

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CANDIDA ALBICANS*'DA  
BAZI BİYOSİDLER VE ANTİFUNGALLERİN  
IN VİTRO ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Burçak CÖMERT KOÇAK**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR**

**ANKARA  
HAZİRAN 2015**



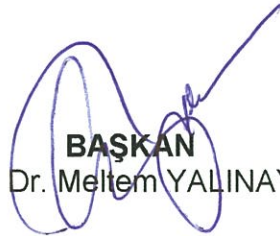
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Burçak CÖMERT KOÇAK
Baba Adı	Zafer
Doğum Yeri/Tarihi	Çanakkale / 19.07.1985
Diploma Tarihi / Diploma No	29.07.2009 / 2009-09-0231
Mezun Olduğu Fakülte	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji
İhtisas Süresi	Yıl: 4 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

**UZMANLIK TEZİNİN ADI:** *Candida albicans*'da Bazı Biyosidler ve Antifungallerin In Vitro Etkileşiminin Araştırılması

**JÜRİ KARARI:** Tez çalışması oybirliği ile başarılı bulunmuş ve kabul edilmiştir.

**JÜRİ ÜYELERİ**

  
**BAŞKAN**  
Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

**ÜYE**  
Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR



**ÜYE**  
Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN

  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri  
Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN  
Enf. Hast. ve KL. Mikrobiyoloji Uzmanı  
Dip. Tes. No: 60804

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kayhan Çağlar'a, tezimi hazırlamamda bana destek olan, bilgisiyle rehberlik eden değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Kalkancı'ya, uzmanlık eğitimimde emeği geçen; değerli hocalarım Prof. Dr. Semra Kuştımur, Prof. Dr. M. Nedim Sultan, Prof. Dr. Seyyal Rota, Prof. Dr. Meltem Yalınay Çırak, Prof. Dr. Gülendam Bozdayı, Prof. Dr. Işıl Fidan, Doç. Dr. Funda Doğruman Al ve Doç. Dr. Nuray Büyükberber'e, birlikte çalıştığım bütün arkadaşlarıma, beni yetiştiren, sevgi ve destekleriyle hep yanımda olan sevgili anneme ve babama, aynı dönemde tezini hazırlayan, bu zorlu süreçleri beraber aştığım sevgili eşim Mehmet'e ve hayatımızı değiştiren, yüzümüzü güldüren biricik oğlum Mert Efe'ye sonsuz teşekkür ederim.

**Dr. Burçak CÖMERT KOÇAK**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçların Özellikleri.....	3
2.1.1. Polyenler.....	3
2.1.1.1. Nistatin.....	3
2.1.2. Azoller.....	7
2.1.2.1. Ketokonazol.....	9
2.1.2.2. Flukonazol.....	9
2.1.2.3. İtrakonazol.....	11
2.1.2.4. Vorikonazol.....	12
2.1.2.5. Posakonazol.....	13
2.1.3. Ekinokandinler.....	13
2.1.4. Yeni antifungal ilaçlar.....	16
2.2. <i>Candida</i> 'da Antifungal İlaçlara Direnç.....	17
2.2.1. Polyenlere Direnç.....	19
2.2.2. Azollere direnç.....	20

2.2.3. Ekinokandinlere direnç .....	21
2.2.4. Çoklu ilaca direnç (ÇİD) .....	22
2.3. <i>Candida</i> 'da Antifungal Duyarlılık Testleri .....	23
2.3.1. Sıvı Dilüsyon Testleri .....	24
2.3.2. Disk difüzyon testi .....	27
2.3.3. E-test yöntemi .....	27
2.3.4. Kullanılan diğer yöntemler .....	28
2.3.5. İlaç Etkileşimlerinde Kullanılan Testler (İn vitro Sinerji Testleri) .....	29
2.3.5.1. Zamana bağlı öldürme (Time-kill) yöntemi .....	29
2.3.5.2. Dama tahtası (Checkerboard) yöntemi .....	30
2.4. Biyosidler .....	33
2.4.1. Klorheksidin .....	34
2.4.2. Benzalkonyum klorür .....	37
2.4.3. Biyosidlere Direnç Mekanizmaları .....	38
2.4.3.1. Klorheksidin direnci .....	43
2.4.3.2. Kuaterner amonyum bileşiklerine direnç .....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	48
3.1. Gereçler .....	48
3.1.1. Besiyerleri, Ticari kitler .....	48
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kökenler .....	50
3.2. Yöntemler .....	50
3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması .....	50
3.2.1.1. Sabouraud dekstroz agar (SDA) hazırlanması .....	50

