



**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NADİR VE YENİ GÜNCELLEŞEN CANDIDA TÜRLERİNİN  
ÜÇ FARKLI YÖNTEMLE ANTİFUNGAL DUYARLILIK  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE SONUÇLARININ  
CLSI M27 A3 YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. EMEL ÜZMEZ

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2012





**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NADİR VE YENİ GÜNCELLEŞEN CANDIDA TÜRLERİNİN  
ÜÇ FARKLI YÖNTEMLE ANTİFUNGAL DUYARLILIK  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE SONUÇLARININ  
CLSI M27 A3 YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. EMEL ÜZMEZ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof.Dr. NİLGÜN ÇERİKÇİOĞLU**

**İSTANBUL 2012**

## I) ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini titizlikle aktaran, anlayış ve sabrını asla esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU' na,

Eğitimimizde büyük emeği geçen değerli hocalarımız Prof. Dr. Güner SÖYLETİR, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR , Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN, Doç. Dr. Nurver ÜLGER, Doç. Dr. Arzu İLKİ ve Dr.Burak AKSU'ya,

Birlikte çalıştığımız tüm mesai arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

EMEL ÜZMEZ

İSTANBUL 2012

## II ) ÖZET

Çalışmamızda klinik önemi giderek artan nadir olarak izole edilen *Candida lusitaniae* (n:25), *Candida intermedia* (n:12) ve diğer bazı albicans dışı *Candida* türlerinin (n: 23) flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve kaspofungine karşı duyarlılık profillerini standart CLSI M27 A3, ticari olarak mevcut Sensititre Yeast One, Etest ve otomatize Vitek 2 sistemi ile belirlemeyi ve ticari test yöntemlerinin güvenilirliklerini standart yöntemle kıyaslayarak saptamayı amaçladık. Duyarlılık-dirençlilik ve/veya dilüsyon farkı kriterlerine göre standart yöntemle uyumun %90-100 arasında olmasını güvenilirlik sınırı olarak kabul ederek CLSI'a alternatif olabilecek yöntemleri belirledik.

Standart yöntemle *C.lusitaniae* ve *C.intermedia* izolatlarının hepsi flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine duyarlı bulunmuştur. Amfoterisin B için olası direnç oranları *C.lusitaniae*'da %32; *C. intermedia*'da %25 olarak saptanmıştır. Çalışma kapsamındaki diğer albicans dışı *Candida* türlerinin flukonazole karşı %91,7'i, vorikonazol ve kaspofungine karşı %100'ü duyarlı olarak belirlenmişken; %52,1'i ise amfoterisin B'e karşı olası dirençli olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre çalışmamız, *C.lusitaniae* ve *C.intermedia*'da azol ve kaspofungin direncinin henüz bir tehdit oluşturmadığını, ancak, amfoterisin B'ye muhtemel direncin yüksek oranda olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle yeni güncellenen türler izole edildiğinde olası amfoterisin B direncinin takibinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Ticari test yöntemlerinin güvenilirlikleri değerlendirildiğinde *C.lusitaniae*'da flukonazol ve vorikonazol için her üç ticari test yöntemi; kaspofungin için Sensititre YeastOne ve Etest; amfoterisin B için ise sadece Sensititre YeastOne yöntemi CLSI ile uyumlu bulunmuştur. Bu bulgulara göre, Sensititre YeastOne testi *C.lusitaniae*'da bu antifungallere direnci saptamada güvenle uygulanabilir.

*C.intermedia*'da azoller için Vitek-2; kaspofungin için Sensititre YeastOne ve Etest; amfoterisin B için ise sadece Sensititre YeastOne yöntemi CLSI ile uyumlu bulunmuştur.

Test edilen diğer türler açısından flukonazol için sadece Vitek-2, vorikonazol için her üç yöntem ; kaspofungin için Sensititre YeastOne ve Etest; amfoterisin B için ise sadece Sensititre YeastOne yöntemi CLSI ile uyumlu olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yeni güncellenen *Candida* türleri, antifungal duyarlılık, CLSI M27 A3, Vitek-2 Sistemi, Sensititre YeastOne, Etest.

## II) SUMMARY

In this study we aimed to detect susceptibility profiles of rare and emerging *Candida* species with increasing clinical importance, namely *C. lusitaniae* (n:25), *C.intermedia* (n:12) and some other non albicans species (n:23) against fluconazole, voriconazole, amphotericin B and caspofungine by using standard CLSI M27 A3, commercially available Sensititre Yeast One, Etest and automated Vitek 2 System and to compare reliability of the commercial tests with the standard method. We defined the methods that can be alternative to CLSI, by accepting a reliability limit to be 90-100% in compliance with the standard method in terms of sensitivity-resistance and/or dilution discrepancies criteria,

With standard method all the isolates of *C.lusitaniae* and *C.intermedia* were found to be susceptible to fluconazole, voriconazole and caspofungin. For amphotericin B the likely resistance rates have been detected as 32% for *C.lusitaniae*; and 25% for *C.intermedia*. Of the other non-albicans *Candida* species within the context of the study, 91,7% were susceptible to fluconazole, 100% were susceptible to voriconazole and caspofungin whereas, %52,1 of them were determined to be likely resistant to amphotericin B. According to these results our study revealed that azole and caspofungin resistance do not any threat for *C.intermedia* and *C.lusitaniae* yet, but, likely resistance to amphotericin B is to be at high rate. We think that follow-up of putative amphotericin B resistance is significant especially when emerging species are isolated.

When the reliability of commercial test methods were evaluated for *C.lusitaniae* ; each of the three commercial test methods for fluconazole and voriconazole ; Sensititre YeastOne and Etest for caspofungin and Sensititre YeastOne method for amphotericin B were agreed with the CLSI . According to these findings, for *C.lusitaniae*; Sensititre YeastOne test can be applied safely in detecting resistance to these antifungals..

For *C.intermedia* Vitek-2 for azoles; Sensititre YeastOne and Etest for caspofungin; and Sensititre YeastOne method alone for amphotericin B were consistent with the CLSI .

As to other species studied; only Vitek-2 for fluconazole, each of the three methods for voriconazole, Sensititre YeastOne and Etest for caspofungin, and only Sensititre YeastOne method for amphotericin B were in agreement with the CLSI.

Keywords: Emerging *Candida* species, antifungal susceptibility, CLSI M27 A3, Vitek-2 System, Sensititre YeastOne, Etest.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet(Abstract).....	iii
İçindekiler.....	iv
Kısaltmalar ve Simgeler.....	vii
Tabloların Listesi.....	ix
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Mikrobiyoloji.....	3
2.2.1 Mantarların genel özellikleri.....	3
2.2.2 Albicans dışı kandida türlerinin genel özellikleri.....	6
2.2.2.1 Biyoloji ve virulans.....	6
2.2.3 Antifungal ilaçlar.....	9
2.2.3.1 Polien antifungaller.....	10
2.2.3.1.1 Amfoterisin B.....	10
2.2.3.2 Azoller.....	11
2.2.3.2.1 Ketokonazol.....	12
2.2.3.2.2 Flukonazol.....	12
2.2.3.2.3 İtrakonazol.....	13
2.2.3.2.4 İkinci kuşak triazoller.....	13
2.2.3.2.5 Azol direnci.....	14

2.2.3.3 Antimetabolitler.....	15
2.2.3.3.1 Flusitozin.....	15
2.2.3.4 Allilaminler.....	16
2.2.3.5 Griseofulvin.....	16
2.2.3.6 Ekinokandinler.....	16
2.2.3.7 Diğer Yeni antifungal ajanlar.....	17
2.2.4. Antifungal duyarlılık testleri.....	18
2.2.4.1 Antifungal duyarlılık test yöntemleri.....	19
2.2.4.1.1 Dilüsyon temeline dayalı yöntemler.....	19
2.2.4.1.2 Difüzyon yöntemleri.....	20
2.2.4.1.3 Akımsitometri (Flowcytometry) temeline dayanan yöntemler.....	20
2.2.4.1.4 Diğer yöntemler.....	20
2.2.4.2 Ticari MİK Metodları.....	20
3. Gereç ve Yöntem.....	22
3.1 Gereçler.....	22
3.1.1. Çalışmaya alınan yeni güncelleşen albicans dışı Candida türleri.....	22
3.1.2. Standart Kökenler.....	22
3.1.3. Besiyerleri.....	22
3.1.4. Kimyasal Maddeler .....	23
3.1.5. Antifungal Duyarlılık Testleri İçin Gerekli Materyaller ve İlaçlar.....	23
3.1.6. Diğer Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar.....	23
3.2 Antifungal Duyarlılık Testleri.....	24
3.2.1 Buyyon Mikrodilüsyon Yöntemi.....	24
3.2.1.1 Besiyerinin Hazırlanması.....	24
3.2.1.2 Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	25
3.2.1.3 Mikroplağın Hazırlanması.....	25
3.2.1.4 İnokülasyon İşlemi.....	26



3.2.1.5 Mik Değerlerinin Saptanması.....	26
3.2.2 Etest Yöntemi İle antifungal Duyarlılık Testi.....	27
3.2.2.1 %2 Glukozlu RPMI 1640 Agar Hazırlanması.....	27
3.2.2.2 Maya İnokulumu .....	28
3.2.3 Sensititre YeastOne Plağının Hazırlanması.....	28
3.2.4 Vitek-2 Maya Duyarlılık Testi (bioMerieux).....	29
4. Bulgular.....	31
5. Tartışma.....	37
6. Sonuçlar ve Öneriler.....	52
7. Kaynaklar.....	54

#### IV) KISALTMALAR VE SİMGELER

AFD	: Antifungal Duyarlılık
AFY	: Antifungal Duyarlılık Yöntemi
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronko Alveolar Lavaj
BMD	: Buyyon Mikrodilüsyon
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DTA	: Derin Trakeal Aspirat
ETA	: Endo Trakeal Aspirat
Gr	: Gram
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
İ.V	: İntra venöz
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
mm	: Milimetre
MOPS	: Morfolino Propan Sulfonik Asit
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
PEG	: Perkutan Endoskopik Gastrostomi
pH	: Power of Hydrogen

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

SDA : Sabouraud dekstroz agar

## V) TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 1: Kandidalarda in vitro duyarlılık testlerinin yorumu

Tablo 2: Kökenlerin Türlerine ve İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılımı

Tablo 3: Antifungal ilaçlara karşı dört farklı AFY ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları.

Tablo 4: Kandida Gruplarına Göre AFY'lerinin CLSI'a Göre Uyum Yüzdeleri ve Hata Oranları

Tablo 5: Çalışma Gruplarına göre Önerilebilecek Ticari yöntemler

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Büyük cerrahi girişimlerin artması, yenidoğan ve erişkin yoğun bakım birimlerinde genel durumu bozuk hastaların daha fazla izlenmesi, geniş spektrumlu ve birden fazla antibiyotik kullanımının artması gibi nedenlerden dolayı fırsatçı mantar enfeksiyonlarında son yirmi yılda önemli bir artış görülmektedir. Bu enfeksiyonlarda başarılı sonuç elde etmenin en önemli iki etmeni erken tanı ve uygun tedavinin sağlanmasıdır(1).

*Candida albicans* en sık kandidemi etkeni olmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda kandidemilerde *albicans*-dışı türlerin oranında artış gözlenmektedir. Bu artışın en önemli nedeni profilaktik ve ampirik olarak antifungallerin, özellikle azol türevi ilaçların uygulanmasıdır(2). Azol türevi antifungallerin yoğun kullanımı, *C.albicans* türünde düşük oranda da olsa dirençli kökenlerin ortaya çıkmasına yol açarken, azollere daha az duyarlı yada dirençli *C.glabrata* veya intrinsik olarak dirençli *C.krusei* kökenlerinin artışına neden olmuştur. Bunların yanı sıra çalışmamızda yer verilen *Candida lusitaniae*, *C.intermedia*, *C.famata*, *C.dublinsiensis*, *C.sake*, *C.inconspicua*, *C.lipolytica*, *C.pulcherrima*, *C.utilis*, *C.catenulata*, *C.mellibiosica*, *C.pelliculosa* gibi nadir veya yeni güncellenen bazı *Candida* türleri de yavaş da olsa artan oranda ve invaziv enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir.

Uygun antifungal tedavideki 24-48 saatlik bir gecikme mortalite oranını artırabilmektedir. Bu gibi sorunların önüne geçebilmek ya da en aza indirmek için antifungal duyarlılık testlerinin önemi giderek artmıştır.

Bu süreçte CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) rehberi özellikle mayalar açısından dünya verilerine göre birkaç kez yenilenmiş ve paralel olarak bu rehberi temel alan kolay uygulanabilir ticari kitle ve otomatize cihazlar da kullanıma girmiştir. Elde edilecek yeni veriler ve geliştirilecek yeni yöntemlerle antifungal duyarlılık testleri, tedaviyi en hızlı ve en doğru şekilde yönlendirmede yardımcı rol oynayacaktır.

Mayalar için mevcut olan referans yöntemler; CLSI tarafından standardize edilen buyyon mikrodilüsyon (BMD) (CLSI, M27-A3) ve disk difüzyon yöntemi (CLSI M 44A) ile EUCAST (European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing) tarafından geliştirilen buyyon mikrodilüsyon yöntemidir (EUCAST E.Dis 7.1). Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin; uzun sürede sonuç vermesi ve azoller açısından bazı türler için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, µg/ml) sonuçlarının okunmasında zorluklar olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bunun dışında, MİK direnç sınır değerleri, sadece flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve flusitozin için belirlenmiş olup, diğer mantar-ilaç kombinasyonları için bu değerler henüz bildirilmemiştir. CLSI M27 A3 klavuzuna göre *C.albicans* için 48 saat, *Cyrtococcus neoformans* için 72 saat inkubasyon gerekmektedir. Bu da hem klinik uygulamadaki yararlılığı azaltmakta, hem de kontaminasyon riskini artırmaktadır. Bu nedenlerle, MİK sonuçlarının daha kısa sürede elde edilmesini sağlayan ticari kitler ve otomatize-yarı otomatize sistemler geliştirilmiştir(3).

Teknolojideki ve antifungal ilaç çeşitliliğindeki gelişmelere karşın özellikle göreceli olarak seyrek izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık profillerine dair yeterli veri bulunmamaktadır.

Çalışmamız; nadir görülen ve yeni güncelleşen *albicans* dışı *Candida* türlerinde flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B, kaspofungin için duyarlılık profillerinin belirlenmesi ve de bu gibi izolatlar için uygulanabilecek CLSI BMD metodolojisine alternatif **Etest**(AB BioDisk), “**Sensititre YeastOne**” (TREK Diagnostic Systems) ve AST YS01 **Vitek 2** cards (bioMe´rieux) arasından en uygun ve en hızlı sonuç verebilen yöntemin seçilmesi amacıyla planlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Tarihçe:

Fungus olarak da adlandırılan mantarları ve oluşturdıkları hastalıkları inceleyen bilim dalına ‘mikoloji’ adı verilir. Mikoloji sözcüğü Yunanca şapkalı anlamına gelen ‘mykes’ sözcüğünden türetilmiştir. Mantarlar çok eski çağlardan beri bilinmektedir(4).

Hippocrates ve Galen dönemlerinden beri ağızdaki pamukçuk lezyonları bilinmektedir.

1841’de Berg, pamukçuğun mantara bağlı geliştiğini ortaya koymuştur. 1843’de Robin, bu mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmıştır; 1890’da Zopf, *Monilia albicans*, ve en son 1923’de Berkhout *Candida albicans* adını vermiştir.

Kandida ile oluşan derin enfeksiyon olgusunu ilk kez Zenker (1861) tanımlamıştır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımıyla birlikte 1940’lı yıllardan başlayarak kandida enfeksiyonlarının önemi artmıştır(5).

### 2.2 Mikrobiyoloji

#### 2.2.1 Mantarların genel özellikleri

Mantarlar ökaryotik hücre özelliğine sahip organizmalardır. Mantarlarda hayvansal hücrelerden farklı olarak dayanıklı bir hücre duvarı bulunmaktadır. Bu komponent ozmotik bariyer olarak görev yapmakta, hücreye sağlamlık kazandırmakta ve mantar hücresine şekil vermektedir(4, 5, 6).

Hücre duvarı kuru ağırlığının %80-90'ı karbonhidratlar, %10-20'si protein ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Karbonhidratlar ise kitin, glukozan, kitozan, galaktan ve mannan polisakkaritlerinden meydana gelmektedir(4,5, 6).

Mantarlar morfolojilerine göre maya veya küf görünümünde olurlar; mayalar tek hücreli, küfler çok hücrelidir, birden fazla nükleus içerebilirler ve çoğalma mekanizması birbirinden farklıdır.

Mayaların genellikle krema kıvamında, yuvarlak, sınırları düzenli kolonileri vardır. Kapsülü olanların ise kolonileri mukoiddir. Blastospor (tomurcuk, maya hücresi, yalancı hif), germ, tüp, klamidospore, artrospore ve kapsül gibi yapılar oluştururlar. Bunlar identifikasyonda önemlidir. Düşük oksijen basıncında ya da dokuda bazı mayalar hif, yalancı hif veya her ikisini birden oluşturabilirler. Makroskopik, mikroskopik ve biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanabilirler. Üreme özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar. Gerçek veya tam mayalar eşeyli olarak üreyip askospor ya da basidiospor geliştirirler. Kusurlu veya maya benzeri mantarlar ise sadece eşeysiz ürerler (6).

