. In many centers, *Candida glabrata* is one of the commonly isolated non-*albicans* species of *C.glabrata* infections which are difficult-to-treat due to decreased susceptibility to fluconazole and cross-resistance to other azoles. The aims of this study were to determine the in vitro susceptibility profiles of clinical *C.glabrata* isolates against fluconazole and voriconazole by microdilution and disk diffusion methods and to evaluate the results with both the previous (CLSI) and current species-specific CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) clinical breakpoints. A total of 70 *C.glabrata* strains isolated from clinical samples were included in the study. The identification of the isolates was performed by morphologic examination on cornmeal Tween 80 agar and assimilation profiles obtained by using ID32C (BioMérieux, France). Broth microdilution and disk diffusion methods were performed according to CLSI M27-A3 and CLSI M44-A2 documents, respectively. The results were evaluated according to CLSI M27-A3 and M44-A2 documents and new vs. species-specific CLSI breakpoints. By using both previous and new CLSI breakpoints, broth microdilution test results showed that voriconazole has greater in vitro activity than fluconazole against *C.glabrata* isolates. For the two drugs tested, very major error was not observed with disk diffusion method when microdilution method was considered as the reference method. Since “susceptible” category no more exists for fluconazole vs. *C.glabrata*, the isolates that were interpreted as susceptible by previous breakpoints were evaluated as susceptible-dose dependent by current CLSI breakpoints. Since species-specific breakpoints remain yet undetermined for voriconazole, comparative analysis was not possible for this agent. The results obtained at 24 hours by disk diffusion method were evaluated by using both previous and current CLSI breakpoints and the agreement rates for fluconazole and voriconazole were 80% and 92.8% with previous CLSI breakpoint, 87.1% and 94.2% with new breakpoints, respectively. The high agreement rates between the two methods obtained by the new breakpoints in particular suggest that disk diffusion appears as a reliable alternative method in general for in vitro susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *C.glabrata* isolates.

Keywords: *Candida glabrata*; fluconazole; voriconazole; in vitro susceptibility; microdilution; disk diffusion; CLSI M27-A3; CLSI M44-A2.

GİRİŞ

Fırsatçı mikoz etkenleri arasında *Candida*, birçok merkezde birinci sırada yer almaktadır. İnvazif *Candida* enfeksiyonlarının yaklaşık %95'i *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *C.krusei*'ye bağlı olarak gelişmektedir¹⁻³. Günümüzde özellikle immün sistemi baskılanmış olgulardan izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türlerinde artış olduğu birçok merkezden rapor edilmektedir. Enfeksiyon bölgesine göre değişiklik göstermekle birlikte *C.glabrata*, farklı merkezlerde *C.albicans*'tan sonra ikinci veya üçüncü sıklıkta kandidiyaz etkeni olarak izole edilmektedir². Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir çalışmada 1992-2001 yılları arasında invazif kandidiyaz etkeni olarak izole edilen suşlar içinde *C.glabrata*'nın oranı %18 iken, 2001-2007 yılları arasında bu oran %25'e çıkmıştır³. Ülkemizden bildirilmiş *Candida* enfeksiyon ve kolonizasyon olgularında çeşitli merkezlerden farklı oranlar (%37-65) bildirilmekle beraber, genellikle *C.albicans* birinci sırada yer almaktadır. *C.glabrata* ise, *C.albicans*'tan sonra ilk dört sırada yer almaktadır ve izolasyon sıklığı %8.8 ile %14 arasında değişmektedir⁴⁻⁷. Flukonazol, 1990 yılından beri sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Candida glabrata*, flukonazole doğal direnç ya da duyarlılığın azaldığı gözlenen bir *Candida* türüdür².

"Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", 2008 yılında *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığının saptanması amacıyla direnç sınır değerlerini içeren, önceki dökümana göre revize edilmiş olan CLSI M27-A3 sıvı mikrodilüsyon referans yöntemi dökümanını yayınlamıştır⁸. 2012 yılında ise, *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığının saptanmasında öncekilerden farklı olarak türe özgü olarak belirlenmiş olan yeni CLSI klinik direnç sınır değeri önerileri bildirilmiştir. Bu kılavuzda *C.glabrata* izolatlarında flukonazol için belirlenmiş yeni türe özgü klinik direnç sınır değerleri mevcuttur. *C.glabrata* ve vorikonazol için ise, klinik direnç sınır değerleri henüz saptanmamış olup, epidemiyolojik eşik değerler belirlenmiştir⁹⁻¹¹.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C.glabrata* izolatlarının flukonazol ve vorikonazole in vitro duyarlılıklarının mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle saptanması amaçlanmıştır. Mikrodilüsyon (MD) ve disk difüzyon (DD) yöntemi sonuçları, CLSI önceki direnç sınır değerleri ve yeni türe özgü direnç sınır değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar çerçevesinde, ilk olarak *C.glabrata* izolatlarında, flukonazol ve vorikonazol için MD ve DD yöntemleri arasındaki uyum değerlendirilmiştir. CLSI'ın önceki direnç sınır değerleri ile elde edilen sonuçlar yeni direnç sınır değerleri ile saptanan sonuçlar ile karşılaştırmalı olarak incelenip, duyarlılık kategorilerinde saptanan farklılıklar da belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik İzolatlar

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden (44 idrar, 8 solunum yolu, 6 vajinal sürüntü, 4 kan, 4 kateter ve birer adet olmak üzere püye, apse, biyopsi materyali ve BOS örneği) izole edilen 70 *C.glabrata* izolatı alındı. Tür düzeyinde tanımlama, koloni morfolojisi, mısır unlu Tween 80 besiyerindeki

morfolojik görünüm ve ID32C (BioMérieux, Fransa) ile saptanan asimilasyon profili değerlendirilerek yapıldı¹².

Antifungal Duyarlılık Testleri

C.glabrata suşlarının flukonazol (Pfizer, ABD) ve vorikonazole (Pfizer, ABD) in vitro duyarlılıkları, CLSI tarafından önerilen MD (M27-A3) yöntemiyle çalışıldı⁸. *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 suşları, kalite kontrolü amacıyla her teste dahil edildi. DD testleri ise, flukonazol ve vorikonazol için CLSI DD (M44-A2) yöntemi parametreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla flukonazol (25 µg, BD Diagnostics, ABD) ve vorikonazol (1 µg, BD Diagnostics, ABD) diskleri kullanıldı¹³.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI önerilerine göre 35°C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyonu takiben iki araştırmacı tarafından görsel olarak değerlendirildi. Her iki ilaç için de, üreme kontrol çukuruca göre üremeyi %50 azaltan en düşük konsantrasyon, MİK-2 değeri olarak kabul edildi. CLSI'nın önceki önerileri göz önüne alınarak, *C.glabrata* izolatlarının flukonazol ve vorikonazole direnç oranları saptandı⁸. DD (M44-A2) yöntemi ile inhibisyon zon çaplarının ölçümü, 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda, önceki CLSI direnç sınır değerlerine göre belirlendi (Tablo I)^{13,14}.

Mikrodilüsyon ve DD test sonuçları yeni, türe özgü CLSI önerilerine göre de değerlendirildi. MD test sonuçları flukonazol için yeni türe özgü direnç sınır değerleri göz önüne alınarak, vorikonazol için antifungal duyarlılık profilleri ise, yeni türe özgü direnç sınır değerlerinin henüz kesinlik kazanmamış olması nedeniyle, sadece belirlenmiş epidemiyolojik sınır değerleri kullanılarak değerlendirildi^{10,11}. DD testleri ise, yeni türe özgü zon çapı önerileri göz önüne alınarak yorumlandı (Tablo I)^{15,16}. MD ve DD yöntemleri ile flukonazol ve vorikonazol için önceki ve yeni önerilen direnç sınır değerleri ile elde edilen sonuçlar, duyarlılık kategorilerindeki değişimlerle karşılaştırılarak incelendi.