3.2.1.2. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması.....	51
3.2.2. Antifungal ilaçların ve biyosidlerin hazırlanması.....	51
3.2.3. <i>Candida albicans</i> Tür Tanımlaması.....	52
3.2.3.1. Germ tüp testi.....	52
3.2.3.2. Karbonhidrat asimilasyon testi-ID 32C sistemi .....	52
3.2.4. Maya süspansiyonlarının hazırlanması .....	53
3.2.5. Antifungal ve biyosidlerin duyarlılık testi .....	54
3.2.6. Kombinasyon testleri .....	55
3.2.6.1. Dama tahtası (Checkerboard) yöntemi.....	55
3.2.6.2. Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) ve FİK indeksinin hesaplanması .....	63
4. BULGULAR .....	64
4.1. Flukonazol Ve Nistatinin İn Vitro Duyarlılık Test Sonuçları.....	64
4.2. Klorheksidin Ve Benzalkonyum Klorürün İn Vitro Duyarlılık Test Sonuçları .....	65
4.3. Kombinasyon Testinin Sonuçları.....	66
5. TARTIŞMA .....	70
6. SONUÇLAR .....	81
7. KAYNAKÇA .....	82
9. SUMMARY.....	101
10. ÖZGEÇMİŞ.....	102

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>°C</b>	: Santigrat
<b>CFU/ml</b>	: Colony Formation Unit (Koloni Oluşturan Birim)/mililitre
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
<b>ÇiD</b>	: Çoklu ilaç dirençli
<b>DMSO</b>	: Dimetil sulfoksit
<b>ECOFF</b>	: Epidemiyolojik “cut off” değeri
<b>EUCAST</b>	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>FIK</b>	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
<b>FIKİ</b>	: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon İndeksi
<b>g</b>	: Gram
<b>L</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>MBK</b>	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MFK</b>	: Minimum Fungisidal Konsantrasyon
<b>ml</b>	: Mililitre

- $\mu$ l** : Mikrolitre
- MOPS** : 3- [N-morfolino] propansülfonik asit
- MRSA** : Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
- MSSA** : Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*
- nm** : Nanometre
- PZR** : Polimeraz zincir reaksiyonu
- SDA** : Sabouraud Dekstroz Agar



## TABLOLAR DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Tablo 1.</b> Sıvı mikrodilüsyon yönteminin CLSI ve EUCAST'a göre karşılaştırılması <sup>59,61,63</sup> .....	25
<b>Tablo 2.</b> CLSI ve EUCAST'a göre <i>Candida albicans</i> için MİK sınır değerleri <sup>64</sup> .....	26
<b>Tablo 3.</b> Flukonazol Duyarlı kökenlerin mikroplaklardaki Flukonazol← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları (mg/L) .....	57
<b>Tablo 4.</b> Flukonazol Dirençli kökenlerin mikroplaklardaki Flukonazol← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları (mg/L) .....	58
<b>Tablo 5.</b> Flukonazol Duyarlı kökenlerin Mikroplaklardaki Flukonazol ← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L) .....	59
<b>Tablo 6.</b> Flukonazol Dirençli kökenlerin Mikroplaklardaki Flukonazol ← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L) .....	60
<b>Tablo 7.</b> Mikroplaklardaki Nistatin← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları(mg/L) .....	61
<b>Tablo 8.</b> Mikroplaklardaki Nistatin← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L) .....	62
<b>Tablo 9.</b> <i>Candida albicans</i> kökenlerinin tek başına flukonazol, nistatin, klorheksidin ve benzalkonyum klorür için MİK değerleri (mg/L) 65	

**Tablo 10.** *Candida albicans* kökenlerinin flukonazolle biyosid kombinasyonlarının FİK indekslerinin minimum ve maksimum ( $\sum FİK_{\min}$  -  $\sum FİK_{\max}$ ) değerleri ve değerlerin analizine göre elde edilen in vitro etkileşim sonuçları.....68

**Tablo 11.** *Candida albicans* kökenlerinin nistatinle biyosid kombinasyonlarının FİK indekslerinin minimum ve maksimum ( $\sum FİK_{\min}$  -  $\sum FİK_{\max}$ ) değerleri ve değerlerin analizine göre elde edilen in vitro etkileşim sonuçları.....69

## ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

### Sayfa No:

- Şekil 1.** Dama tahtalarının isobologramlarla gösterilmesi ..... 32
- Resim 1.** Dama tahtası yönteminin uygulandığı bir plağın örnek görüntüsü ..... 67

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda kemoterapi, immünsupresif tedavilerin artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, invazif girişimler, kemik iliği ve solid organ transplantasyonları, yoğun bakım ünitelerinde kalan hasta sayılarının artması gibi nedenlerle fungal enfeksiyonlarda belirgin bir artış görülmektedir.<sup>1,2,3</sup>