Kandidalar, Deuteromycetes (fungi imperfecti) sınıfının Cryptococcales takımında yer alır. Deuteromycetes sınıfı içerisinde seksüel fazları gözlenmemiş mantarlar bulunmaktadır(6). Ancak bazı *Candida* türlerinde askospor ile eşeyli üreme (teleomorf) saptanmıştır. Bunlar Ascomycota: Saccharomycetales takımında yer almıştır(8)

Kandidalar, oval, kapsülsüz, hareketsiz, Gram-pozitif, 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, lateral tomurcuklanma ile eşeysiz olarak üreyen, fakültatif anaerob mayalardır. Maya formu dışında kültür ve dokularda yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilirler. Yalancı hifler, tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu gelişir. Gerçek hifler ise apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır(7).

*Candida* türleri, Sabouraud-dekstroz-agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde, oda sıcaklığında ve 37°C'de 24 saatte üreyip genellikle kirli-beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluştururlar. Koloninin besiyeri yüzeyinde kalan bölümü blastokonidyumlardan (maya hücreleri) oluşmuştur. Besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur. *Candida albicans* ve *C.dubliniensis* türleri Tween 80 agarda, 25°C'de 72 saatte, yalancı hif, , boğum



biçimindeki bölmelerinde yuvarlak blastokonidyalar ve genellikle uç kısımlarında geniş, kalın-duvarlı , yuvarlak terminal klamidosporeler oluştururlar. Klamidospor formasyonu, 30-37°C'da inhibe olur(9, 10).

Kandidalar çok katlı hücre duvarına sahiptir. Kandidaların hücre duvarı mannopteinler (%20-23), glukan (%48-60), kitin (%0.6-2.7), protein (%3-6) ve lipitten (%48-60) oluşur. En dışta, konak hücreye adezyonu sağlayan protein tabakası vardır. Bu tabaka N-asetilglukozaminidaz ve asit fosfataz gibi enzimler içerir. Mannoproteinlerdeki farklılıklar, *Candida* türlerinin ayrılmasında kullanılır. Ancak, aralarında çapraz reaksiyon da görülebilmektedir. Kandidaların hücre duvarında bulunan lipitler ise sterol esterleri (zimosterol), (ergosterol), trigliseritler ve fosfolipitlerden oluşmaktadır(11).

Kandida cinsinin içinde bulunduğu türlerin taksonomik ilişkileri tam tanımlanmamıştır. Kandidaların 80'den fazla türü bilinmektedir; fakat bunların küçük bir kısmı insanlar için patojendir(12)

Son yirmi yılda birçok albicans dışı kandida türleri, klinik olarak önemli patojenler olarak ortaya çıkmıştır(13) .1960'larda yaklaşık beş *Candida* türü olduğu düşünülürken, son yıllarda patojen olduğu bilinen en az 17 *Candida* türü belirlenmiştir(12).

Bu cins içerisinde en sık karşılaşılan patojen tür *C. albicans*'tir. Diğer sık etkenler (%50-%70) *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii*'dir. Diğer hastalık etkeni olabilen başlıca nadir türler; *C. catenulata*, *C. ciferii*, *C. haemulonii*, *C.intermedia*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir. Bu sayı ve sıralama gün geçtikçe değişebilir. Eşeyli spor oluşturan *Candida* türlerinin bazıları *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kuyveromyces*, *Pichia* gibi farklı cinsler olarak tanımlanmaktadır. *Candida stellatoidea*, *C. clausenii* ve *C.langeronii* türleri *C.albicans* içinde sınıflandırılmıştır(14).

*Candida* türleri doğada yaygın görülen mayalar olup birçok bitkide, memelilerin sindirim kanalı normal florasında, insan mukoza ve derisinde bulunurlar. Klinik örneklerden kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilirler. Normal florada bulunan *Candida* türleri immünitesi bozulmuş hastalarda yaşamı

tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilirler; *C.albicans* hemen hemen tüm kandidoz formlarından en sık izole edilen türdür (15).

*Candida albicans* kandidalar içinde en virulan tür olarak bilinmektedir. Bu da konak hücreye yapışma özelliği , lipaz ve aspartil proteinaz gibi hidrolitik enzimleri üretme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca gerçek hif oluşturma ve fenotipik dönüşüm gösterme özellikleri de patogeneizde önemli rol oynamaktadır(16).

*Candida albicans* glukoz, galaktoz ve maltozu fermente eder; laktoz, mellibiyoz, rafinoz, melisitoz ve inülini fermente etmez. Glukoz, galaktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, D-ksiloz, ve D-mannit'i asimile eder; laktozu, rafinozu ve sellobiyozu asimile etmez. Sükrozdan gaz oluşturmaz. Sikloheksimide dirençlidir. *Candida albicans*'ı diğer kandidalardan ayıran en önemli özelliği germ tüp oluşturma yeteneğidir (17). Buna Reynolds-Braude fenomeni de denir (13). *Candida albicans* dışında *C.dublinsiensis* ve nadir olarak *C. tropicalis* kökenleri de germ tüp oluştururlar.

## **2.2.2 Albicans dışı Candida türlerinin genel özellikleri**

### **2.2.2.1 Biyoloji ve virulans**

*Candida albicans* hasta örneklerinden halen en fazla izole edilen türdür. Mukoza enfeksiyonlarının % 90-100'ü ve kandidemilerin % 50-70'i *C.albicans* ile gelişir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarının % 95-97'si *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* olmak üzere başlıca beş *Candida* türü ile gelişmektedir(18).

Genel olarak bakıldığında ülkemizde ve tüm dünyada kandidemilerde *C.albicans*'dan diğer *Candida* türlerine kayış olduğu söylenebilir(18). *Albicans* dışı kandidaların klinik olarak önemlerinin artmasıyla birlikte çoğu araştırmacı da bunların çeşitli biyolojik ve virulans özelliklerini araştırmaya başlamıştır. Bu türlerin çoğu *Candida albicans* gibi yalancı hif oluşturabilir(16).

Bu nadir türlerden kendi izolatlarımız arasında yer alanların özellikleri aşağıda tanımlanmıştır.

*C.catenulata*: İnsan hastalıklarından çok seyrek izole edilir. Ancak dışkı, kılız deri ve ayak derisinde flora elemanı olarak bulunabilir. Onikomikoz etkeni olarak bildirilmiştir(19).

*C.dublinsiensis*:. Son on yıldır özellikle HIV ile enfekte kişilerde ve diyabetiklerde oral kandidiyaz etkeni olarak ve de kistik fibrozis hastalarında balgamdan *C. dublinsiensis* izolasyonları bildirilmektedir(20).

Bu organizmanın patojen potansiyeli, en çok HIV (+) hastaların ağız lezyonlarından ve de HIV (+) ve HIV (-) hastaların seyrek de olsa kan, idrar, dışkı, ve balgamlarından da izole edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu tür, in vitro ve in vivo koşullarda flukonazole karşı hızla direnç geliştirebilmesi nedeniyle, tanımlanması önemlidir(19).

Germ tüp oluşturması ve klamidokonidya oluşturması gibi özellikleri *C.dublinsiensis*'in bazı izolatlarının *C.albicans* olarak tanımlanmasına sebep olmuştur..Karbonhidrat asimilasyonları, Beta-D-glukozidaz aktivitesi ve CHROMagar Candida, Staib agar, Niger agar, Tobacco agar gibi diğer farklı ortamlarda kolonilerin renk değişikliği göstermesi ve 42-45°C de SDA'da iyi üreme gösterememesi gibi *C dublinsiensis*'i , *C .albicans*'dan ayıran çeşitli fenotipik metodlar bildirilmiştir(21).

*C.lipolytica*: Çok seyrek rastlanan ve virulansı düşük bir türdür. Fungemiye yol açması için bir damar içi yabancı cismin varlığı gerekmektedir. Sağlıklı bireylerin dışkı, balgam ve orofarenksinden izole edilebilmektedir(19). Biyofilm üretimleri kateterlerde kolonize olmalarına katkıda bulunmaktadır(22).

Kore'de 2000 yılında aynı sağlık çalışanın hizmet verdiği 4'ü santral venöz kateterli 5 hastada *C.lipolytica* fungemisine rastlanmıştır. Bunların flukonazol MİK'leri 32 µg/ml olarak saptanmış, kateter çekilerek ve amfoterisin B ile tedavi edilmişlerdir(23). Türkiyede kateter ilişkili *C.lipolytica* fungemisi olan 2 yenidoğanda kateter çekilmesi ve amfoterisin B tedavisine cevapsız kalan olgularda kaspofungin ile başarılı sonuç alındığı bildirilmiştir(24).

*C.lusitaniae*: Tıbbi açıdan son yıllarda önem kazanan bir türdür. Bağışıklık sistemi çökmüş hastalarda sistemik kandidiyaza yol açmakta ve kan, balgam, üriner ve GIS örneklerinden izole edilmektedir. Çok olmasa da, amfoterisin B'ye karşı doğal dirençli kökenlerin izolasyonu, önemini artırmıştır (19).

*C. norvegensis*: Seyrek olarak kandidiyaza yol açan ve son yıllarda önem kazanan bir mayadır. İlk kez, 1990 yılında böbrek nakli yapılan ve bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastanın kan, periton sıvısı ve solunum yolu salgılarından izole edilmiştir; bu köken amfoterisin B ve flusitazine karşı dirençli bulunmuştur(25).

*C.norvegensis* insanlarda sık rastlanan bir enfeksiyon etkeni değildir. ilk olarak Norveç’de 1940’dan önce astımlı 3 hastanın balgamında izole edilmiştir. 1990-1996 yılları arasında yine Norveç’de 8 hastadan izole edilen *C.norvegensis* kökenlerinden 4’ü patojen olarak kabul edilmiş, 1940’dan önceki kökenlerle birlikte 1990-1996 yılları arasında çıkan kökenlerin tümü flukonazole dirençli bulunmuştur(26).

Asimilasyon testi olan ID 32C ile *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*’in ayırımı yapılamamaktadır. Çünkü; bu iki tür ID 32C’ de aynı kodla gösterilmektedir. Bu nedenle ayırım için eskülini hidroliz gibi biyokimyasal testler ve PCR gerekmektedir(27). Eskülini hidroliz eden kökenler *Candida norvegensis* olarak değerlendirilir(28).

*C.inconspicua*: Domenico D’antonio ve arkadaşları (1998), hemolitik maligniteli 3 hastada *C.inconspicua*’nın neden olduğu enfeksiyonlar bildirmişlerdir. Bunlardan ikisinde hastada damar içi kateter kullanımına bağlı fungemi, diğer hastada ise fungal hepatit gelişmiştir. Antifungal dirençlilikleri incelendiğinde ise üç izolatanın da flukonazole karşı 32 µg/ ml ‘ den büyük MİK değerlerinde dirençe sahip oldukları saptanmıştır (29).

*C.pelliculosa*: Bitki, toprak ve meyve sularında bulunan bir türdür. Bağışıklık sistemi çökmüş hastalardaki damar içi kateter kökenli fungemi olgularından izole edilmekte olup, tıbbi öneme sahip yeniden güncellenen mayalar arasında yerini almıştır (19).

Pediyatrik yoğun bakım ünitelerinde salgınlar bildirilmiştir. Teleomorfu *Pichia anomala* olarak adlandırılır.Yapılan çalışmalara göre *C.pelliculosa*’nın azol grubu antifungallere duyarlılığının azaldığı görülmektedir(30, 31).

*C.pulcherrima*: Çok seyrek olarak bağışıklık sistemi çökmüş kişilerde hastalık etkeni olabilmektedir(19).

*C.utilis*: Bu tür, etanol üretimi gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılmakla birlikte, başta AIDS'li ve kateter takılı olmak üzere bazı hastalarda çok ender olarak kandidiyaza yol açabilmektedir(19).

*C.sake*: 42°C' de üremez. Beyaz veya krem rengi koloniler oluşturur.Çeşitli çiçekler ve sebzeler, kayın ağacı bitki özü, üzüm suyu, bira, şarap, Japon pirinç rakısı (sake), donmuş somonda bulunur. AIDS hastalarının ağız boşluklarından izole edilmiştir(32).

*C.famata*: Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Süt ürünlerinde, peynirde, suda, bitkisel maddelerde, sebzelerde ve memelilerde bulunur; klinik materyalden nadir olarak izole edilir. Oküler endoftalmitli, SSS enfeksiyonlu olgular olduğu ve fungemiye neden olabildiği bildirilmiştir(33).

*C.intermedia*: Peynir yüzeyinde ve insan ağız boşluğunda bulunur. Klinik örneklerden nadir olarak izole edilir. Kateter ilişkili enfeksiyonlar yaptığına dair yayınlar bulunmaktadır(34)

*C.melibiosica*: Basit yalancı hif oluşturur. Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli evresi yoktur. Toprakta ve ağaçta bulunur. Kan kültüründen izole edilen vakalar bildirilmiştir(35)

### **2.2.3 Antifungal ilaçlar :**

Antifungal ajanlar deri, mukoza ve iç organların lokal veya sistemik mantar enfeksiyonlarına karşı etkili bileşiklerdir(36). Topikal, oral, parenteral yoldan kullanılabilirler.

Mantar enfeksiyonunun tanısının konulamaması veya geç konulması nedeniyle tedavide kullanılacak antifungal ilacın seçimi, dozu ve kullanım süresiyle ilgili veriler yetersiz olduğu gibi antifungal ajanların in vitro ve in vivo duyarlılık sonuçları da standartlaşmış değildir. Tedavinin başarılı olabilmesi için geniş spektrumlu, vücut doku ve sıvılarına iyi dağılım gösteren ve konakçıdan daha fazla fungal özgülüğü yüksek olan ilaçlara gereksinim duyulmaktadır.

Antifungal ilaç tedavisi toksik etkilerinden dolayı 1950' li yıllara kadar potasyum iyodür ve metilen mavisi ile sınırlı kalmıştır. Daha sonra amfoterisin B keşfedilmiş ve 1950'li yıllarda kullanıma girmesinden bu yana sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisindeki önemini korumuştur(37).

1950'li yıllara kadar iyod, fenol türevleri, salisilik asid ve türevleri, benzoik asid gibi karbonik asidler kullanılmaktayken, 1951 yılında hem oral hem de topikal etkili poliyen antibiyotik olan nistatin bulunmuştur. 1956'da polien bir antibiyotik olan amfoterisin B'nin bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur. Daha sonra flusitozin mantar tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Amfoterisin B ve 5- flusitozin'in uygulamalarının zor olması ve toksik olmaları sebebiyle, yeni antifungal ilaçlar geliştirilmiş veya eski ilaçların yeni formülleri oluşturulmuştur. 1958'de oral antifungal olan griseofulvin, 1969'da imidazol türevlerinden klotrimazol ve mikonazol, 1977'de ketokonazol ve 1980'li yıllarda geniş etki alanına sahip flukonazol ve itrakonazol kullanıma girmiştir (38, 39).

### **2.2.3.2 Poliyen antifungaller:**

Poliyen grubu antifungaller; nistatin, amfoterisin B ve piramisindir (natamisin). Poliyenler fungal hücre membranında bulunan ergosterole bağlanarak etki eder. Bu bağlanma hücre içeriğinin sızmasına ve hücre ölümüne sebep olur.1955 yılında *Streptomyces nodosus* kökeninden elde edilen amfoterisin B, sistemik antifungal tedavide kullanılan en eski ve en geniş spektrumlu antifungal ilaçtır. Birçok maya, küf ve dimorfik mantara fungisidal etkilidir. Amfoterisin B deoksikolat ve üç lipid formülasyonu ( lipid kompleks, kolloidal dispersiyon ve lipozomal amfoterisin B) sistemik fungal enfeksiyonlarda intravenöz yolla uygulanmaktadır(40).

#### **2.2.3.2.1 Amfoterisin B**

Amfoterisin B, bir ucunda hidrofilik polihidroksil zinciri ve diğer ucunda lipofilik poliyen hidrokarbon zinciri bulunan amfoterik bileşiktir. Sudaki çözünürlüğü zayıftır. Ticari olarak bulunan formülasyonu amfoterisin B deoksikolatdır. Amfoterisin B' nin nefrotoksik özelliğinden dolayı lipid formülasyonları

geliştirilmiştir. Kutanöz kandidiyazda kullanılmak üzere topikal amfoterisin B formulasyonları da vardır(41).

Etki Mekanizması; Amfoterisin B, mantar hücre membranındaki ergosterole bağlanır ve osmotik dengeyi bozar. Hücre membranının osmotik geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bunun sonucunda intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerinin membrandan sızmasına ve hücre ölümüne neden olur. Lipozomal amfoterisin B de aynı mekanizmayla etki gösterir. Amfoterisin B'ye bağlı oksidatif hasar kandidaya karşı antifungal aktivitesine katkıda bulunur(41). Amfoterisin B, geniş bir antifungal spektruma sahiptir. Birçok *Candida* türü, *C.neoformans*, *Aspergillus* ve *Mucor* türleri ile *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* gibi mantarlara bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Amfoterisin B'e karşı azalmış duyarlılık ya da direnç gösteren *Candida guilliermondii*, *C.krusei*, *C.lusitaniae* ve *Aspergillus terreus* gibi bazı türler de mevcuttur. *Fusarium*, *Pseudallescheria boydi*, *Trichosporon asahii*, *Sporothrix schenckii* izolatlarının amfoterisin B'e duyarlılıkları değişkenlik göstermektedir(41).

Amfoterisin B, akciğer, dalak, böbrek gibi birçok organ ve dokuya geçebilir fakat beyin omurilik sıvısına geçişi zayıftır. Bu sebeple santral sinir sistemi enfeksiyonlarında intratekal kullanılabilir(41).

Amfoterisin B nefrotoksik bir ilaçtır. Bunun yanında ateş, miyalji, hipotansiyon, bronkospazm ve tromboflebit gibi yan etkiler oluşturabilir. Amfoterisin B'nin lipid formulasyonları nefrotoksisite ve diğer yan etkileri anlamlı bir şekilde azaltabilir(41).

Poliyenlere direnç ergosterol miktarının azalması sebebiyle plazma membranındaki lipid kompozisyonunun değişimi sonucu meydana gelir(42).