BULGULAR

CLSI M27-A3 kılavuzunda önerilen önceki direnç sınır değerlerine göre MD yöntemi ile 24 saat inkübasyon sonunda *C.glabrata* izolatlarının %94.3'ü flukonazole duyarlı, %5.7'si DBD saptanırken, izolatların tümü vorikonazole duyarlı olarak saptanmıştır. Öte yandan, 48 saat inkübasyon sonunda *C.glabrata* suşlarının %80'i flukonazole duyarlı,

Tablo I. Flukonazol ve vorikonazol için önerilen eski ve yeni direnç sınır değerleri^{8,10,11,13-16}

		Flukonazol			Vorikonazol			WT	NWT
		H	DBD	D	H	DBD	D		
Mikrodilüsyon (µg/ml)	Eski	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 1	2	≥ 4	-	-
	Yeni	-	≤ 32	≥ 64	-	-	-	≤ 0.5	> 0.5
Disk difüzyon (mm)	Eski	≥ 19	15-18	≤ 14	≥ 17	14-16	≤ 13	-	-
	Yeni	-	≥ 15	≤ 14	-	-	-	≥ 16	< 16

H: Duyarlı; DBD: Doza bağlı duyarlı; D: Dirençli; WT: "Wild-type"; NWT: "Non-wild-type".

%15.7'si DBD, %4.3'ü dirençli; vorikonazol için ise izolatların %98.6'sı duyarlı, %1.4'ü DBD olarak saptanmıştır. Flukonazol için 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar, 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, 48 saatte duyarlı suşların oranında azalma saptanmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, flukonazol ve vorikonazol için sürenin 48 saate uzatılması ile izolatların flukonazolde duyarlı kategorisinden %15.7 oranında DBD kategorisine ve %1.4 oranında dirençli kategorisine; vorikonazolde ise duyarlı kategorisinden %2.8 oranında DBD kategorisine ve %8.5 oranında dirençli kategorisine geçtiği saptanmıştır. Sonuç olarak, flukonazol için 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar, 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, 48 saatte duyarlı suşların oranında azalma saptanmıştır. Önceki CLSI direnç sınır değerlerine göre elde edilen sonuçlar Tablo II'de özetlenmiştir.

Önceki CLSI sınır değerleri ile elde edilen MD ve DD sonuçlarının kategori uyumu karşılaştırıldığında; 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda uyum oranlarının flukonazol için sırasıyla %80 ve %64.3, vorikonazol için sırasıyla %92.8 ve %81.4 olduğu saptanmıştır. Önceki CLSI değerlerine göre, MD ile elde edilen duyarlılık kategorileri esas alınarak flukonazol DD test sonuçları MD sonuçları ile karşılaştırıldığında, 24 saatte 6 izolat (%8.5) için büyük hata ve 8 izolat (%11.4) için küçük hata; 48 saatte 3 izolat (%4.3) için büyük, 22 izolat (%35.7) için ise küçük hata saptanmıştır. Vorikonazol sonuçları için benzer bir karşılaştırma yapıldığında, 24 saatte 5 izolat (%7.1) için büyük hata; 48 saatte 10 izolat için (%14.3) büyük, 3 izolat için (%4.3) ise küçük hata belirlenmiştir. Bu karşılaştırmada, flukonazol ve vorikonazol duyarlılık sonuçlarında hiçbir izolat için çok büyük hata saptanmamıştır.