### **2.2.3.2 Azoller:**

Azol grubu antifungal ajanlar fungostatik etkili olup, imidazol ve triazol denenen iki gruba ayrılır(41).

Etki Mekanizması; Azol grubu ilaçlar sitokrom p-450 bağımlı enzim sistemine bağlanarak lanosterolün C-14\_ demetilasyonunu inhibe eder. Bu enzim

lanosterolü ergosterole dönüştürdüğü için ergosterol sentezi inhibisyonuna ve dolayısıyla fungal hücrelerdeki membran sentezinin inhibe olmasına neden olur(41).

İmidazol grubu azol halkasında iki nitrojen molekülü içerir. İmidazol grubu içerisinde sadece ketokonazol sistemik etkili iken diğerleri topikal tedavide kullanılırlar(41).

#### **2.2.3.2.1 Ketokonazol**

Ketokonazol, imidazol grubu antifungal ajanların lipofilik üyesidir. Sistemik mikoz, dermatofitoz ve kutanöz kandidiyaz tedavisinde kullanılmak üzere oral ve topikal formları vardır(41).

#### **2.2.3.2.2 Flukonazol**

Triazol türevi antifungaldir. Flukonazolün avantajları oral ve intravenöz formlarının bulunması, hepatik, gastrik ve endokrinolojik toksisitesinin düşük olmasıdır(41).

Flukonazol *C.neoformans* ve *Candida* türlerine etkilidir; *C. krusei* flukonazole karşı intrensek dirençli olup, *C. glabrata*'nın bazı izolatları da flukonazole karşı doza bağımlı duyarlılık (DBD) ya da direnç göstermektedir. *Candida tropicalis*, *C. norvegensis*, *C.dublinsiensis* ve *C. inconspicua* türleri sıklıkla flukonazol için yüksek MİK değerlerine sahiptir(41).

Flukonazol suda çözünen bir bileşiktir. Absorpsiyonu gastrik asiditeden ve sindirilmiş gıdaların yağlı içeriğinden etkilenmez. Tüm organ ve dokulara yayılımı iyidir. Suda iyi çözünebilmesi sebebiyle beyin omurilik sıvısına rahatça geçebilmektedir(41).

Kandidiyaz, kriptokokkoz ve koksidioidomikoz tedavisinde kullanılabilir. Histoplazmoz, blastomikoz ve sporotrikozda 2. sırada seçilecek ajandır(41).

Flukonazol kullanımına bağlı yan etki ve toksik reaksiyonlar nadirdir. Seyrek olarak allerjik reaksiyonlar, anjiyoödem, trombositopeni ve alopesi görülebilir(41).



### 2.2.3.2.3 İtrakonazol:

İtrakonazol, lipofilik triazol grubundan olup kapsül veya solüsyon içinde oral ve intravenöz olarak kullanılır. *Candida* türleri, *C.neoformans*, *Aspergillus* türleri, dermatofitler, *P.boydii*, *S.schenckii* ve endemik dimorfik patojen mantarları içine alan geniş bir antifungal aktiviteye sahiptir. Flukonazole dirençli *C.glabrata* ve *C.krusei* kökenlerinin bazılarında etkilidir. İtrakonazol kandidiyaz, aspergilloz, dermatomikoz, onikomikoz, kromoblastomikoz, histoplazmoz, koksidiomikoz, parakoksidiomikoz, kriptokokkoz ve sporotrikoz enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. İtrakonazol, lipofilik olduğundan dolayı beyin omurilik sıvısına geçişi zayıftır. Pürülan eksudalara ve yağ dokusuna yüksek konsantrasyonda geçer. İtrakonazole bağlı yan etkiler flukonazole benzerdir. Yüksek dozlarda hipokalemi, ödem ve hipertansiyona yol açabilir. Hepatotoksik etkisi nadirdir(41).

### 2.2.3.2.4 İkinci kuşak triazoller

İkinci kuşak triazoller geniş etki spektrumuna ve düşük toksisiteye sahiptir. Etki mekanizmaları benzer olan bu triazoller, flukonazole dirençli ve duyarlı funguslara güçlü bir antifungal etki göstermektedirler. İkinci jenerasyon triazollerden vorikonazol ve posakonazol; mayalar, *C. neoformans* ve *Aspergillus*, *Scedosporium* ve *Fusarium* türlerinin bulunduğu küflere etkinlik göstererek geniş etki spektrumuna sahiptirler. Flukonazol ve vorikonazole dirençli *Candida* türlerine etki gösterebilmesine rağmen, çapraz direnç de görülebilmektedir. Posakonazolde ise, flukonazol ile çapraz direnç nadiren gözlenmektedir. Aynı zamanda bu ilaç, *Zygomycetes* türlerine de etki göstermektedir(43).

Triazol grubunda klinik öncesi ve klinik çalışmalarının devam ettiği yeni ilaçlar bulunmaktadır. Bunlardan isavukonazol ve ravukonazol, uzun yarı ömürleri, dokulara geniş dağılımı ve invaziv aspergilloz ve kandidiyaza etkinliklerinin iyi olması gibi benzer özelliklere sahiptirler. Diğer bir ilaç albakonazolün de, *Candida*, *Cryptococcus* ve *Aspergillus* türlerine etkinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir. İkinci jenerasyon triazollerin, invaziv mantar enfeksiyonlarının tedavi ve profilaksisinde kullanımını giderek artmaktadır(44, 45).

Vorikonazolün etki spektrumu geniş olup (flukonazole dirençli bazı izolatlar dahil) *Candida* türleri, *C.neoformans*, *Trichosporon* türleri, *Blastoschizomyces capitatus*, *Aspergillus* türleri, *Fusarium* türleri, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *B.dermatitidis*, *H.capsulatum*, *C. immitis*, *Penicillium marneffeii* ve dermatofitleri kapsar. Flukonazole dirençli kandidaların büyük bir kısmında, çapraz reaksiyon sonucu, ketokonazol, itrakonazol ve vorikonazole de direnç görülmektedir. Vorikonazol, nonnötrojenik kandidemi, özofageal kandidiyaz ve hepatosplenik kandidiyaz dahil sistemik enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (45).

#### 2.2.3.2.5 Azol direnci

Azoller hücre içine girebilmek için ergosterol sentezinde yer alan, anahtar enzim olan Lanosterol 14-demetilazı (14 DM) inhibe ederler (fungostatik). Lanosterol demetilazın aktif bağlanma bölgesinde hem molekülü bulunmaktadır. Azoller azol halkasındaki spesifik bir nitrojen atomu ile hem demirine bağlanır. Böylece lanosterolün demetilasyonunu, dolayısıyla ergosterol sentezini önler. Azol direncinde farklı potansiyel moleküler mekanizmalar vardır. Bunların çoğu hedef enzimlerde mutasyonel değişiklik ve efluks pompası aracılığı ile dışa atılım gibi antibakteriyel dirençle benzer özelliktedir(42,46).

Mantarlar tarafından moleküler seviyede oluşturulan direnç mekanizmaları şunlardır:

- a) Membranın sterol komponentinde değişiklik meydana getirerek ilacın girişini azaltırlar. Bu şekilde amfoterisin B'ye de direnç gelişmiş olur.
- b) 14 DM enzimini kodlayan ERG 11 geninde spesifik nokta mutasyonları oluşturarak enzimin yapısını değiştirirler. Böylelikle ilaç enzimi tanıyamaz. Ya da gende amplifikasyonun ve ekspresyonun artmasına yol açıp, aşırı miktarda enzim oluşumuna ve ilacın bu miktardaki enzimi inhibe edememesine sebep olurlar.

c) Bu grup ilaçlar, ergosterol biyosentezinde yer alan diğer enzimlerde bazı değişiklikler oluştururlar. Örneğin, delta 5,6 desaturazda inhibisyon yaptığında, membran yapısında değişme izlenmekte, dolayısıyla mantar hücresine girişi azalmaktadır.

d) İlaç atımındaki artış: çoklu ilaç atım pompaları, ilaçların ve küçük moleküllerin hücre içi konsantrasyonlarını azaltmaya yönelik çalışırlar(46). İlaç atım pompaları iki aileden oluşmaktadır. Bunlar; MDR1 geni tarafından kodlanan major fasilitator süperfamilya (MFS) taşıyıcı ve CDR1, CDR2 geni tarafından kodlanan ATP bağlayan kaset (ABC) taşıyıcılardır(47, 48). ATP bağlayan kaset (ABC) taşıyıcılar, bir transmembran poru ile iki adet ATP bağlayan kasetten oluşur. Atım için gerekli metabolik enerjiyi kasetlerdeki ATP'den sağlar. Kodlayan gen CDR'dir. Hem azollerin hem de diğer ilaçların transportunda rol alır. "Major fasilitator" ise tek bir transmembran porundan ibarettir. Metabolik enerjiyi membran potansiyelinden alır veya kotransportu kullanır. Kodlayan gen BEN'dir. Sadece flukonazol atımında rol alır.CDR veya MDR genlerinin mRNA seviyesindeki artış sonucunda ilacın dışarı atılma hızı artmakta, hücre içinde azol birikimi azalmakta ve direnç gelişimi izlenmektedir (46, 48).

### **2.2.3.3 Antimetabolitler**

#### **2.2.3.3.2 Flusitozin**

Antimetabolitler içinde kullanılan tek antifungal ajandır. Antifungal aktivitesini,pirimidin metabolizmasını bozarak, fungal hücrelerdeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek gösterir. Flusitozin, sitozin permeaz enzimi sayesinde fungal hücre içerisine girer ve sitoplazmada deamine olarak 5-florourasile (5FU) çevrilir. 5FU ise 5-florodeoksiüridin'e dönüşür ve bu da fungal DNA sentezini ve nükleer bölünmeyi sağlayan timidilat sentetazı inhibe eder(41).

Antifungal etki spektrumu *Candida* türleri, *C.neoformans*, ve kromoblastomikoza neden olan dematiaseöz mantarlarla sınırlıdır(41).

Yüksek dozlarda serum, BOS ve diğer vücut sıvılarına geçebilir. Flusitozine sekonder direnç geliştiğinden monoterapide kullanılmaz. Sıklıkla amfoterisin B ile

kombine edilerek kullanılır. Amfoterisin B- Flusitozin kombinasyonunun kullanıldığı en sık endikasyon kriptokokkal menenjitdir. Bu kombinasyon aynı zamanda kandida menenjitinde de yararlıdır(41).

Kemik iliği supresyonu, hepatotoksisite ve gastrointestinal intolerans flusitozinin major yan etkilerindedir. Flusitozin böbreklerden atılmaktadır. Bu yüzden amfoterisin B gibi nefrotoksik ilaçlarla kullanımı sırasında renal disfonksiyon gelişirse toksik kan seviyelerine ulaşabileceği için dikkatli olunmalıdır(41).

#### **2.2.3.4 Allilaminler**

Bu grupta sistemik oral ve topikal kullanılan terbinafin ve sadece topikal kullanılan naftilin yer alır. Allilaminler “skualen epoksidaz” enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini azaltırlar. Terbinafin; *dermatofitler*, *Malassezia furfur*, *S.schenckii*, *Aspergillus* ve *Candida* türlerinin tedavisinde etkilidir. Terbinafinin oral ve topikal formları bulunmaktadır(41).

#### **2.2.3.5 Griseofulvin**

Griseofulvin dermatofit enfeksiyonlarında kullanılan bir antifungaldir. Mantar hücrelerinin mikrotübüler proteinlerine bağlanıp mitozu baskılayarak etki gösterir. Oral kullanılan formları vardır. İlacın bulantı, baş ağrısı, diyare, hepatotoksisite, döküntü ve nörolojik belirtiler gibi yan etkileri vardır(41).

#### **2.2.3.6 Ekinokandinler**

Ekinokandinler, fungal hücre membranında protein yapısında bir makromolekül olan ve hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan 1,3,-D glukon sentezini inhibe eder. Bunun sonucunda duvar bütünlüğü, hücre morfolojisi bozulur ve hücrenin ölümü ile sonuçlanır(49).

Ekinokandinler geniş spektrumlu antifungal aktiviteye sahip lipopeptidlerdir. Kullanımda olan ekinokandinler; kaspofungin, anidulafungin , mikafungin'dir. Anidulafungin ve mikafunginin *Candida* türlerine karşı in-vitro aktiviteleri

kaspofungine oldukça benzerlik gösterir. Anidulafungin oral ve intravenöz olarak kullanılabilir(41).

Fungisidal özellikte olan bu grup, esas olarak diğer antifungallere dirençli olan suşlar dahil olmak üzere kandidalara etkilidir. *Candida parapsilosis* ve *C.guilliermondii*'ye etkinlikleri daha az olmakla beraber klinik önem taşımaz, *C.neoformans'a* etkili değildir. *Aspergillus*'lara etkili olmakla beraber, çoğalmakta olan hiflere etkisi sınırlıdır(49).

Ekinokandinlerin *C.albicans*daki moleküler hedefi beta-(1-3)-D-glukan sentazın FKS1 alt ünitesidir. Kaspofungin direnci sıklıkla FKS1 gen mutasyonu ile ilişkilidir(50).

*Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei* kökenlerinde ekinokandinlere karşı artan direnç görülebilmektedir(51).

İnvaziv kandidiyazis ve özefageal kandidiyazisde kullanım lisansı bulunmaktadır. Kaspofungin, orofarengal ya da özefageal kandidiyaz tedavisinde kullanıldığında hem amfoterisin-B deoksikolat, hem de flukonazol kadar etkili olduğu gösterilmiştir(49).

Tüm *Candida* türlerine karşı aktiftir, bununla beraber *C.parapsilosis* ve *C.guilliermondii* gibi bazı izolatların MiK değerleri oldukça yüksektir(49).

### **2.2.3.7 Diğer Yeni Antifungal Ajanlar**

Günümüzde birçok antifungal ajan araştırma aşamasındadır. Bunlar nistatinin lipozomal formu, kitin sentaz inhibitörü (nikomisin Z) ve sordarin ve azasordarin deriveleridir. Sordarin ve azasordarinler mantar protein sentezi için önemli olan elongasyon faktör-3'ü (EF-3) bloke ederek fonksiyon görmektedir(41).

#### 2.2.4. Antifungal Duyarlılık Testleri:

Tedavi seçeneklerini belirlemeye yol gösterebilecek standartlaştırılmış, in vitro verileri klinikle uyumlu antifungal duyarlılık deneyleri geliştirilmesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. 1982 yılında Amerika'da National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Antifungal Duyarlılık Deneyleri Alt Komitesi oluşturulmuş; bir dizi işbirliği çalışmalarından sonra 1992 yılında *Candida* türleri ve *C.neoformans*'ın amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve ketokonazole karşı in vitro duyarlılığını ölçmeye yönelik standartlaştırılmış bir referans makrodilüsyon yöntemi (M27-P belgesi) geliştirilmiştir. Bu yöntem referans laboratuvarlar için uygun olmakla beraber rutin laboratuvarlar için daha kolay ve daha az zaman alıcı bir yöntem geliştirilmesi amacıyla 1995 yılında bir referans mikrodilüsyon rehberi (M27-T) yayınlanmıştır. Bu yöntemle önerilen görsel okuma zor olduğundan spektrofotometrik okuma ve bazı oksidasyon redüksiyon indiktörleri kullanılarak okumayı deneyen çalışmalar yapılmıştır. Bir görüş birliği süreci içerisinde laboratuvarlar arası uyum ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve her iki belge geliştirilerek 1997 yılında M27-A referans rehberi oluşturulmuştur (52).

Güvenilir ve tekrarlanabilir duyarlılık yöntemleri geliştirildikten sonra direnç sınırlarının belirlenmesi ve dirençli kökenlerin ortaya çıkarılması üzerinde çalışılmaya başlanmış; NCCLS referans yöntemleri uygulanarak elde edilen minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile klinik yanıtlar arasındaki korelasyonun genellikle sağlandığı görüşüne varılmıştır. Mayalar için duyarlılık kategorileri bakterilerde olduğu gibi duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R)'ye olarak ifade edilmekte; flukonazol (FKZ), itrakonazol (İTZ) için yeni bir terim olan doza bağımlı duyarlı (DBD) da kullanılmakta; kandida enfeksiyonlarında MİK değeri DBD kategorisinde olan kökenlerle karşılaşıldığında, FKZ için > 400 mg/gün gibi yüksek dozlarda tedavi planlanması; sindirim yolundan emilimi sorunlu olan İTZ için ise iyi bir emilimin sağlanmasına gayret edilmesi ve 0.5 mg/ml kan seviyesine ulaşılması önerilmektedir(52). Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (NCCLS)'nin antifungal duyarlılık testleri alt komitesi tarafından, 2002'de değişikliklerle M27-A2 rehberi yayınlanmıştır. Bu rehber *Candida türleri* ve *C.neoformans*'a yönelik olarak metodolojisindeki makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerini yeniden

standardize etmiştir (53). Son olarak 2008 yılında BMD'e dayalı M27-A3 yönergesi kullanıma sunulmuştur(3).

#### **2.2.4.1 Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri:**

##### **2.2.4.1.1 Dilüsyon temeline dayalı yöntemler**

**a) Buyyon makrodilüsyon yöntemi:** Genellikle pH indikatörlü RPMI 1640 besiyeri kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar önce, uygun çözücülerde çözüldükten sonra,steril edilmiş besiyeri ile sulandırılır. Mayanın steril SF içerisinde süspansiyonu ve takiben besiyerinde son inokülüm miktarı hazırlanır. Hazırlanan antimikotiklerden 0,1 ml; üzerine de maya içeren solüsyondan 0,9 ml deney tüplerine eklenir ve karıştırılır. 35°C'de 46- 50 saat inkübasyon sonunda ilaçlı besiyeri tüpleri, üreme kontrol tüpleri ile kıyaslanarak görsel olarak değerlendirilirler (54).

**b) Buyyon mikrodilüsyon yöntemi (BMD):** Makrodilüsyon yöntemine benzer.Fakat yapılması daha kolay, daha ucuz ve daha az zaman alıcı olup 24 saatte sonuç alınabilir. Önce ilaçların ve mantarların uygun sulandırılmaları hazırlanır. Deneyler U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikropaklarda çalışılır. Kuyucuklara 100'er µl ilaç solüsyonu ve 100'er µl maya süspansiyonu dağıtılır. Plaklar 35°C'de 24- 48 saat inkübe edilir. Test çukurları üreme kontrol çukuru ile görsel olarak değerlendirilir. Elde edilen bulanıklık 0'dan 4'e kadar rakamla ifade edilir:

0: Bulanıklık yok

1: Hafif bulanık (kontrole göre % 0- 25 bulanıklık )

2: Bulanıklıkta belirgin azalma (kontrole göre %25- 50 bulanıklık)

3: Bulanıklıkta hafif azalma (kontrole göre %75- 100 bulanıklık)

4: Bulanıklıkta azalma yok (kontrole göre %100 bulanıklık)

Bu kriterler göz önüne alındığında MİK değeri amfoterisin B için hiç bulanıklığın olmadığı 0 değeri, azoller için ise 2 değeridir (54).

**c) Agar dilüsyon yöntemi:** Agar besiyeri hazırlanırken içerisine 1/10 oranında ilaç dilüsyonları ilave edilir. Üreme kontrolü için de ilaçsız besiyeri hazırlanır. Maya süspansiyonu diğer yöntemlerdeki gibi hazırlanır ve bunlardan besiyerine 1- 3 µl ekim yapılır. Ekimler 30°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra

değerlendirilir. Koloninin üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir (54).

#### **2.2.4.1.2 Difüzyon Yöntemleri:**

a) **Disk difüzyon yöntemi:** Kolay, hızlı, ucuz bir yöntem olup kandida ve diğer mayalara karşı flukonazol ve vorikonazol için direnç durumunu belirlemede kullanılır (53).

b) **E-test yöntemi:** Antifungalın çeşitli konsantrasyonlarının emdirildiği şeritler ile çalışılır. Pahalı fakat uygulaması kolay, ek malzemeye ihtiyaç olmadan MİK değerlerini saptayabilen bir yöntemdir(54).

#### **2.2.4.1.3 Akımsitometri (Flowcytometry) Temeline Dayanan Yöntemler:**

DNA'ya bağlanan vital boyalar ile ölü ve canlı hücre ayırma temeline dayanır. Ortama eklenen floresanlı boyalar hücrelerde ilaca bağlı membran hasarı oluştuğunda hücre içine girmektedir. Bu şekilde antifungal ilaçların etkinliği ve MİK değerleri belirlenebilmektedir (54).

#### **2.2.4.1.4 Diğer Yöntemler:**

a) CLSI ile yüksek uyumlu olan ergosterol biyosentezinin engellenmesini ölçen test, azoller için kullanılır.

b) Üreme olup olmamasına göre XTT, MTT gibi tetrazolyum bromür,tetrazolyum hidroksit boyalarının kolorimetrik ayıraç olarak renk değiştirmelerine dayanan testlerdir.

c) İlacın etkinliğini hücre içi ATP yoğunluğunu ölçerek belirleyen testtir (53, 54).

#### **2.2.4.2 Ticari MİK Metodları:**

Klinik kandida izolatlarının flukonazol duyarlılığını belirlemede 3 ticari ürün US FDA tarafından onay almıştır.Bunlar:



- a) E Test(AB Biodisk, Solna ,İsviçre)
- b) Sensititre Yeast One colorimetric plate
- c) Vitek2 Yeast Susceptibility Test (BioMérieux, Inc, Durham, NC)

Sensititre Yeast One ayrıca itrakonazol ve flusitozin için de FDA'den onay almıştır(55).

Günümüzde antifungal duyarlılık testlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını amaçlayan, kullanıma hazır ticari sistem ve kitler geliştirilmektedir. Bu testler;

- a) Candifast (International Microbio/Stago Group, İtalya),
- b) Integral Systems Yeasts (Liofilchem Diag, İtalya),
- c) Fungitest (Bio-Rad SDP, Fransa),
- d) ATB Fungus ( bioMérieux,Fransa),
- e) Mycostandard (Institut Pasteur, Fransa),
- f) Mycototal (Behring Diagnostic, Fransa) gibi testlerdir .

Mycototal, Mycostandard, ATB Fungus, Candifast mikrodilüsyon yöntemini esas alan ticari sistemlerdir. Aralarında kullanılan besiyerleri ve denenen antifungal ilaçlar yönünden farklar vardır. Bu ticari sistemler kırılma noktaları (break point) ile sınırlı ilaç konsantrasyonlarına sahiptirler. Bu sistemlerden sadece ATB Fungus, Mycostandard ve Mycototal, M27-A metoduna uygun şekilde tasarlanmıştır(56, 57).

Son yıllarda gerek Türkiye'de gerekse diğer ülkelerde yeni güncellenen *Candida albicans* dışı türlerin, klinik materyallerden artan oranda izole edildikleri görülmektedir. Bunlar arasında *C.dubliniensis*, *C.intermedia*, *C.lusitaniae*, *C.sake*, *C.lipolytica*, *C.famata*, *C.norvegensis*, *C.inconspicua*, *C.pelliculosa*, *C.pulcherrima*, *C.utilis*, *C.melibiosica* ve *C.sphaerica* dikkat çeken türlerdir. Ancak bu türlere ait antifungallere duyarlılık profilleri hakkında yeterli bilgi oluşmamıştır. Bu türlerin insan hastalıklarında oynadıkları rolün meydana çıkması için doğru tanımlama ve türler arasında güvenilir bir ayırımın yapılması ve en uygun antifungal duyarlılık yönteminin belirlenmesi gerekmektedir.

Son yıllarda *albicans* dışı *Candida* türlerinin artış göstermeye başlaması ve bununla birlikte saptanan antifungal direnç artışı klinisyenin uygun tedavi seçimine yardımcı olacak laboratuvar verilerinin güncellenmesini gerektirmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada 2002–2009 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Biriminde çeşitli klinik materyallerden izole edilen, etken olması muhtemel olarak değerlendirilmiş ve API ID 32C (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) sistemi ile tanımlanmış izolatlardan yeni güncellenen türler olan; *Candida intermedia*, *C.lusitaniae*, *C.lipolytica*, *C.famata*, *C.catenulata*, *C.utilis*, *C.pulcherrima*, *C.melibiosica*, *C.pelliculosa*, *C. inconspicua*, *C.dublinsiensis*, *C.sake* kökenlerinin antifungal duyarlılıkları **E test (AB BioDisk)**, “**Sensititre Yeast One**” (**TREK Diagnostic Systems**) ve **AST YS01 Vitek 2 cards (bioMérieux)** olmak üzere 3 farklı ticari yöntem ile belirlenmiş ve sonuçlar CLSI M27 A3 referans yöntemle saptanan MİK değerleri ile karşılaştırılarak, testlerin hızlı sonuç kapasiteleri ve güvenilirlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmamız Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 09.2010.0094 protokol numarası ile 20.01.2011 tarihinde onay almıştır.

#### 3.1 Gereçler

##### 3.1.1 Çalışmaya alınan yeni güncellenen albicans dışı *Candida* türleri

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde 2002-2009 yılları arasında Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen materyallerden izole edilen nadir rastlanan albicans dışı 60 kandida kökeni çalışmaya alınmıştır.

##### 3.1.2. Standart Kökenler

- *C.parapsilosis* ATCC 22019 kökeni
- *C.krusei* ATCC6258

##### 3.1.3. Besiyerleri

Sabouraud Dekstroz Agar (Oxoid)

Bacto Agar (Bacto)

### **3.1.4. Kimyasal Maddeler**

NaCl (Merck)

Morfolino propan sülfonik asit (MOPS) (Biochemica)

DMSO (dimetil sülfoksit) (Sigma)

RPMI (L glutaminli, sodyum bikarbonatsız) (Sigma)

Glukoz (Merck)

### **3.1.5. Antifungal Duyarlılık Testleri İçin Gerekli Materyaller ve İlaçlar**

Vitek-2 Cihazı (BioMérieux)

Densicheck (BioMérieux)

AST YS01 Vitek 2 cards (BioMérieux)

Sensititre Yeast One” (TREK Diagnostic Systems)

Etest Flukonazol (AB BioDisk)

Etest Vorikonazol (AB BioDisk)

Etest Amfoterisin B(AB BioDisk)

Etest Kaspofungin (AB BioDisk)

Flukonazol (Sigma)

Vorikonazol (Pfizer)

Amfoterisin B (Sigma)

Kaspofungin (Merck)

### **3.1.6. Diğer Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar**

Hassas terazi (Sartorius)

Kaba terazi (Scaltec)

Etüv (Mettler)

Otoklav (Hirayama)

Pastör fırını (Mettler)

Dondurucu (-20°C) (Uğur)

Dondurucu (-40°C) (Biohit)

Buzdolabı (Arçelik)  
Santrifüj (Elektro-Mag)  
Vorteks karıştırıcı (Yellow line)  
Manyetik karıştırıcı (Yellow line)  
pH metre cihazı (İno Lab)  
Işık mikroskobu (Nikon)  
Tek kanallı otomatik pipetler (Biohit Isolab)  
Cam pipetler 1, 2, 5, 10 ml  
Enjektör 5, 10 ml  
0.22 µm' lik membran filtre (Sartorius)  
pH indikatör kağıdı (Merck)  
U tabanlı steril mikropalaklar  
Petri kutuları  
Balonlar  
Tüpler  
Mezürler  
100 µl' lik ve 1000 µl' lik pipet uçları

## **3.2 Antifungal Duyarlılık Testleri**

### **3.2.1 Buyyon Mikrodilasyon Yöntemi (BMD)**

CLSI tarafından yayımlanmış M27- A3 yönergesine uyularak BMD yöntemi kullanıldı(52).

#### **3.2.1.1 Besiyerinin Hazırlanması**

900 mL distile suda 10,4 gr RPMI 1640 (glutaminli, bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren) toz besiyeri çözüldü. 34,53 gr MOPS (3- N-morfolino propansülfonik asit) (Sigma) eklenerek çözülene kadar karıştırıldı. 1 mol/L NaOH kullanılarak oda ısısında besiyerinin pH'sı 7.0'a ayarlandı. Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendikten sonra 0.22 µm'lik filtre ile sterilize edilerek kullanıldı.

### 3.2.1.2. Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Flukonazol ve amfoterisin B için etken hammadde kullanılırken, vorikonazol ve kaspofungin'in i.v preparatları kullanıldı. Çözücü olarak flukonazol için distile su, suda çözünmeyen amfoterisin B için DMSO (dimetil sülfoksit), vorikonazol ve kaspofungin için ise kendi çözücüleri kullanıldı. Stok solüsyonları hazırlanırken antifungal ilaç miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (mL)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

Antifungal stok solüsyonları, membran filtreden geçirilerek 1mL'lik hacimlere bölünüp steril eppendorf tüplerine kondu ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı. Amfoterisin B ışıktan korunacak şekilde kaplandı.

### 3.2.1.3 Mikroplağın Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce ilaç stok solüsyonları oda ısısına getirildi ve her biri RPMI besiyeri ile sulandırılarak 2x final konsantrasyonları amfoterisin B için 16-0.0313 µg/ml, flukonazol için 64-0.125 µg/ml, vorikonazol için 16-0.03 µg/mL ve kaspofungin için 8-0.015 µg/mL olacak şekilde seri sulandırmaları yapılarak hazırlandı. U tabanlı, 96 kuyucuklu steril mikroplağın her yatay sırası boyunca, mikroplağın 1-10. kuyucuklarına dilüsyon sırasına uyularak 100'er µl ilaç solüsyonları dağıtıldı.

11. ve 12. kuyucuklara ilaç solüsyonu konmadı. Üreme kontrol olarak 11. kuyucuğa 100 µL RPMI besiyeri ve 100 µL maya inokülümü kondu. Sterilite kontrol olarak 12. kuyucuğa steril RPMI besiyerinden 200 µL kondu. Bu şekilde plaklar, maya inokülasyonu için hazır hale gelmiş oldu.

### 3.2.1.4 İnokülasyon İşlemi

Kökenlerin SDA besiyerindeki 24 saatlik kültürleri kullanıldı. Yaklaşık 1 mm çapında 5 tane koloni alınarak 5 mL (% 0.85) steril serum fizyolojik içinde süspansiyon edildi ve 15 saniye vorteksledi. Daha sonra steril serum fizyolojik kullanılarak bulanıklığı 0.5 McFarland değerine ayarlandı (yaklaşık  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  hücre/mL). Bu süspansiyon RPMI besiyeri kullanılarak, önce 1/50 oranında, daha sonra tekrar 1/20 oranında sulandırıldı. Sonuçta maya stok süspansiyonu 1/1000 oranında sulandırılmış ve 2x test inokülasyon konsantrasyonuna getirilmiş oldu ( $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  hücre/mL). Mikroplak kuyucuklarına, 12. kontrol kuyucuğu hariç, 1/1000 oranında sulandırılmış olan maya süspansiyonundan 100'er µl dağıtıldı. Böylece ilaçların konsantrasyonları final değerlerine ulaştı. Maya inokulumu da son konsantrasyonuna ulaşmış oldu ( $0.5 \times 10^3$  -  $2.5 \times 10^3$  hücre/mL). Plaklar, 35°C'de inkübe edildi.

### 3.2.1.5 MİK Değerlerinin Saptanması

Kasofungin 24 saat sonra; flukonazol, amfoterisin B ve vorikonazol 48 saat sonra değerlendirildi. Mikroorganizma üreme kontrol kuyucuğunda (11. kuyucuk) üreme olduğu ve besiyeri kontrol kuyucuğunda (12. kuyucuk) üreme olmadığı tespit edildikten sonra MİK değerleri CLSI kriterlerine göre saptandı. Kontrol için *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.krusei* ATCC 6258 kökenleri kullanıldı. Değerlendirme, deney kuyucuklarının, üreme kontrol kuyucuğu ile görsel olarak karşılaştırılması ve oluşan bulanıklık derecesinin aşağıdaki gibi skorlanması ile yapıldı.

- 0: Hiç bulanıklık yok (optik olarak berrak)
- 1: Hafif bulanık
- 2: Bulanıklıkta belirgin azalma (kontrole göre %50 bulanıklık)
- 3: Bulanıklıkta hafif azalma
- 4: Bulanıklıkta azalma yok (üreme kontrol kuyucuğu ile aynı)

Amfoterisin B için 0; flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin için 2 değerini veren konsantrasyonlar ilgili ilacın MİK değeri olarak kabul edildi. CLSI’de, antifungaller için geçerli olan sınır değerler Tablo 1’de verilmiştir(32).

Tablo 1. Kandidalarda in vitro duyarlılık testlerinin yorumu

ANTİFUNGAL AJAN	DUYARLI	DOZA BAĞIMLI DUYARLI (DBD)	ORTA DUYARLI	DİRENÇLİ	DUYARLI DEĞİL
KASPOFUNGİN	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	–	–		$> 2 \mu\text{g/ml}$
FLUKONAZOL	$\leq 8 \mu\text{g/ml}$	(16-32) $\mu\text{g/ml}$	–	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$	–
VORİKONAZOL	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	–	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$	–

Amfoterisin B için CLSI tarafından bir direnç sınır değeri belirlenmemiş olmakla birlikte, MİK değeri  $>1 \mu\text{g/ml}$  olan kökenler olası dirençli kabul edilmektedir (52).

### 3.2.2 Etest Yöntemi İle Antifungal Duyarlılık Testi

Etest agar difüzyonuna dayalı antibiyotik duyarlılık testidir. Antimikrobiyal ilacın konsantrasyon gradientinin bulunduğu, plastik şeritlerin kullanıldığı agar difüzyon metodudur. Bu gradient MİK belirlenmesini sağlar. Etest için amfoterisin B, kaspofungin, flusitozin, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol ile hazırlanmış ticari şeritler vardır. Bununla beraber sadece flukonazol, itrakonazol ve flusitozin için FDA onayı alınmıştır.

#### 3.2.2.1 % 2 Glukozlu RPMI 1640 Agar Hazırlanması

1 litre için;

1) 450 ml distile suda RPMI 1640 (L-glutaminli) 8.4 gr ve MOPS 34.5 gr. ilave edilerek 0.22 m filtreden geçirilerek sterilize edildi.

2) 450 ml distile suda Bacto agar 15 gr, D glukoz 18 gr ilave edilerek, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi.

İlk hazırlanan besiyeri 45°C’e ısıtılırken, 2. besiyeri 45-50°C’e kadar soğutuldu. 1 M NaOH ile pH’ı 7.0’a ayarlanarak, hacim steril distile su ile 1 litreye tamamlandı ve 15 cm çaplı steril Petri kaplarına döküldü.

### **3.2.2 .2 Maya İnokülümü**

Maya kökenlerinin SDA besiyerindeki 24 saatlik taze kültürlerinden yaklaşık 1 mm çapında kolonileri steril (% 0.85) serum fizyolojik içinde süspanse edildi ve bulanıklığı 0.5 McFarland değerine ayarlandı. Bu süspanسیون, Petri kutularında hazırlanmış olan % 2 glukozlu RPMI agar yüzeyine pamuk uçlu steril eküvyon yardımıyla yayıldı. Amfoterisin B için ( 0.002-32 mg/ml), flukonazol için ( 0.016-256 mg/ml), vorikonazol için (0.002-32 ug/ml), kaspofungin için (0.002-32 ug/ml) aralıklarında ilaç konsantrasyon gradienti içeren şeritler besiyerinin ortasına gelecek şekilde yerleştirildi. Hazırlanan plaklar, 35°C’ de 24-48 saatlik inkübasyona alındı. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon elipsleri değerlendirilirken, üretici firma ve CLSI önerileri doğrultusunda amfoterisin B için üremenin tam inhibe olduğu (%100 inhibisyon) değer; azoller ve kaspofungin için ise üremenin %80 inhibe olduğu değer, o ilaç için MİK değeri kabul edildi.