Sonuçlar, CLSI tarafından yeni önerilen türe özgü direnç sınır değerlerine göre değerlendirilmiş ve yöntemler karşılaştırılmıştır. MD yöntemi ile 24 saatte *C.glabrata*

Tablo II. Önceki CLSI değerleri kullanılarak mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile flukonazol ve vorikonazol için elde edilen duyarlılık sonuçları (%) (n= 70)

FLUKONAZOL (24 saat)					VORİKONAZOL (24 saat)				
		Disk difüzyon					Disk difüzyon		
		H	DBD	D			H	DBD	D
Mikrodilüsyon	H	80	5.7	8.6	Mikrodilüsyon	H	92.8	-	7.1
	DBD	1.4	-	4.3		DBD	-	-	-
	D	-	-	-		D	-	-	-
FLUKONAZOL (48 saat)					VORİKONAZOL (48 saat)				
		Disk difüzyon					Disk difüzyon		
		H	DBD	D			H	DBD	D
Mikrodilüsyon	H	60	15.7	4.3	Mikrodilüsyon	H	81.4	2.9	14.3
	DBD	8.6	-	7.1		DBD	-	-	1.4
	D			4.3		D	-	-	-

H: Duyarlı; DBD: Doza bağlı duyarlı; D: Dirençli.

izolatlarının tümü flukonazole DBD olarak saptanırken, dirençli izolat saptanmamıştır. *C.glabrata* izolatları 48 saatte ise %95.7 oranında flukonazole DBD olarak saptanırken, %4.3 oranında dirençli olarak saptanmıştır. 48 saatte dirençli saptanan bu izolatların MİK değerleri 24 saatte sınırdan 32 µg/ml olup, DBD olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması ile bu izolatların duyarlılık kategorisi dirençli olarak değişmiştir. Vorikonazol için ise, mikrodilüsyon yöntemi ile 24 ve 48. saatte *C.glabrata* izolatlarının tümü "wild-type" olarak saptanmıştır. DD yöntemi ile de şuşların 24 saatte %5.7'si, 48 saatte ise %14.2'si "non-wild-type" olarak bulunmuştur. CLSI'nın yeni önerilerine göre DD yöntemi sonuçları değerlendirildiğinde; flukonazol için, 24 saatte *C.glabrata* izolatlarının %87.1'i DBD ve %12.9'u dirençli olarak, 48 saatte ise %94.3'ü DBD ve %5.7'si dirençli olarak saptanmıştır. Vorikonazol için MD ve DD yöntemlerinde elde edilen sonuçlar epidemiyolojik sınır değerleri kullanılarak karşılaştırıldığında, 24 saatte %94.2 oranında uyum saptanmıştır (Tablo III). MD ve DD yöntemleri önceki CLSI direnç sınır değerleri ile karşılaştırıldığında, her iki ilaç için de çok büyük hata saptanmamıştır. Çok büyük hataya neden olmamakla beraber her iki ilaçla da yöntemler arasında büyük ve küçük hatalar tespit edilmiştir. Bu hatalı sonuçlar flukonazolde vorikonazole göre daha yüksek oranda belirlenmiştir. Önceki CLSI önerilerine göre 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki ilaç için de yöntemler arası uyumsuzluk oranı, 48 saat inkübasyon süresi sonunda daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, CLSI MD yöntemiyle önceki direnç sınır değerleriyle elde edilen duyarlılık sonuçları, yeni direnç sınır değerleriyle elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Yeni kriterlerde, flukonazol ve *C.glabrata* için duyarlı kategorisinin kaldırılmış olması nedeniyle, önceki direnç sınır değerlerine göre duyarlı olan tüm izolatlar yeni türe özgü direnç sınır değerlerine göre, DBD olarak değerlendirilmiştir. Önceki direnç sınır değerlerine göre 48 saat sonunda DBD olan izolatlar, yeni türe özgü direnç sınır değerleri ile de DBD olarak değerlendirilmiştir. Önceki direnç sınır değerlerine göre dirençli olan 3 (%4.8) izolat, yeni türe özgü direnç sınır değerleri ile değerlendirildiğinde de dirençli olarak saptanmıştır.