Elde edilen MİK değerlerine göre kökenlerin test edilen antifungale karşı duyarlılık veya direnç durumu, CLSI M27A-3 önerileri doğrultusunda yorumlandı ve kökenler duyarlı, az duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırıldı.

### **3.2.3. Sensititre YeastOne Plâğının Hazırlanması**

Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, Ohio) mikrodilusyona dayalı olarak antifungal duyarlılık belirleyen kolorimetrik bir metoddur. Dokuz adet



antifungal ajanın kuru formatta dilusyonlarını içeren 96 kuyucuklu plaktan oluşmaktadır. Kuyucuklar indikatör olarak Alamar mavisi boyası içermektedir. Firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan maya inokulumu her kuyucuğa 100'er µl olmak üzere tüm plağa dağıtıldı. 35 °C de inkübe edildi. Üremesiz kuyucuklar mavi olarak görünürken, üremeli kuyucukların kırmızıya dönüşmesi izlendi. Üremenin olduğu en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

Tüm test kökenlerinin ve kontrol olarak *C.parapsilosis* ATCC 22019 ile *C. krusei* ATCC 6258 kökenlerinin antifungal duyarlılıkları firmanın önerileri doğrultusunda Sensititre YeastOne plakları ile çalışıldı.

#### **3.2.4. Vitek 2 Maya Duyarlılık Testi (bioMérieux, Inc, Durham, NC)**

Vitek2 Yeast Susceptibility Test (BioMérieux, Inc, Durham, NC) antifungal duyarlılık sistemi tam otomatize ticari bir sistemdir. Vitek 2 sistem maya üremesini spektrofotometrik olarak değerlendirerek MİK belirlemektedir. 4 tane antifungal ajan için MİK belirlemektedir. Bu antifungaller; flukonazol, amfoterisin B, flusitozin ve vorikonazoldur. Mikrodilüsyon metoduna dayanır. Her bir antifungal ajan için 64 tane kuyucuk içermektedir. Optik okuyucu yardımı ile mayanın üremesi antifungal duyarlılık sonucunu ölçüp software program ile değerlendirilir. Bu sistemin antifungal duyarlılık sonucu verebileceği mayalar; *C. albicans*, *C.dublinskiensis*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *C.haemulonii*, *C.inconspicua*, *C.intermedia*, *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.lypolitica*, *C.lusitaniae*, *C.norvegensis*, *C.parapsilosis*, *C.pelliculosa*, *C.rugosa*, *C.tropicalis*, *C.utilis*, *C.neoformans*, *S.ciferrii*'dir.

Bu nedenle çalışmamızda *C.famata* (n: 4), *C.sake* (n: 4), *C.pulcherrima* (n: 2), *C.catenulata* (n: 1), *C.mellibiosica* (n: 1) olmak üzere toplam 12 adet kökene Vitek2 sistemi ile duyarlılık çalışılmamış, geriye kalan 48 adet kökenin ve kontrol olarak *C.parapsilosis* ATCC 22019 ile *C. krusei* ATCC 6258 kökenlerinin antifungal duyarlılıkları bu sistemle çalışılarak MİK değerleri belirlenebilmiştir.

Test hazırlığı olarak; her bir maya kökeninin inokulumu steril polistiren tüp içinde, DensiChek (bioMérieux) cihazı kullanılarak 2.0 McFarland olarak ayarlandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda maya inokulumu ve Vitek 2 maya duyarlılık

kartı cihaza yerleştirildi. İnkubasyon ve MİK okunması cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Çalışma yaptığımız dönemde VİTEK-2 AST Yeast kartlarımızda kaspofungin yer almadığı için izole edilen kökenlerde bu antifungale duyarlılık hakkında bu sistemle ilgili bilgi verilememiştir.

#### 4. BULGULAR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2002-2009 yılları arasında Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik materyallerden izole edilen nadir rastlanan *albicans* dışı 60 kandida kökeni çalışmaya alınmıştır.

Kökenlerin 25' i (%41.6) *C.lusitaniae*; 12' si (%20) *C.intermedia*; 4' er tanesi (%6.6) *C. famata*; *C. dubliniensis*, *C.sake*; 2' şer tanesi (%3.3) *C.inconspicua*, *C.lipolytica*, *C.pulcherrima*, *C.utilis*; 1' er tanesi (%1.66) *C.catenulata*, *C.mellibiosica* ve *C.pelliculosa* 'dır.

Kökenlerin tür ve klinik materyallere göre dağılımı, Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Kökenlerin Türlerine ve İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılımı

	İdrar	Kan	Balgam	DTA	Doku	Yara	Tırnak	BAL	Kateter	ETA	Özefagus Sür.	PEG Sür.	Periton	TOPLAM
<i>C. lusitaniae</i>	14	2	5	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>C. intermedia</i>	6	2	-	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	12
<i>C. famata</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4
<i>C. pulcherrima</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. pelliculosa</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. catenulata</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. inconspicua</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. dubliniensis</i>	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>C. lipolytica</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2
<i>C. sake</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	4
<i>C. mellibiosica</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. utilis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>TOPLAM</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>60</b>

İzolatların flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve kaspofungine karşı duyarlılık profilleri, ticari olarak mevcut “Sensititre Yeast One” (TREK Diagnostic Systems), Etest (AB BioDisk), ve AST YS01Vitek 2 cards (bioMérieux) AFY’leri ile çalışılmış ve sonuçlar altın standart olarak kabul edilen CLSI M 27 A3’e dayalı BMD ile kıyaslanmıştır. Karşılaştırmayı kolaylaştırmak adına *C. lusitaniae* kökenleri Grup 1 olarak; *C. intermedia* kökenleri Grup 2 olarak; geriye kalan *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. sake*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. utilis*, *C. catenulata*, *C. mellibiosica* ve *C. pelliculosa* kökenleri ise Grup 3 (diğer kandida kökenleri) olarak gruplandırılmıştır.

Tüm yöntemlerin karşılaştırılmasında, 48 saatlik inkubasyon sonunda yapılan değerlendirmeler dikkate alınırken, kaspofungin için CLSI ve Sensititre YeastOne MİK belirlenmesinde 24 saatlik inkübasyon sonrası değerler dikkate alınmıştır. Etest MİK değerleri hem 24 saatte hem de 48 saatte okunarak böylece Etest için her iki okuma saatinin CLSI ile uyumu değerlendirilmiştir. Antifungal ilaçlara karşı dört farklı AFY ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları (µg/ml) olarak Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Antifungal ilaçlara karşı dört farklı AFY ile elde edilen MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değerleri ve MİK aralıkları.

TÜRLER	ANTİFUNGALLER	YÖNTEMLER	MİK <sub>50</sub> µg/ml	MİK <sub>90</sub> µg/ml	MİK ARALIĞI µg/ml
C.lusitaniae (n: 25)	FLUKONAZOL	CLSI BMD	0,25	1	0,125-1
		VİTEK 2	<1	<1	<1
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	2	0,25-4
		E TEST	2	4	0,25-8
	VORİKONAZOL	CLSI BMD	0,03	0,03	0,03-0,125
		VİTEK 2	<0,12	<0,12	<0,12
		SENSİTİTRE YEASTONE	0,008	0,015	<0,03-0,03
		E TEST	0,06	0,125	<0,03-0,5
	AMFOTERİSİN B	CLSI BMD	1	2	0,25-2
		VİTEK 2	0,5	0,5	<0,25-1
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	1	0,5-2
		E TEST	0,25	0,25	<0,03-0,5
	KASPOFUNGİN	CLSI BMD 24 saat	2	2	0,5-2
		YEAST ONE 24 saat	0,12	0,25	0,06-0,5
		E TEST 24 saat	0,125	0,5	<0,015-1
		E TEST 48 saat	0,25	0,5	0,125-1
C.intermedia (n:12)	FLUKONAZOL	CLSI BMD	0,5	8	0,125-8
		VİTEK 2	<1	8	<1-16
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	64	0,5->64
		E TEST	2	32	0,5->64
	VORİKONAZOL	CLSI BMD	0,03	0,5	0,03-0,5
		VİTEK 2	<0,12	<0,12	<0,12
		SENSİTİTRE YEASTONE	0,015	2	<0,03-4
		E TEST	0,06	1	<0,03-4
	AMFOTERİSİN B	CLSI BMD	1	2	0,25-2
		VİTEK 2	0,5	2	<0,25-8
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	2	0,125-2
		E TEST	0,125	0,25	<0,03-0,5
	KASPOFUNGİN	CLSI BMD 24 saat	1	2	0,5-2
		YEAST ONE 24 saat	0,12	1	0,03-2
		E TEST 24 saat	0,125	0,125	0,03-2
		E TEST 48 saat	0,25	1	0,125-2
Diğerleri (n: 23)	FLUKONAZOL	CLSI BMD	0,5	8	0,125-32
		VİTEK 2 <sup>a</sup>	<1	16	<1-16
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	64	0,125-128
		E TEST	2	32	0,5->64
	VORİKONAZOL	CLSI BMD	0,03	0,5	0,03-1
		VİTEK 2 <sup>a</sup>	<0,12	<0,12	<0,12-1
		SENSİTİTRE YEASTONE	0,03	2	<0,03-2
		E TEST	0,06	1	<0,03-1
	AMFOTERİSİN B	CLSI BMD	2	2	0,25-2
		VİTEK 2 <sup>a</sup>	0,5	0,5	<0,25-2
		SENSİTİTRE YEASTONE	1	2	0,5-2
		E TEST	0,125	0,25	<0,03-1
	KASPOFUNGİN	CLSI BMD 24 saat	0,12	0,5	0,03-0,5
		YEAST ONE 24 saat	0,125	0,25	<0,015-0,5
		E TEST 24 saat	0,25	0,5	0,06-1
		E TEST 48 saat	0,25	0,5	0,06-1

<sup>a</sup> : Vitek-2 ile çalışılan köken sayısı= 11

Analizi kolaylaştırmak amacıyla,  $\pm 2 \log_2$  'e göre MİK değerlerinin belirlenebilmesi için büyük (>), ya da küçük (<) olarak saptadığımız MİK değerleri bir üst ya da bir alt kesin MİK değerine yuvarlanmıştır. Ayrıca, E-test şeritlerindeki ilaçların gradient konsantrasyonlarının CLSI yönteminden farklı olması sebebiyle karşılaştırmayı kolaylaştırmak adına E-test ile elde edilen MİK değerleri, CLSI ile elde edilen MİK değerinin en yakın bir üst konsantrasyonuna yuvarlanmıştır.

Çalışmaya alınan tüm kökenlerin antifungal duyarlılık profilleri standart CLSI yöntemine göre değerlendirildiğinde; flukonazol için iki adet *C.inconspicua* kökeni 16  $\mu\text{g/ml}$  ve 32  $\mu\text{g/ml}$  olarak doza bağımlı duyarlı (DBD) saptanırken, geriye kalan 58 adet köken hassas olarak belirlenmiştir. Vorikonazol ve kaspofungin için tüm kökenler hassas olarak değerlendirilirken, amfoterisin B için sınır değerler bilinmediğinden değerlendirilememiştir.

Bir köken bir yöntemle dirençli veya duyarlı bulunup diğer yöntemle (DBD) bulunması halinde "küçük hata"; uygulanan ticari yöntemlerle dirençli ancak CLSI ile duyarlı bulunması halinde " büyük hata"; ticari yöntemlerle "duyarlı" ancak CLSI ile dirençli bulunması halinde "ok büyük hata" olarak yorumlanmıştır. Amfoterisin B için sınır değerler belirlenmediğinden diğer değerlendirmeler geriye kalan üç ilaç için yapılmıştır.

*C.intermedia* ve grup 3'de yer alan kökenlerimizde AFY'lerin hata yüzdeleri yüksek olarak saptanmış olup *C.lusitaniae* türü için flukonazol, vorikonazol, kaspofungin açısından çalışılan tüm yöntemlerde hiç hata saptanmamıştır; bulgular Tablo 4'de gösterilmiştir.

Dört farklı antifungal için, dört farklı AFY ile elde edilen MİK değerlerinin,  $\pm 2 \log_2$  sulandırımındaki farklılıklarına göre CLSI ile uyumları; Amfoterisin B dışındaki antifungaller için, üç ticari AFY'nin CLSI'a göre saptanan hata oranları ve duyarlılık/dirençlilik profiline göre uyum yüzdeleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: Kandida Gruplarına Göre AFY'lerinin CLSI'a Göre Uyum Yüzdeleri ve Hata Oranları

TÜRLER	ANTİFUNGALLER	YÖNTEMLER	DUYARLILIK/ DİRENÇLİLİK PROFİLİNE GÖRE UYUM	DİLÜSYON FARKLILIKLARINA GÖRE UYUM	BÜYÜK HATA SAYI (YÜZDE)	KÜÇÜK HATA SAYI (YÜZDE)
<i>C.lusitaniae</i> (n: 25)	FLUKONAZOL	VİTEK-2	100	100	0 (%0)	0 (%0)
		SENSİTİTRE YEASTONE	100	88	0 (%0)	0 (%0)
		E-TEST	100	56	0 (%0)	0 (%0)
	VORİKONAZOL	VİTEK-2	100	100	0 (%0)	0 (%0)
		SENSİTİTRE YEASTONE	100	96	0 (%0)	0 (%0)
		E-TEST	100	92	0 (%0)	0 (%0)
	AMFOTERİSİN B	VİTEK-2	a	76	a	a
		SENSİTİTRE YEASTONE	a	100	a	a
		E-TEST	a	48	a	a
	KASPOFUNGİN	VİTEK-2	b	b	b	b
		SENSİTİTRE YEASTONE	100	12	0 (%0)	0 (%0)
		E-TEST	100	68	0 (%0)	0 (%0)
<i>C.intermedia</i> (n: 12)	FLUKONAZOL	VİTEK-2	96	100	0 (%0)	0 (%0)
		SENSİTİTRE YEASTONE	83.3	75	2 (%16.6)	0 (%0)
		E-TEST	83.3	58.3	1 (%8.3)	0 (%0)
	VORİKONAZOL	VİTEK-2	100	83.3	0 (%0)	0 (%0)
		SENSİTİTRE YEASTONE	83.3	83.3	1 (%8.3)	0 (%0)
		E-TEST	83.3	91.6	1 (%8.3)	0 (%0)
	AMFOTERİSİN B	VİTEK-2	a	83.3	a	a
		SENSİTİTRE YEASTONE	a	100	a	a
		E-TEST	a	16	a	a
	KASPOFUNGİN	VİTEK-2	b	B	b	b
		SENSİTİTRE YEASTONE	100	25	0 (%0)	0 (%0)
		E-TEST	100	58	0 (%0)	0 (%0)
Diğerleri (n: 23)	FLUKONAZOL	VİTEK-2	90.9	81.8	0 (%0)	1 (%9)
		SENSİTİTRE YEASTONE	78.2	74	1 (%4.3)	4 (%17.3)
		E-TEST	78.2	65	0 (%0)	5 (%21.7)
	VORİKONAZOL	VİTEK-2	100	72.7	0 (%0)	0 (%0)
		SENSİTİTRE YEASTONE	91.3	60.8	0 (%0)	2 (%8.6)
		E-TEST	100	95.6	0 (%0)	0 (%0)
	AMFOTERİSİN B	VİTEK-2	a	63	a	a
		SENSİTİTRE YEASTONE	a	100	a	a
		E-TEST	a	39.1	a	a
	KASPOFUNGİN	VİTEK-2	b	b	b	b
		SENSİTİTRE YEASTONE	100	26	0 (%0)	0 (%0)
		E-TEST	100	65	0 (%0)	0 (%0)
a : Amfoterisin B için sınır değerler belirlenmediğinden yalnızca dilusyon farklılıklarına dayalı uyum göz önünde bulundurulmuştur. Hata Oranları belirlenmemiştir.						
b: Kaspofungin Vitek-2 sisteminde çalışılmamıştır.						

Duyarlılık-dirençlilik kriterine göre CLSI ile (%90-100) uyum gösteren AFY'ler çalışılan kandida grupları için herbir antifungale yönelik olarak değerlendirilmiş ve gruplar için önerilebilecek alternatif yöntemler Tablo5'de gösterilmiştir. Amfoterisin B için sınır değerler belirlenmediğinden, CLSI'a göre dilüsyon farklılıklarına dayalı uyum açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 5: Çalışma Gruplarına göre Önerilebilecek Ticari yöntemler

	<u>FLUKONAZOL</u>	<u>VORİKONAZOL</u>	<u>KASPOFUNGİN</u>	<u>AMFOTERİSİN B</u>
<i>C.lusitaniae</i>	VİTEK-2 YEASTONE EEST	VİTEK-2 YEASTONE EEST	YEASTONE EEST	YEASTONE
<i>C.intermedia</i>	VİTEK-2	VİTEK-2	YEASTONE EEST	YEASTONE
<b>Diğerleri</b>	VİTEK-2	VİTEK-2 YEASTONE EEST	YEASTONE EEST	YEASTONE



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada seyrek rastlanan ve yeni güncelleşen *Candida* türleri içinde yer alan 60 adet klinik izolatin AFD'ları üç farklı ticari ve otomatize yöntemle test edilmiş ve sonuçlar CLSI M 27-A3 baz alınarak değerlendirilmiştir.

2002-2009 yılları arasında albicans dışı kandidalar arasında en sıklıkla izole ettiğimiz tür *C.lusitaniae*'dir. Bu tür son yıllarda yapılan geniş kapsamlı çalışmalarda da en sık izole edilen nadir güncelleşen tür olarak bildirilmektedir(57, 58).

Çalışmamızda gruplandığımız kökenlerin dört AFY ile MİK aralıklarını ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerlerini kıyasladığımızda;

**Flukonazol** için 25 adet *C.lusitaniae*(Grup 1) kökenimizin (Tablo 3) MİK aralığı (0,125-1 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri (0,25 / 1 µg/ml) olarak literatürdeki çalışmalarla benzer olarak bulunmuştur. Diekema ve arkadaşları 171 tane *C.lusitaniae* kökeninin yaklaşık %95'ini flukonazole hassas olarak saptamışlardır. Espinell İngroff ve arkadaşları *C.lusitaniae*(n: 53) kökeninin MİK aralığını (0,12-2) µg/ml bularak tamamını flukonazole duyarlı olarak saptamışlardır. *Candida lusitaniae*(n: 25) kökenlerimizin hepsi her dört yöntemle edilen MİK aralıklarına göre hassas olarak saptanmıştır.Bu açıdan sonuçlarımız literatürle uyumlu çıkmıştır(58, 60, 61, 62).

Çalışmamızda en yüksek MİK aralığı (0,125-8 µg/ml) olarak Etest yönteminde elde edilmiş olmakla beraber duyarlılık sınırını aşmamıştır. Tüm bu verilere dayanarak yeni güncelleşen bir tür olan *C.lusitaniae*'nin flukonazol açısından tedavide sorun yaşatmayacağını ileri sürebiliriz.

Flukonazol açısından Grup 2'yi (*C.intermedia*) irdelediğimizde CLSI ile MİK aralığı (0,125-8 µg/ml), MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri ise (0,5 / 8 µg/ml) bulunarak tüm kökenler duyarlılık sınırları içinde saptanırken, YeastOne ve Etest ile (0,5->64 µg/ml) MİK aralığında bulunmuştur (Tablo 3). Her iki yöntemle de yüksek MİK değeri veren kökenlerin CLSI MİK değerleri 8 µg/ml olarak bulunmuştur.Bu iki

köken daha sonra yöntemler bazında tartışılacaktır. Literatürde *C.intermedia* ile flukonazol duyarlılığı hakkında yeterli veriye rastlamadık.

Flukonazol açısından Grup 3'ün (diğer *Candida* türleri) CLSI ile MİK aralığı (0,125-32 µg/ml), MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri ise (0,5 / 8 µg/ml) olarak bulunmuş olup diğer üç yöntemle bulunan MİK aralıkları en fazla 2-3 dilüsyonluk farklılık göstererek yakın MİK değerleri elde edilmiştir(Tablo 3). Bu dilüsyon farklılıklarının grup içinde çok farklı türlere ait izolatların bulunmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Örneğin bu grup içinde yer alan fakat Vitek-2 profilinde bulunmayan *C.famata* (n: 4) izolatımız uygulanan her üç AFY ile düşük konsantrasyonda benzer MİK aralıkları vermiştir. *Candida famata* kökenlerimizin CLSI'a göre MİK aralığı (0,125-0,5 µg/ml) olup flukonazole duyarlıdır. *Candida famata* ile yapılan en kapsamlı çalışma olan D.J Diekema ve arkadaşlarına aittir. Araştırmacılar MİK aralığını(1-16 µg/ml), MİK<sub>90</sub> değerini 16 µg/ml olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda kökenlerimizi duyarlı bulmakla birlikte, kıyaslama açısından sayılarımız yetersizdir(58).

Diğer türler için hem sayımızın çok az olması hem de literatürdeki verilerin azlığı nedeniyle yorum getirilememiştir. Sadece *C.inconspicua*(n: 2) kökenlerimiz dışında diğerlerini flukonazole hassas olarak bulduğumuzdan, bu türlerle ilgili flukonazolle tedavi sırasında sorun yaşanmayacağını düşünmekteyiz. *C.inconspicua*(n:2) kökenlerimiz CLSI ile 16 µg/ml ve 32 µg/ml olarak DBD saptanırken diğer AFY ile >64 µg/ml ve 128 µg/ml olarak , 2-3 dilüsyonluk farkla, dirençli saptanmıştır. Bu önemli sonucun ileride tartışacağımız yöntemlere bağlı farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Nitekim *C.inconspicua*'nın flukonazole karşı yüksek MİK veya direnç gösterdiğini söyleyen çalışmalar vardır(63).

Örneğin Bourgeois ve arkadaşlarının çalışmasında *C.inconspicua*'nın(n: 5) flukonazol MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerini 16/16 µg/ml olarak bizimkine benzer bulmuşlardır(64).

*Candida dubliniensis* (n: 4) kökenlerinden 3'ü BMD yöntemine göre hassas MİK aralıkları verirken, bir kökenin CLSI MİK değeri 8 µg/ml ile hassas olarak saptanmıştır. Aynı köken YeastOne ve Etest yöntemleri ile 32 µg/ml ile (2 dilüsyonluk farkla) DBD olarak bulunmuştur. Kökenlerimizde direnç saptamamızın nedeni bunların oral lezyon dışındaki izolatlar olması ile açıklanabilir. Nitekim literatürdeki pek çok çalışmaya göre flukonazole dirençli *C.dubliniensis* izolatlarının çoğunun oral izolatlar olduğu bildirilmektedir(65, 66).

**Vorikonazol** açısından (*C.lusitaniae*) kökenlerimizin hepsi dört AFY ile düşük MİK aralıklarında duyarlı olarak belirlenmiştir(Tablo 3). CLSI MİK aralıkları (0,003-0,125 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri (0,03 / 0,03) µg/ml olarak bulunmuştur(Tablo 3). Diekema ve Pfaller'in yaptığı geniş kapsamlı çalışmalarda(58, 59) ve diğer çalışmalarda (67, 68, 69) *C.lusitaniae* vorikonazol değerleri benzer sonuçlar vermiştir; bu veriler bu tür için vorikonazole karşı henüz bir direnç sorunu olmadığını göstermektedir(58).

Grup 2 (*C.intermedia*); bizim uyguladığımız yöntemler çerçevesinde literatürde *C.intermedia* ile ilgili yapılmış yeterli veriye rastlamadığımızdan bu konuda sadece kendi 12 izolatımız hakkında yorum yapabilmekteyiz. Çalışmamızda MİK aralığı (0,03-0,5 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri (0,03 / 0,5 µg/ml) olarak bulunmuş olup, vorikonazol açısından tedavide bu tür için sorun yaşanmayacağını öne sürebiliriz. Sadece bu kökenlerden iki tanesinin CLSI MİK'i 0,5 µg/ml ile hassas olarak saptanırken, YeastOne ve Etest yöntemlerinde 2-3 dilüsyonluk farkla DBD ve dirençli olarak bulunmuştur. Bunun ileride tartışacağımız yöntemlere bağlı farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Vorikonazol açısından Grup 3'ün(Diğerleri, n: 23) CLSI MİK aralıkları (0,03-1 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri (0,03 / 0,5 µg/ml) olarak duyarlı saptanmıştır(Tablo 3). Grup 3'de yer alan ve nadir olarak izole edilen türler içinde yer alan kökenlerimizin çoğunluğu dört AFY ile vorikonazole duyarlı saptanmıştır. İstisna olarak sadece *C.lipolytica* (n: 1), *C.dubliniensis* (n: 1) kökenlerimiz YeastOne yönteminde iki dilüsyon sapma göstererek DBD olarak saptanmıştır.

Literatürde *C.dublinsiensis* (n: 18), *C.famata* (n:16), *C.lypolitica* (n: 16), *C.pelliculosa* (n: 40) kökenlerinin yer aldığı en kapsamlı çalışmada CLSI sonuçlarına göre bir adet DBD sonucu veren *C.famata* kökeni hariç tüm kökenler vorikonazole karşı hassas olarak bildirilmiştir(58).

Pfaller'in bir çalışmasında *C.dublinsiensis* (n: 8) kökenleri vorikonazole karşı duyarlı olarak bildirilmiştir(69).

Köken sayımız az olmakla birlikte, sonuçlarımız yukarıdaki çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak nadir türler arasında da vorikonazol açısından direnç yaşanmayacağını göstermektedir.

**Amfoterisin B** açısından Grup 1 (*C.lusitaniae*, n: 25) için CLSI MİK aralığı (0,25-2µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri 1/2 µg/ml olarak belirlenmiştir(Tablo 3). Amfoterisin B için direnç sınır değeri belirlenmemiş olmakla beraber >1 µg/ml MİK değerlerinin olası direnç olarak nitelendirilip, klinik başarısızlıkla sonlanabileceği kabul edilmektedir(61). Literatürde *C.lusitaniae* dahil nadir görülen türlerde amfoterisin B'e direnç oranının yüksek olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni bu ilaca karşı direncin daha sıklıkla sekonder yani tedavi altında iken gelişmesidir(70). *C.lusitaniae* kökenlerimizin 8 tanesi (%32) amfoterisin B' e olası dirençli olarak belirlenmiştir. *C.lusitaniae* ve diğer izolatlarımızın hasta bilgilerine ulaşamadığımızdan bu direncin primer veya sekonder olduğuna dair yorum yapamamaktayız.

Grup 2 (*C.intermedia*, n: 12) için CLSI MİK aralığı (0,25-2 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri 1/2 µg/ml olarak belirlenmiştir(Tablo 3). Bu grupta yer alan kökenlerin 3 tanesi (%25) amfoterisin B' e olası dirençli olarak belirlenmiştir.

Grup 3 (Diğerleri, n: 23) için CLSI MİK aralığı (0,25-2 µg/ml) ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri 2 / 2 µg/ml olarak saptanmıştır(Tablo 3). Bu grupta yer alan *C.dublinsiensis* (n: 1), *C.famata* (n: 2), *C.sake* (n: 1), *C.catenulata* (n: 1), *C.lypolitica* (n: 1), *C.inconspicua* (n: 2), *C.pelliculosa* (n: 1), *C.pulcherrima* (n: 1), *C.utilis* (n: 1) olmak üzere 12 kökende (%52,1) amfoterisin B' e olası direnç gözlenmiştir.

Amfoterisin B duyarlılık profili açısından kendi sonuçlarımızla kıyaslayacağımız çalışma, Diekema ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Buna göre

171 *C.lusitaniae*'nin yalnızca 2 tanesinde, 16 adet *C.lipolytica*'nın 10 tanesinde Etest yöntemi ile amfoterisin B'e direnç saptanmıştır(58). Diğer nadir türlerde ise *C.dublinsiensis*(n: 18), *C.pelliculosa*(n: 40), *C.famata* (n: 16) kökenlerinin hepsini amfoterisin B'e duyarlı olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda köken sayılarımızın azlığı nedeniyle türler bazında dirençlilik/duyarlılık gibi yorum yapmamız mümkün değildir. Ancak bu nadir türlerin yer aldığı Grup 3'de %52 gibi yüksek oranda amfoterisin B'e direnç saptamış olmamız bu türler açısından amfoterisin B için antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasını gerekli kılabilir yorumunu yapabiliriz.

Her üç grupta da amfoterisin B için Etest yönteminde (<0,03-1) µg/ml ile diğer yöntemlere göre daha düşük MİK aralıkları elde edilmiştir(Tablo 3). Bunun ilerde tartışacağımız yöntem farklılıklarından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

**Kasporfungin açısından** Grup 1, 2 ve 3'de MİK aralıkları (0,25-2 µg/ml) arasında olup, MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri sırasıyla (2 / 2 µg/ml), (1 / 2 µg/ml), (1 / 2 µg/ml) olarak bulunmuştur(Tablo 3). Her üç grupta da YeastOne ve Etest yöntemlerindeki MİK aralıklarının ve MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerlerinin ise CLSI'a göre daha düşük değerlerde olduğu gözlenmektedir.

Kasporfungin açısından nadir kökenlerle yapılan en kapsamlı sonuçlar Diekema'nın yaptığı çalışmada elde edilmiş olup; bu çalışmada 166 *C.lusitaniae* kökeninin MİK aralığı (0,015-4µg/ml) iken, MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri (0,25-0,5 µg/ml) olarak bildirilmiştir. Bizim kökenlerimizde Diekema'nın çalışmasından ± (2-4) dilüsyonluk farklılık gözlenmekle birlikte sonuç olarak bu türe giren kökenler her iki çalışmada da kasporfungine karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla hali hazırda nadir veya yeni güncellenen türler açısından in vitro ve tedavi açısından direnç olasılığı gözükmemektedir(58).

Ancak Grup 1, 2 ve 3'de yer alan kökenlerimizin sırasıyla (%68'i), (%41,6)'ı, (%43,5)'u 2 µg/ml gibi kritik bir MİK değeri göstermesi dikkat çekicidir. Çünkü kasporfungin için >2 µg/ml MİK değerleri "duyarlı değil" olarak yorumlanmaktadır(3). Bu nedenle 2 µg/ml sonuç veren kökenlerin MİK değerlerinde yükselme olması olasılığı nedeniyle bu izolatlarla bağlı enfeksiyonların takibi ve tekrarlayan üremelerde antibiyogramların yinelenmesi önerilebilir.

Çalışmamızda dört farklı ilaç için dört farklı yöntem uyguladık. Bunlardan biri altın standart olarak kabul edilen ve BMD'e dayalı CLSI M27 A3 yöntemidir. Diğer üç yöntem ise CLSI ile uyumlu olarak hazırlanmış olan Vitek-2 (otomatize), ticari olarak mevcut Sensititre YeastOne ve Etest yöntemleridir. Sonuçlarımız altın standart CLSI BMD yöntemi esas alınarak uyumluluk ve hata oranları açısından kıyaslanmıştır(Tablo 4).

### **Vitek-2 Sisteminde:**

Bu sistemin veri tabanında bulunmayan *C.famata* (n: 4), *C.sake* (n: 4), *C.pulcherrima* (n: 2), *C.catenulata* (n: 1), *C.mellibiosica* (n: 1) olmak üzere toplam 12 adet köken dışında geriye kalan türler içinde yer alan 48 adet köken için antifungal duyarlılık belirlenebilmiştir.

Flukonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç grubun uyumu (%81,8-100) arasında iken, duyarlılık-dirençlilik durumuna göre uyumu (%90,9-100) arasında değişmektedir(Tablo 4).

Vorikonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç gruptaki uyum (%72,7-100) arasında iken, duyarlılık-dirençlilik durumuna göre uyumu (%100) olarak belirlenmiştir(Tablo 4)

Amfoterisin B için  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç gruptaki uyumu (%63,6-83,3) arasında değişmektedir.(Tablo 4)

Vitek-2 sisteminin profilinde yer alan 48 kökende flukonazol açısından 2 küçük hataya rastlanmıştır. *C.lusitaniae* türünde flukonazol için hiç hata belirlenmezken, Grup 2 ve Grup 3'de birer kökende küçük hata saptanmıştır( Tablo 4). Grup 2 (*C.intermedia*) (n: 1), Grup 3'de yer alan *C.lypoltica* (n: 1) kökenlerinin CLSI MİK değerleri 8 µg/ml olarak sınırda hassasiyet gösterirken, bu kökenler Vitek-2 ile (16 µg/ml) MİK değeri yani bir dilüsyon farklılıkla DBD olarak nitelendirilmişlerdir.

Vitek-2, CLSI ile kıyaslandığında vorikonazol açısından hiç hata vermemiştir(Tablo 4).

Pfaller ve arkadaşları 2007 yılında 426 kandida kökeninin antifungal duyarlılıklarını Vitek-2 sistemle ve CLSI M27 A2 yöntemiyle çalışarak iki yöntemin uyumunu flukonazol ile (%93,7) olarak bulmuşlardır. Çok büyük hata ve büyük hataya rastlamadıklarını, küçük hataların hepsinin de *C.glabrata* ve *C.norvegensis* 'den kaynaklandığını bildirmişlerdir; *C.glabrata* 'da(n: 83) küçük hata oranı %53 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu kökenlerin MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> 16/>128 gibi yüksek bir değer gösteren kökenlere ait olduğunu bildirmektedirler(71). Pfaller ve arkadaşlarının aynı kökenlerle yaptığı diğer bir çalışmada amfoterisin B, vorikonazol ve flusitozin için Vitek-2'nin CLSI ile uyumunu >%98 olarak saptamışlardır(69).

Borghini E. ve arkadaşlarının *Candida spp.*, *C.neoformans* ve *Geotrichum capitatum* kökenlerinin amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerlerini Vitek 2 ve CLSI M27A2 ile karşılaştırmaları sonucunda bu ilaçlar açısından yöntemler arası uyumu sırasıyla; (%99,5), (%92), (%98,2) olarak bulmuşlardır(72).

Estrella ve arkadaşları 2009'da yaptıkları çalışmada 149 kandida kökeninin Vitek-2 sistem ile CLSI M27 A3 uyumunun flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve flusitozin açısından %95'in üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. CLSI M27 A3 sonuçlarıyla kıyasladıklarında 6 kökünde çok büyük hata , 41 kökünde küçük hata saptanmıştır. Araştırmacılar Vitek-2 sisteminin hızlı sonuç vermesi ve pratik olması nedeniyle rutinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır(73).