CLSI DD yöntemiyle önceki direnç sınır değerleriyle elde edilen duyarlılık sonuçları, yeni direnç sınır değerleriyle elde edilenlerle karşılaştırıldığında; önceki direnç sınır değerleri ile duyarlı olan izolatlar, kriterlerdeki değişikliğe uygun olarak yeni türe özgü direnç sınır değerlerine göre DBD olarak sınıflandırılmış, DBD ve dirençli olan izolatlar içinse kategori değişikliğinin görülmediği tespit edilmiştir (Tablo IV).

Tablo III. Yeni CLSI değerleri kullanılarak mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile flukonazol ve vorikonazol için elde edilen sonuçların yeni önerilen duyarlılık kategorilerine göre karşılaştırılması (24 saat) (n= 70)

FLUKONAZOL (24 saat)				VORİKONAZOL (24 saat)			
		Disk difüzyon				Disk difüzyon	
		DBD	D			WT	NWT
Mikrodilüsyon	DBD	61 (%87.1)	9 (%12.8)	Mikrodilüsyon	WT	66 (%94.3)	4 (%5.7)
	D	0	0		NWT	0	0

DBD: Doza bağlı duyarlı; D: Dirençli; WT: "Wild-type"; NWT: "Non-wild type (dirençle ilişkili mutasyon içerme olasılığı olan).

Flukonazol sonuçları yeni önerilen CLSI direnç sınır değerleri doğrultusunda saptandığında MD ile DD yöntemleri arasındaki uyumun, önceden önerilen CLSI direnç sınır değerlerine göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Yeni önerilen CLSI direnç sınır değerlerine göre 24 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, yöntemler arası uyumun vorikonazolde daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Antifungal duyarlılık testlerinde, ABD’de CLSI ve Avrupa’da EUCAST (European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing) komiteleri tarafından geliştirilen in vitro metodolojiler, mevcut olan referans yöntemlerdir. Geliştirilen ve standardize edilen bu yöntemler, öncelikle makrodilüsyon ve daha sonra mikrodilüsyon, disk difüzyon yöntemleri olup, bunlardan maya mantarları için olanlar CLSI M27-A3, M27-S4, EUCAST E. Def 7.2 ve CLSI M44-A2 kılavuzlarında yayınlanmıştır^{8,9,13,17}. Bugün *Candida* türleri için yeni, türe özgü direnç sınır değerleri belirlenmiş olup kabul görmüş durumdadır^{9,10,16,18,19}. Bu çalışmada da, klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* izolatlarının flukonazol ve vorikonazol için in vitro duyarlılık profilleri önceki ve yeni CLSI direnç sınır değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda önceki ve yeni CLSI direnç sınır değerlerine göre flukonazol ve vorikonazol duyarlılık sonuçları incelendiğinde, 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda, vorikonazolün, flukonazol ile karşılaştırıldığında, *C. glabrata* izolatlarına in vitro olarak daha etkin olduğu görülmektedir. Azevedo ve arkadaşları²⁰ ile Quindos ve arkadaşları²¹ da, çalışmamıza benzer olarak yaptıkları araştırmada, vorikonazolün flukonazole göre, *C. glabrata* izolatlarına in vitro daha etkin olduğunu saptamışlardır. Çekin ve arkadaşları⁵ ise, *C. glabrata* izolatlarında, vorikonazolün flukonazolden daha aktif olduğunu ve direnç oranının vorikonazolde daha düşük saptandığını bildirmişlerdir.