N.Bourgeois ve arkadaşları 2010 yılında flukonazol ve vorikonazol açısından Vitek-2 sistem ile CLSI ve Etest yöntemlerinin uyumunu kıyaslamışlardır. Çalışmalarında azoller için CLSI BMD MİK değerleri oldukça düşük bulunup duyarlı olarak değerlendirilen *Candida albicans*, *parapsilosis*, *tropicalis*, *lusitaniae*, *dublinskiensis*, *kefyr*, *guiliermondii* 'den oluşan 128 kökenin sonuçlarına göre; Vitek-2 sisteminin CLSI M27 A3 ile olan uyumunu (% 95.4- 100) arasında belirlemişlerdir. Bu kökenler için Vitek-2 sistemi ile E test yöntemi arasındaki uyumu ise (% 89.3- 100) arasında bulmuşlardır. Aynı çalışmada flukonazol MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri (8 / 32) µg/ml ve vorikonazol MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değeri (≤ 0,12 / 2) µg/ml olarak yüksek çıkan *C.glabrata* (n: 56) kökenlerinde ise Vitek-2 ile CLSI uyumu bu ilaçlar için sırasıyla

(%94,6) ve (%89,3) olarak saptanmıştır. Bu kökenlerde Vitek-2 ile E test yöntemi arasındaki uyum flukonazol ve vorikonazolde sırasıyla (%25) ve (%32)'lere düşmüştür. Araştırmacılar, *C.krusei* (n: 14) için vorikonazol açısından Vitek-2 sisteminin CLSI ile uyumunu (%100)'lerde saptarken, Etest ile olan uyumunu (%64)'lerde saptamışlardır. Sonuç olarak bu çalışmada; Vitek-2 sisteminin CLSI ile uyumunu tüm türlerde yüksek bulunurken, E test yöntemiyle uyumu ise bazı türlerde (*C.glabrata* ve *C.tropicalis*) düşük olarak saptanmıştır(64).

Aynı çalışmada araştırmacılar 205 adet kandida kökeninde Vitek-2 sistemle flukonazol ve vorikonazol duyarlılık sonucunda toplam 30 hata tesbit etmişlerdir. Bunların çok büyük bir kısmı küçük hata olup, çok büyük hataya rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar MİK değerleri yüksek saptanan türlerde de Vitek-2 sisteminin kullanılabilir ve güvenilir olduğunu öne sürmüşlerdir(64).

Posteraro ve arkadaşları, *C.albicans* (n: 36) ve *C.glabrata* (n: 86) kökenlerinin flukonazol ve vorikonazol duyarlılıklarını Vitek-2 sistemle ve CLSI M27 A3 ile çalışmışlardır. İki yöntemin uyumunu flukonazol için (% 97.5), vorikonazol için (%98.3) olarak belirlemişlerdir. Toplam 122 kökende 6 küçük hata saptanırken, büyük ve çok büyük hataya rastlanmamıştır. Vitek-2 sisteminin güvenilirliğini saptamak için kökenlerin %70 kadarı *C.glabrata*'yı içermek üzere, flukonazol ve/veya vorikonazole dirençli kökenler de çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırmacılar saptanan 6 küçük hatanın 5'inin yine bu türden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ve azol direnci gösteren kökenlerde de Vitek-2 sisteminin CLSI ile uyumlu sonuçlar vermesi nedeniyle bu sistemin güvenilir olduğunu bildirmişlerdir(74).

Çalışmamızda flukonazol ve vorikonazol açısından Vitek-2 ile CLSI uyumu literatürdeki çalışmalara benzer olarak bulunmuştur. Flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B için bu iki yöntem arasındaki uyumun en düşük görüldüğü köken grubu Grup 3 olarak belirlenmiştir. Grup 3'ün vorikonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon farklılıklarına göre iki yöntem arasındaki uyum (%72,7) iken, duyarlılık/dirençlilik profili açısından uyum (%100) olarak belirlenmiştir. Amfoterisin B açısından Grup 3'ün dilüsyon farklılıklarına göre iki yöntem arası uyumu (%63,6) olarak saptanmıştır(Tablo 4). Bu grupta Vitek-2 profilinde yer alan *C.dublinsiensis* (n: 4), *C.inconspicua* (n: 2), *C.lypolitica* (n: 2), *C.pelliculosa* (n: 1), *C.utilis* (n: 1)'den



oluşan nadir türlerin köken sayılarının az olması, bu türlere özgü bir yorum yapmamızı zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu kökenlerin yaklaşık (%54)'ünde amfoterisin B'e olası direnç saptamış olduğumuzdan dolayı bu gruptaki türlerden hangilerinin düşük uyuma neden olduğu hakkında yorum yapamamaktayız. Nadir ve yeni güncellenen türlerin amfoterisin B için duyarlılıklarının değerlendirilmesinde Vitek-2'nin yerinin belirlenmesi için, CLSI ile karşılaştırmalı ve çok sayıda kökenle yapılan çalışmalara gereksinim vardır.

Vitek-2 sistemi, kullanımda pratik ve zahmetsiz olup, 24 saatden kısa sürede hızlı sonuç veren bir sistemdir. Ek olarak, sık rastlananların yanı sıra antifungal veri tabanında nadir türlere de yer vermesi bu sistemi flukonazol ve vorikonazol duyarlılığı saptanmasında tercih edilecek kullanışlı, güvenilir bir yöntem kılmaktadır.

#### **Sensititre YeastOne yöntemi:**

Flukonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre CLSI ile karşılaştırıldığında; üç grup için uyumu (%74-88) arasında iken, duyarlılık/dirençlilik durumuna göre uyumu (%78,2-100) arasında değişmektedir(Tablo 8-10).

Vorikonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç gruptaki uyumu (%60,8-96) arasında iken, duyarlılık/dirençlilik durumuna göre uyumu (%83,3-100) olarak belirlenmiştir.(Tablo 4)

Amfoterisin B açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç gruptaki uyumu (%100) olarak bulunmuştur(Tablo 4).

Kaspofungin için  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç grup açısından uyumu (%12-26) arasında ve duyarlılık-dirençlilik durumuna göre uyumu ise (%100) olarak belirlenmiştir(Tablo 4).

Flukonazol açısından Sensititre YeastOne yönteminde toplam 60 kökünde 7 hata belirlenmiştir. Grup 1(*C.lusitaniae*)'de hiç hata belirlenmezken, Grup 2'de (*C.intermedia*) iki büyük hata, Grup 3'de bir büyük, dört küçük hata gösterilmiştir(Tablo 4).

Vorikonazol açısından Grup 1’de hiç hata belirlenmezken, Grup 2’de bir büyük, bir küçük hata , Grup 3’de ise iki küçük hata belirlenmiştir(Tablo 4).

Kaspofungin açısından Sensititre YeastOne yönteminde hiç hata saptanmamıştır(Tablo 4).

Espinel Ingroff ve arkadaşları 1999’da Sensititre YeastOne ve CLSI M27 A2 ile antifungal duyarlılık yaptıkları çalışmada; 465 adet *C.albicans* kökeninin 48 saatlik sonuçlarının uyumunu amfoterisin B için (%97), flukonazol için (%60), flusitozin için (%56), itrakonazol için (%54), ketokonazol için (%56) bulmuşlardır. Yine bu çalışmada 64 adet yeni güncellenen kandida kökenlerinde (*C.ciferrii*, *C.famata*, *C.guillermundii*, *C.kefyr*, *C.lambia*, *C.lypolitica*, *C.rugosa*, *C.zeylanoides*) her iki yöntemin uyumunu amfoterisin B için (%90), flukonazol için (%94), flusitozin için (%99), itrakonazol için (%91), ketokonazol için (%94) olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar kökenleri duyarlı, DBD ve dirençli olma durumlarına göre de yöntemler bazında kıyaslamışlardır. Flukonazole hassas olan *C.albicans* kökenlerinde iki yöntemin uyumu (%89), flukonazolde DBD olan kökenlerde (%75), flukonazole dirençli olan kökenlerde ise uyumu (%93) olarak bulmuşlardır. İtrakonazole hassas olan *C.albicans* kökenlerinde iki yöntemin uyumu (%91), itrakonazol için DBD olan kökenlerde (%24), itrakonazole dirençli olan kökenlerde (%50) olarak bildirmişlerdir(75).

Espinel İngroff ve arkadaşları 2004 yılında 100 adet kandida kökeninin CLSI M27 A2 ile buldukları antifungal MİK değerlerini Sensititre YeastOne MİK sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Kaspofungin, posakonazol, ravukonazol ve vorikonazol duyarlılık sonuçlarının uyumlu olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada 5 adet *C. lusitaniae* kökeninde bu dört antifungal ilaç açısından iki yöntemin uyumunun (%87-100) arasında olduğunu bildirmişlerdir(68).

Estrella ve arkadaşları 2009’da 154 kandida kökeni ile yaptıkları çalışmada Sensititre YeastOne ile yapılan hata sayılarını; çok büyük hata (1), büyük hata (1), küçük hata (51) olarak bildirmişlerdir(73).

Çalışmamızda genel olarak YeastOne yönteminin dilüsyon farklılıklarına göre CLSI ile uyumu flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B açısından (%80-100) arasında olup literatürdeki çalışmalara benzer olarak saptanmıştır.

Vorikonazol açısından; YeastOne yönteminde CLSI MİK değerine göre 2-3 dilüsyonluk farklılık ile 4 kökenden hata saptanmıştır.

Flukonazol için CLSI MİK değeri (8-32) µg/ml ile duyarlı veya DBD olarak saptanan 7 kökenden duyarlı olan 3 tanesi YeastOne yönteminde dirençli olarak saptanıp, büyük hata olarak değerlendirilirken; DBD olan 2 köken de yine dirençli olarak belirlenip, küçük hata olarak nitelendirilmiştir.

Kasopfungin açısından iki yöntemin dilüsyon farklılıklarına göre uyumu (%12-26) olarak çok düşük bulunmakla birlikte duyarlılık/dirençlilik profiline göre uyumu (%100) olarak saptanmıştır(Tablo 4).

Amfoterisin B açısından iki yöntemin uyumu her 3 grupta (%100) olarak saptanmıştır. Dahası kökenlerimizin çoğunun CLSI yöntemine göre amfoterisin B'e olası dirençli (>1µg/ml) olduğunu kabul edersek, bu nadir görülen ve amfoterisin B için yüksek MİK değeri gösterebilecek yeni güncellenen türler için amfoterisin B duyarlılığı saptanmasında CLSI yöntemiyle en iyi uyumu gösteren alternatif olarak Sensititre YeastOne yöntemini önerebiliriz(Tablo 4).

En sık rastlanan tür olan *C.albicans* için bile Sensititre YeastOne yönteminde bazı antifungaller için CLSI ile kıyaslandığında düşük uyum ortaya çıkabileceğini gösteren geniş kapsamlı bir çalışma da Espinel Ingroff'un çalışmasıdır(75).

Yine de dokuz farklı antifungal ilaç için MİK değeri elde edilebilmesi, indikatör renk ayırıcına göre görsel olarak MİK değerlerinin kolay yorumlanabiliyor olması bu yöntemin avantajlarıdır.

### **Etest yöntemi:**

Flukonazol açısından üç mantar grubu için  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre CLSI uyumu (%56-65) arasında iken duyarlılık/dirençlilik durumuna göre uyumu (%100) olarak belirlenmiştir(Tablo 4).

Vorikonazol açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç gruptaki uyumu (%91,6-91,2) arasında iken duyarlılık-dirençlilik durumuna göre uyumu (%83,3-100) arasında belirlenmiştir(Tablo 4).

Amfoterisin B için  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç grup için bu yöntem CLSI ile (%16-48) arasında zayıf uyumlu olarak belirlenmiştir(Tablo 4).

Kaspofungin açısından  $\pm 2$  dilüsyon kriterine göre üç mantar grubu için uyum (%58-68) arasında iken, duyarlılık-dirençlilik durumuna göre uyumu (%100) olarak belirlenmiştir.(Tablo 4)

Flukonazol açısından; CLSI ile kıyaslandığında Etest yönteminde toplam 60 kökünde 7 hata belirlenmiştir. İğnç olarak aynı zamanda bu kökenler flukonazol için hata belirlenen kökenler Sensititre YeastOne yöntemi ile de hata belirlediğimiz kökenlerdir. Etest yöntemi ile Grup 1(*C.lusitaniae*)’de hiç hata belirlenmezken, Grup 2’de (*C.intermedia*) bir büyük , bir küçük hata, Grup 3’de beş küçük hata gösterilmiştir(Tablo 4).

Vorikonazol açısından Etest yönteminde Grup1 ve Grup 3’de hiç hata belirlenmezken, Grup 2’de(*C.intermedia*) bir büyük, bir küçük hata belirlenmiştir(Tablo 4).

Kaspofungin açısından Etest yönteminde hiç hata saptanmamıştır(Tablo 4).

Estrella ve arkadaşları 2009’da yaptıkları çalışmada 154 kandida kökeni ile dört antifungal için E test ile saptanan toplam hata sayılarını; en çok flukonazol için olmak üzere toplamda çok büyük hata (n: 1), büyük hata (n: 2), küçük hata (n: 61) olarak bildirmişlerdir(73).

L.Majoros ve arkadaşları 2005 yılında flukonazole dirençli buldukları 48 *C.inconspicua* kökeninin kaspofungin duyarlılığını CLSI M27 A3 referans yöntemle ve E test ile çalışmışlardır. Tüm kökenleri 24 saatlik sonuçlara göre kaspofungine hassas olarak saptadıklarını ve dilüsyon farklılıklarına göre de yöntemler arası uyumun iyi olduğunu bildirmişlerdir(76).

Sewell ve arkadaşlarının 1994’de 238 kandida kökeniyle yaptıkları çalışmada; flukonazol duyarlılıklarını E test yöntemi, CLSI BMD ve makrodilüsyon yöntemi ile belirlemişlerdir. 48 saatlik CLSI BMD ve makrodilüsyon sonuçları arasındaki uyumu (%94) olarak bulmuşken, E test ile makrodilüsyon sonuçlarının

uyumunu *C.glabrata* için( % 34), albicans dışı diğer kandida kökenlerinde ise (%97) olarak belirlemişlerdir(77).

Mazuelos ve arkadaşları CLSI ve E test arasındaki uyumu flukonazol için (% 74,5), itrakonazol için ise (%61,4) olarak bildirmişlerdir(78).

Yücesoy ve arkadaşları 77 *C.albicans* kökeninin flukonazol ve amfoterisin B duyarlılıklarını CLSI M27 A mikrodilüsyon ile ve E test yöntemi ile araştırmışlardır. Amfoterisin B için  $\pm 2$  dilüsyon içindeki MİK değerleri arasındaki uyum (%85,7) iken, flukonazol için bu oran (%62,8) olarak bulunmuştur. Duyarlı/dirençli olma durumları açısından testler arası uyumların amfoterisin B için (%93,5), flukonazol için ise (%80- 90,7) arasında olduğunu bildirmişlerdir(79).

Serefko ve arkadaşları 2008'de *C.glabrata*(24), *C.tropicalis* (16), *C.kefyr* (10), *C.famata* (8), *C.parapilosis* (4), *C.dublinskiensis* (3), *C.maris* (3), *C.sake* (2), *C.krusei* (2), *C.lusitaniae* (2), *C.inconspicua* (1), *C.norvegensis* (1)'den oluşan toplam 76 kökenin kaspofungin duyarlılığına E-test ve CLSI yöntemi ile araştırmışlardır; 48 saatlik inkubasyon sonunda saptadıkları CLSI ve E-test MİK değerleri arasındaki  $\pm 1$  dilüsyonluk uyum %71 iken  $\pm 2$  dilüsyonluk uyumu %92 olarak saptamışlardır(80).

Özcan K. S. ve arkadaşlarının 46 kandida kökeninin antifungal duyarlılıklarını CLSI M27 A3 ve E test ile çalışmışlardır. E test ile belirlenen MİK değerleri CLSI ile kıyaslandığında flukonazol için (%80,4); vorikonazol için (%93,4); amfoterisin B için (%84,7) ve kaspofungin için (%95,6) uyum olduğunu bildirmişlerdir(81).

Koga-ito ve arkadaşları 2008'de yaptıkları çalışmada CLSI ile Etest yöntemi arasında ki flukonazol için (%53,3), itrakonazol için (%45) gibi zayıf uyum olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada amfoterisin B için (%66,67), flusitozin için ise (%65) oranlarını iyi uyum olarak nitelendirmişlerdir(82).

Maxwell ve arkadaşları nadir türlerin yer aldığı geniş kapsamlı çalışmalarında flukonazol ve vorikonazol için Etest ile CLSI uyumlarını sırasıyla (%96) ve (%95) olarak bulmuşlardır(83).

Çalışmamızda iki yöntem arasında duyarlılık-dirençlilik durumuna göre flukonazol ve kaspofungin için sırasıyla (%88,3) ve (%100) ile iyi uyum belirlenirken, dilüsyon farklılıklarına göre flukonazol ve kaspofungin için sırasıyla (%60) ve (%65) olarak düşük uyum elde edilmiştir. Yine amfoterisin B için dilüsyon farklılıklarına göre iki yöntem arasında (%40) ile zayıf uyum elde edilmiştir. Sadece vorikonazol açısından iki yöntemin uyumu hem dilüsyon farklılıklarına göre (%91,6), hem de duyarlılık-dirençlilik durumuna göre (%96,6) olarak yüksek uyumluluk düzeyinde bulunmuştur.

Literatür verilerini de göz önünde bulundurarak; çalışmamızda Etest yönteminde kullandığımız antifungaller arasında dilüsyon farklılıklarına göre en uyumlu antifungal vorikonazol olarak belirlenmiştir(82, 83).

Türlere ve/veya ilaçlara göre Etest yöntemi düşük ya da yüksek dilüsyon farklılıkları sergileyebilmektedir. Örneğin; Sewell ve arkadaşlarının çalışmasında Etestle saptanan flukonazol MİK değerleri CLSI makro ve mikrodilüsyon yöntemine göre; *C.albicans* için daha yüksek iken; *C.glabrata* ve *C.krusei* türleri için daha düşüktür. Benzer olarak çalışmamızda yer alan nadir türler için genel olarak Etest MİK değerleri CLSI MİK değerlerine göre; flukonazol için (2-6) dilüsyon fark ile yüksek sonuçlar verirken, kaspofungin için (0-4) dilüsyon ve amfoterisin B için (0-7) dilüsyonluk fark ile düşük değerler göstermiştir.

Etest ile CLSI arası uyum farklılıklarının bir diğer nedeni Etest için kullanılan besiyerinin içeriğidir. Örneğin Pfaller ve arkadaşlarının yaptığı 7 farklı tür içinde yer alan 726 kandida kökeninden oluşan geniş kapsamlı bir çalışmada; Etest için kullanılan üç farklı besiyeri ile kaspofungin için alınan sonuçlar CLSI'e göre kıyaslanmıştır. En yüksek uyum(%94) ile RPMI'da saptanırken, Casitone ve AM3 besiyerleri için sırasıyla (%82), (%79) uyum belirlenmiştir(84).

Literatürdeki çalışmalara göre kandidalar açısından tür-ilaç ve besiyeri kombinasyonlarına dayalı standartlaşmış bir uygulamanın henüz mevcut olmaması, azoller için elde edilen MİK noktalarında keskin sınırlar bulunmaması, inhibisyon elipsinin içinde üreme yoğunluğunun değerlendirilmesindeki güçlükler, büyük koloniden küçük koloniye geçişler gibi durumlar nedeniyle görsel olarak okumalarının yoruma açık olması ve pahalı bir yöntem olması Etest'in dezavantajlarıdır.

Ancak ek bir ekipman gerektirmemesi ve kolay uygulanabilir olması bu testin avantajlı yönleridir. Çok sayıda kökenle yapılan kıyaslamalı çalışmalar arttıkça Etest yönteminin önerilebileceği tür, besiyeri ve antifungal ilaçların belirlenmesi gerçekleşecektir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda nadir görülen ve yeni güncelleşen türlere yer vermemizin nedeni, bu türlerin antifungal duyarlılık profilleriyle ilgili olarak literatürde baz alınacak yeterli bilgi birikiminin olmamasıdır.

İlginç olarak bu nadir görülen türlerde toplamda %38,3 oranında amfoterisin B'ye karşı direnç olarak nitelendirilebilecek 1µg/ml'in üzerinde MİK değeri saptanmış olmamız çalışmamızın dikkat çekici bulgularından birisidir.

Kaspofungin için Vitek-2 dışında diğer iki ticari yöntemi CLSI ile kıyasladığımızda; büyük ya da küçük hata saptanmamış olduğundan duyarlılık/dirençlilik profiline göre Sensititre YeastOne ve Etest CLSI ile %100 uyumlu bulunmuştur. Ancak, CLSI'a göre oldukça düşük MİK değerleri vermeleri nedeniyle, dilüsyon farkına göre zayıf uyumlu olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu testlerle dirençli kökenlerin belirlenememesi ihtimali bulunmaktadır. Ancak, zorunluluk dahilinde bu testlerin uygulanabileceğini önerebiliriz.

Nadir ve yeni güncelleşen türlerde yer alan kökenlerimiz amfoterisin B açısından dirençli kabul edilebilecek ve de kaspofungin açısından hassas olmakla birlikte sınırda duyarlılık gibi kritik MİK değerleri sergilemiş olduğundan bu gibi klinik izolatlarda her iki antifungal için antibiyogram yapılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

*C.intermedia* ve grup 3'de yer alan diğer albicans dışı kökenlerimizde AFY'lerin hata yüzdeleri yüksek olarak saptanmış olup *C.lusitaniae* türü için flukonazol, vorikonazol, kaspofungin açısından çalışılan tüm yöntemlerde hiç hata saptanmamıştır. Yöntemlerdeki hata oranlarının yüksek olarak belirlenmiş olması köken sayımızın yetersiz olmasına bağlanabilir. Bu türler açısından çok sayıda izolatla yapılacak çalışmalar, alternatif testlerin hata ve uyum oranlarının daha iyi belirlenmesini sağlayacaktır.

Çalıştığımız kandida grupları için duyarlılık-dirençlilik uyum kriterine uygun olarak önerebileceğimiz, CLSI'a alternatif ticari yöntemler; *C.lusitaniae* için her iki azolde her üç yöntem, *C.intermedia* için Vitek-2 sistemi, grup 3 (Diğerleri) için flukonazolde sadece Vitek-2, vorikonazol için her üç yöntem olarak belirlenmiştir.



Kaspofungin açısından duyarlılık-dirençlilik kriterine dayalı uyumlarına göre üç kandida grubu için, Sensititre YeastOne ve Etest yöntemlerinin her ikisini de önerebiliriz.

Amfoterisin B'e karşı duyarlılık saptanmasında ise, dilüsyon farklılıklarına dayalı uyum açısından her üç kandida grubu için Sensititre YeastOne yöntemini uygun bir seçenek olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1.Yücel A, Kantarcıoğlu S. Hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Cerrahpaşa J Med 2001; 32: 259-69.
2. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş A.E, Uyanık M.H. Çeşitli Candida Türlerinin İki Farklı Triazole Duyarlılıklarının Mikrodilüsyon Yöntemi İle Araştırılması.The Eurasian Journal of Medicine 2007; 39: 173-177.
- 3 .Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2008.
4. Poyraz Ö. Fırsatçı Enfeksiyon Oluşturan Mantarlar. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. s.1,Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, No. 101. Sivas, 2006.
5. John E, Edwards JR. Candida Species. Ed: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. p. 2289- 2290, Forth Edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone, 1995.
6. Bilgehan H. Candida'nın Tarihçesi, Ekolojist ve Dağılımı. s. 1-9. Ed: Tümbay E, Candida ve İnfeksiyonları. Bilgehan Basımevi İzmir, 1986.
7. Koneman EW, Auren SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Wilm WC. Mycology. pp. 983-1069. Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia, Lippincott 1997.
8. Boriollo MFG, Spolidoro DMP,Barros LM, et al. Typing Candida albicans oral isolates from healty Brazilian schoolchildren using multilocus enzyme electrophoresis reveals two highly polymorphic taxa. Brazilian Journal of Microbiology 2011; 42:1030-1046
9. Tümbay E. Candida ve İnfeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 6, Bilgehan Basımevi. İzmir, 1986.

10. Tümbay E, Seeliger HPR, Ang Ö. *Candida and Candidamyosis*. Plenum Press, New York, 1991.
11. Kiraz N. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarının Fenotiplendirilmesi ve Farklı Fenotiplerin Bazı Antifungal Maddelere Duyarlılıklarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yan Dal Uzmanlık Tezi, İstanbul, 1996.
12. Yücel A, Kantarcıoğlu AS; *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler, *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30(3): 236-246.
13. Calderone RA. *Candida and candidiasis*. Ed: Calderone R A., Cornelius J. Clancy, *Emergence of Non-Candida Albicans Candida Species as Pathogens* p.37 ASM Press, Washington, D.C. 2002.
14. Hazen KC, Howell SA. *Candida, Cryptococcus, and Other Yeast Of Medical Importance*. Ed: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, *Manual of Clinical Microbiology*. pp. 1693- 1712, 8th Ed. DC, ASM press, Washington, 2003.
15. Hazen KC, Howell SA. *Candida, Cryptococcus ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mantarlar* (Çev: Ed. Başustaoğlu A) *Klinik Mikrobiyoloji*. s. 1762-1765, Atlas Kitabevi, Ankara, 2009.
16. Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. Ed: Calderone R A., Cornelius J. Clancy, *Emergence of Non-Candida Albicans Candida Species as Pathogens*, pp. 39-40, ASM Press, Washington, D.C. , 2002.
17. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. s.1801, Cilt 2 Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.
18. ENER B. *Candida* infeksiyonlarında epidemiyoloji ve laboratuvar tanı. *Ankem Derg* 2008;22(Ek 2):264-269.
19. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. s. 1801-1802, Cilt 2, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.

20. G, Lucariello A, Colella G, Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol* 2007; 60(9): 1035–1039.
21. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, Ruiz Lda S, Franco MC. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48: 21-6.
22. D'Antonio D., Romano F., Pontieri E., Fioritoni G., Caracciolo C., Bianchini S., Oliosio P., Staniscia T., Sferra R., Boccia S., Uetuschi A., Federico G., Gaudio E., Carruba G. Catheter-Related Candidemia Caused by *Candida lipolytica* in a Patient Receiving Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 1381–1386.
23. Shin JH, Kook H, Shin DH, Hwang TJ, Kim M, Suh SP, Ryang DW. Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(5): 344-9.
24. Belet N, Ciftçi E, Ince E, Dalgıç N, Oncel S, Güriz H, Yagmurlu A, Dindar H, Doğru U. Caspofungin treatment in two infants with persistent fungaemia due to *Candida lipolytica*. *Scand J Infect Dis* 2006; 38(6-7): 559-62.
25. Nielsen H, Stenderup J, Bruun B, Ladefoged J. *Candida norvegensis* peritonitis and invasive disease in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1664-5.
26. Sandven P, Nilsen K, Digranes A, Tjade T, Lassen J. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6): 1375-6.
27. Majoros L, Kardos G, Belák A, Maráz A, Asztalos L, Csánky E, Barta Z, Szabó B. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5250-3.

28. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. s. 685–686, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 2. baskı, İstanbul, 1995.
29. D'Antonio D., Vielante B., Mazzoni A., Bonfini T., Capuani M. A., D'Aloia F., Iacone A., Schioppa F., Romano F.: A Nosocomial Cluster of *Candida inconspicua* Infections in Patients With Hematological Malignancies. *Journal Of Clinical Microbiology* 1998; 36: 792-795.
30. Jose A, Vazquez, Sobel J.D. Candidiasis. Ed: Dismukes WE, Peter MD, Pappas G, Jack MD, Sobel D, *Mycology* pp. 143-147 Newyork, 2003.
31. Kalkanci A, Dizbay M, Turan O, Fidan I, Yalçın B, Hirfanoğlu I, Kuştimur S, Aktaş F, Sugita T. Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. *Turk J Pediatr* 2010; 52(1): 42-9.
32. Hoegl L, Schönian G, Ollert M, Korting HC. *Candida sake*: a relevant species in the context of HIV-associated oropharyngeal candidosis? *J Mol Med (Berl)*. 1998;76(1):70-3.
33. Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, González ME. J. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *Clin Microbiol* 2005; 43(2): 635-40.
34. Ruan SY, Chien JY, Hou YC, Hsueh PR. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. *Int J Infect Dis* 2010;14(2): *Int J Infect Dis*. 2010; 14(2): 147-9.
35. Swoboda-Kopeć E, Rokosz A, Sawicka-Grzelak A, Wróblewska M, Krawczyk E, Stelmach E, Łuczak M. Etiologic agents of fungemia in hospitalized patients. *Med Dosw Mikrobiol* 2001; 53(3): 291-5.
36. Kayaalp O. Antifungal Antibiyotikler ve Diğer Antifungal İlaçlar, *Tıbbi Farmakoloji*, 1. Cilt, s. 832-853 Ulucan Matbaası, Ankara, 1984.
37. Stevens DA, Bennett JE. Antifungal agents. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of infectious Diseases*, pp. 448-59. 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

- 38.Murray PR, Rosenthal KS, Phaller M. Mycology, Ed: Mosby E. Medical Microbiology, pp.709-817, 5th Ed, Philadelphia, 2005.
- 39.Kiraz N. Antifungal tedavide yenilikler. Türkiye Klinikleri Farmakoloji Derg 2003; 1(2)
40. Mermut G. Polyen Grubu Antifungaller. SB İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir Batı Çağ Mantar Sempozyumu Kitabı, s.35-36. İzmir, 2003.
41. Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. Ed: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH Manual of Clinical Microbiology. pp. 1858- 1868, 8th Ed, DC,ASM pres, Washington, 2003.
42. Loeffler J and Stevens DA. Clinical Infectious Diseases. s.31–41. (Antifungal Drug Resistance 36(Supplement: 1) 2003)
- ( <http://cid.oxfordjournals.org/> March 24, 2012)
43. Kutlu SS. Azol Grubu Antifungaller. Batı Anadolu Mantar Çalışma Grubu. Mantar Sempozyumu Kitabı. Sayfa 37-38 İzmir, 2009.
44. Yıldırım ŞT. Yeni geliştirilen azoller. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 19-21 Haziran, 2001; Ankara, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2001; 39: 141-148.
- 45.Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. Ed: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. pp. 1949-1960 9 th ed., ASM Press, Washington DC, 2007.
46. A.Gürbüz .Yabancı Yayınlardan Özetler: Candida albicans'ta azollere direnç mekanizmaları.(White TC: Antifungal drug resistance in Candida albicans. ASM News 1997,63: 427-433.) Mikrobiyoloji Bülteni 1997; 31: 405-409.
47. Como J, Dismukes WE. Clinical Mycology Ed: Dismukes WE, Pappas PG. SOBEL JD, p.72. Oxford University Press,Newyork,2003.

48. Yeğenoğlu Y. Antifungal Direnci Gösteren Mantarlar. ANKEM Derg 2012; 26(Ek 2): 254-260.
49. Ernst E J, Klepser M E, Pfaller MA. Postantifungal effect of echinocandin, azole and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. AAC 2000; 44: 1108-111.
50. Gregori C, Glaser W, Frohner IE, Reinoso-Martín C, Rupp S, Schüller C, Kuchler K. Efg1 Controls caspofungin-induced cell aggregation of *Candida albicans* through the adhesin Als1. Eukaryot Cell 2011; 10(12): 1694-704.
51. Kauffman CA. Treatment of Candidemia and Invasive Candidiasis in Adults. Ed. Marr KA, Thorner AR. 2012  
(<http://www.uptodate.com>)
52. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Epidemiology of deep mycoses; considerations on antifungal prophylaxis and antifungal susceptibility tests. Cerrahpaşa J Med 2001; 32(3): 184-199.
53. Çerikçioğlu N. Antifungal duyarlılık testleri. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı; 13-15 Nisan, 2006, İstanbul, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 2006; 4: 93-104.
54. Poyraz Ö. Fırsatçı Enfeksiyon Oluşturan Mantarlar, Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, No. 101. s. 53-56. Sivas, 2006.
55. Pfaller MA, Kauffman CA. Antifungal Susceptibility Testing. 2012  
(<http://www.uptodate.com>)
56. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A: Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges, Clin Microbiol Rev 2001; 14 (4):643- 658.
57. Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y: Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12: 336- 342.

58. D. J. Diekema, S. A. Messer, L. B. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. Tendolkar, and M. A. Pfaller. In Vitro Activity of Seven Systemically Active Antifungal Agents against a Large Global Collection of Rare *Candida* Species as Determined by CLSI Broth Microdilution Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(10): 3170–3177
59. M.A.Pfaller et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Posaconazole and Voriconazole and *Candida* spp. As Determined by 24-hour CLSI broth Microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49( 2): 630-37
60. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 3884-9.
61. Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borrell N, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Guinea J, García J, Porrás A, García-Tapia AM, Pérez-Del-Molino L, Suárez A, Alcoba J, García-García I. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12): 4158-63.
62. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 796-802.
63. D'antonio D, Violante B, Mazzoni A, Bonfini T, Capuani MA, D'aloia F, Iacone A, Schioppa F, Romano F. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1998; 792-795.
64. N. Bourgeois, L. Dehandschoewercker, S. Bertout, P.J. Bousquet, P. Rispaill, L. Lachaud. Antifungal Susceptibility of 205 *Candida* spp. Isolated Primarily during



Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1): 154–161

65. Kantarcioglu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19(1): 44-48.

66. Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. *Archives of Iranian Medicine* 2010; 13(4).

67. Messer SA, Moet GJ, Kirby JT, Jones RN. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). *J Clin Microbiol* 2009; 47(6): 1942-6.

68. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 718-21.

69. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45(11): 3522-8.

70. Kovacicova G, Hanzen J, Pisarcikova M, Sejnova D, Horn J, Babela R, Svetlansky I, Lovaszova M, Gogova M, Krcmery V. Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida* spp. in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. *J Infect Chemother* 2001; 7(1): 45-8.

71. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 796-802.

72. Borghi E, Iatta R, Sciota R et al. Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: the GISIA3 Study, *J Clin Microbiol* 2010; 48(9): 3153-57.
73. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1782-6.
74. Posteraro B, Martucci R, La Sorda M, Fiori B, Sanglard D, De Carolis E, Florio AR, Fadda G, Sanguinetti M. Reliability of the Vitek 2 yeast susceptibility test for detection of in vitro resistance to fluconazole and voriconazole in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6): 1927-30.
75. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoum MA. Multicenter comparison of the sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3): 591-5.
76. Majoros L, Kardos G, Szabó B, Sipiczki M. Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida inconspicua*: Correlation of Different Methods with the Minimal Fungicidal Concentration. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2005; 49(8): 3486–3488
77. Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9): 2099-102.

78. Bernal S, Gutiérrez MJ, Serrano MC, Chávez M, Valverde A, Quindós G, Mazuelos EM. Susceptibility to fluconazole and itraconazole in isolates of *Candida* spp. from HIV-positive and HIV-negative patients. *Rev Esp Quimioter* 2000; 13(1): 60-63.
79. Yücesoy M, Mutlu E, Yuluğ N. Antifungal Duyarlılığın Saptanmasında E test Yönteminin Değerlendirilmesi. *ANKEM Dergisi* 2001; 15(4): 670-677.
80. Serefko A, Los R, Biernasiuk A, Malm A. Comparison of microdilution method and E-test procedure in susceptibility testing of caspofungin against *Candida non-albicans* species. *New Microbiol* 2008; 31(2): 257-62.
81. Özcan K.S, Mutlu B, Dündar D, Willke A. Kan Klütürlerinden İzole edilen *Candida* spp. Suşlarının Antifungal İlaçlara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Buyyon Mikrodilüsyon ile E-test Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 263-271.
82. Koga-Ito CY, Lyon JP, Resende MA. Comparison between E test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates *Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo* 2008; 50(1): 7-10
83. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 1087-90.
84. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4387-9