Mikrodilüsyon yöntemi ile 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen sonuçlar önceki CLSI önerilerine göre değerlendirildiğinde, özellikle flukonazol için 48 saatte duyarlılık sonuçlarında kategori değişikliği olduğu görülmüştür. Mikrodilüsyon (MD) ve

Tablo IV. Önceki ve yeni CLSI direnç sınır değerlerine göre flukonazol mikrodilüsyon ve disk difüzyon test sonuçları (%) (n= 70)

MİKRODİLÜSYON (24 saat)					DİSK DİFÜZYON (24 saat)				
		Önceki CLSI					Önceki CLSI		
		H	DBD	D			H	DBD	D
Yeni CLSI	DBD	94.3	5.7	-	Yeni CLSI	DBD	81.4	5.7	-
	D	-	-	-		D	-	-	12.9
MİKRODİLÜSYON (48 saat)					DİSK DİFÜZYON (48 saat)				
		Önceki CLSI					Önceki CLSI		
		H	DBD	D			H	DBD	D
Yeni CLSI	DBD	80	15.7	-	Yeni CLSI	DBD	68.6	15.7	-
	D	-	-	4.3		D	-	-	15.7

H: Duyarlı; DBD: Doza bağlı duyarlı; D: Dirençli.

disk difüzyon (DD) yöntemleri ile önceki CLSI sınır değeri önerilerine göre yöntemler arası karşılaştırma yapıldığında ise, her iki ilaç için de çok büyük hata saptanmamış, ancak yine her iki ilaç için büyük ve küçük hatalar tespit edilmiştir. Bu hatalı sonuçlar, flukonazolde vorikonazole göre daha yüksek oranda belirlenmiştir. Önceki CLSI önerilerine göre 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki ilaç için de yöntemler arası uyumsuzluk oranı, 48 saat inkübasyon süresi sonunda 24 saattekine kıyasla daha yüksek oranda saptanmıştır. Matar ve arkadaşlarının²² çalışmasında, 400 *Candida* (39 *C.glabrata*) izolatında flukonazol ve vorikonazolün in vitro duyarlılık profilini belirlemede DD ve MD yöntemleri karşılaştırılmıştır. Flukonazol için 24 ve 48 saatte DD yöntemi ile duyarlı olarak bulunan izolatların \geq %96'sı MD ile de duyarlı veya doza bağlı duyarlı (DBD) bulunmuş; yöntemler arasında büyük ve küçük hataların yanı sıra 24 (%3.8) ve 48 (%2.5) saatte çok büyük hata tespit edilmiştir²². Bizim çalışmamızda ise çok büyük hata saptanmamıştır.

Orasch ve arkadaşları¹⁸ yaptıkları çalışmada, mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI önceki ve yeni direnç sınır değerlerini kullanarak 191 *C.glabrata* izolatının flukonazole in vitro duyarlılığını saptamışlardır. Önceki direnç sınır değerlerine göre izolatların 99'u (%51.8) duyarlı, 76'sı (%39.8) DBD, 16'sı (%8.4) dirençli olarak tanımlanmış; ancak, yeni önerilen türe özgü direnç sınır değerlerinde flukonazol için duyarlı kategorisi olmadığı için 191 izolatın tamamı duyarlı olmayan (dirençli veya doza bağlı) izolat olarak değerlendirilmiştir¹⁸. Bu araştırmacılar ayrıca, *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'dan oluşan toplam 989 izolatta flukonazol, vorikonazol ve kaspofunginin in vitro duyarlılıklarını MD yöntemi ile, önceki ve yeni direnç sınır değerleri ile karşılaştırmışlar; tüm izolatlarda ve tüm ilaçlarda yeni direnç sınır değerleri ile daha düşük duyarlılık oranları saptamışlardır¹⁸. Çalışmamızda da, benzer olarak, *C.glabrata* izolatlarında flukonazol için CLSI yeni direnç sınır değerlerini kullanarak hem MD, hem de DD yöntemiyle önceki direnç sınır değerleriyle elde edilenlere kıyasla daha düşük duyarlılık oranları saptanmıştır. Her iki yöntemle de, flukonazol CLSI yeni direnç sınır değerleri ile *C.glabrata* izolatları sadece DBD ya da dirençli olarak sınıflandırıldığı ve duyarlı kategorisi olmadığı için, flukonazole duyarlı *C.glabrata* izolatı kavramı artık geçerli değildir. Bugün *C.glabrata* için MD yönteminde, sadece flukonazol, kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin için yeni CLSI direnç sınır değerleri mevcuttur. Amfoterisin B, flusitozin, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol içinse in vitro duyarlılık sonuçları ile klinik sonuçlar arasındaki korelasyonu kesin belirleyebilecek yeterli veri olmadığından, klinik direnç sınır değerleri henüz saptanmamıştır. Adı geçen bu ilaçlar için, epidemiyolojik eşik değerler belirlenmiştir. Epidemiyolojik eşik değerler ile izolatlar sadece "wild-type" veya "non-wild type" olarak sınıflandırılabilir. DD yönteminde de *C.glabrata* izolatları için, klinik direnç sınır değerleri flukonazol için mevcut olup, vorikonazol için henüz sadece epidemiyolojik eşik değer olarak kullanılabilir inhibisyon zon çapı değerleri önerilmiştir^{11,15,21}.

Sonuç olarak çalışmamızda, *C.glabrata* suşlarında flukonazol ve vorikonazol duyarlılığının saptanmasında kullanılan disk difüzyon yönteminin, mikrodilüsyon yöntemi ile genelde kabul edilebilir oranda uyum gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamız özellikle, bu

yöntemler arasındaki uyumun, yeni, türe özgü direnç sınır değerleri ile daha yüksek oranlara ulaştığının gösterilmiş olması açısından önem taşımaktadır. Rutin uygulamada daha kolay uygulanan bir yöntem olan disk difüzyon yönteminin çok büyük hataya neden olmadan sonuç verebileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Yoo JI, Kim HS, Choi CW, Yoo JS, Yu JY, Lee YS. Proteomic analysis of intracellular and membrane proteins from voriconazole-resistant *Candida glabrata*. *Osong Public Health Res Perspect* 2013; 4(6): 293-300.
2. Eschenauer GA, Carver PL, Lin SW, et al. Fluconazole versus an echinocandin for *Candida glabrata* fungaemia: a retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(4): 922-6.
3. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3185-90.
4. Cömert F, Külah C, Aktas E, et al. 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(1): 52-7.
5. Çekin Y, Pekintürk N, Cekin AH, et al. Evaluation of species distribution and antifungal resistance of *Candida* isolates from hospitalized patients. *J Clin Anal Med* 2015; 6(1): 8-11.
6. Erdem F, Tuncer Ertem G, Oral B ve ark. *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 637-48.
7. Adiloğlu AK, Şirin MC, Cicioğlu-Aridoğan B ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* kökenlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *ADÜ Tıp Fak Derg* 2004; 5(3): 33-6.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 3rd ed. CLSI Document M27-A3, 2008. CLSI, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. CLSI Document M27-S4, 2012. CLSI, Wayne, PA.
10. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol* 2013 ;51(8):2571-81.
11. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9): 2846-56.
12. Ellepola AN, Morrison JC. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43 Spec No: 65-84.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document M44-A2, 2009. CLSI, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Informational Supplement. CLSI Document M44-S3, 2007. CLSI, Wayne, PA.
15. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; 13(6): 180-95.
16. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70(3): 330-43.
17. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(7): 246-7.

18. Orasch C, Marchetti O, Garbino J, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(7): 698-705.
19. Wang H, Xiao M, Chen SC, et al. In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 3952-9.
20. Azevedo AC, Bizerra FC, Matta DA, et al. In vitro susceptibility of a large collection of *Candida* strains against fluconazole and voriconazole by using the CLSI disk diffusion assay. *Mycopathologia* 2011; 171(6): 411-6.
21. Quindós G, Sánchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Alkorta M. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(3): 266-71.
22. 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(5): 1647-51.