*Candida* türleri fungal enfeksiyonların en sık etkenleridir. Deri, gastrointestinal ve genitouriner sistemlerde kolonize olabildikleri gibi, mukokutanöz enfeksiyonlara ya da hayatı tehdit eden invazif enfeksiyonlara neden olabilirler.<sup>4</sup> Özellikle yoğun bakım ünitelerinde, *Candida*'ya bağlı invazif enfeksiyonlar, kandidemiler önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir.<sup>5</sup> Son yıllarda özellikle *Candida albicans* dışı türlerin görülme sıklığı artmakla birlikte, hala tüm dünyada en sık etken *Candida albicans*'tır.<sup>6,7,8</sup>

Toplumdaki bağışıklığı baskılanmış bireylerin artmasıyla, fırsatçı mantar enfeksiyonlarının sayısı artmış ve bu enfeksiyonların tedavisi de önem kazanmıştır. Antifungal tedavi geçen 20 yılda oldukça büyük bir gelişme göstermiştir. Ancak, fungal enfeksiyonların epidemiyolojisi değişmeye devam etmektedir. Mevcut antifungal maddelerin de değişen toksisite ve ilaç etkileşimi potansiyelleri olması nedeniyle antifungal tedavi hala optimal değildir.<sup>8</sup> Ayrıca, tedaviyi zorlaştıran antifungal tedaviye direnç oranları da artmaktadır.<sup>9</sup> Mevcut antifungaller içinde en çok kullanılan ilaç grupları polyenler, azoller ve ekinokandinlerdir.<sup>8</sup>

Fırsatçı patojen olan *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonların esas kaynağı endojendir, yani hastanın kendisidir. Ancak etken dışarıdan da hastaya kontamine kateterler, kontamine parenteral nutrisyon sıvıları ya da sağlık çalışanlarının elleri aracılığıyla bulaşabilir.<sup>10</sup>

Biyosidler; antiseptikler, dezenfeksiyonda, temizlik ürünlerinde hastanelerde de yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir.<sup>11</sup>

Literatüre bakıldığında, biyosidlerin bakteriler üzerine olan etkileri ve antibiyotiklerle ilişkileriyle ilgili daha çok çalışma mevcutken; mantarlar üzerine etkileri ve antifungallerle etkileşimleri üzerine sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmada *Candida albicans*'ın flukonazol duyarlı ve dirençli farklı klinik suşlarında, en sık kullanılan iki biyosid olan klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün, klinikte sık kullanılan antifungal ilaçlardan flukonazol ve poliyen grubu antifungallerden nistatinle in vitro etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Candida* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçların Özellikleri

#### 2.1.1. Polyenler

1950'li yıllarda bulunan antifungal ilaç grubu olan polyenler, hücre zarındaki ergosterole bağlanarak etki gösterirler. Bu grubun en önemli üyeleri nistatin ve amfoterisin B'dir.<sup>8</sup>

##### 2.1.1.1. Nistatin

Nistatin, polyen grubundan bulunan ilk antifungal ilaçtır. 1950 yılında Hazen ve Brown tarafından bulunmuştur.<sup>12</sup> *Streptomyces noursei*'den elde edilmiştir.<sup>13</sup> Nistatin, oral kullanımında etkisiz, intravenöz kullanımda ise çok toksik bir ilaçtır. Bu nedenlerle ve hidrofobik yapısı nedeniyle topikal kullanımıyla sınırlı kalmıştır.<sup>8</sup> Özellikle deri, ağız, özofagus ve vaginal kandidozların topikal tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>13</sup> Sistemik kullanım için lipozomal formu üretilmiştir. Lipozomal formunun kullanımı araştırma düzeyinde devam etmektedir.<sup>14</sup>

### 2.1.1.2. Amfoterisin B

1955 yılında, sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olan amfoterisin B üretilmiştir.<sup>15</sup> Polyen grubu antifungaller içinde en önemli yere sahip ilaç olan amfoterisin B, uzun yıllar boyunca fungal enfeksiyonlarda tek başına standart tedaviyi oluşturmuştur.<sup>8,16</sup> Sistemik mikozlarda hala en etkili ilaçtır.<sup>17</sup>

*Streptomyces nodosus*'tan elde edilmektedir.<sup>18</sup> Lipofilik bir moleküldür.<sup>19</sup> Isı, ışık ve pH değişimleriyle inaktive olan, yedi tane konjuge çift bağ içermektedir. Suda çözünürlüğü çok azdır, oral ve intramusküler emilmemektedir. İntravenöz kullanımda amfoterisin B'nin deoksikolat formu tercih edilir. Ancak ilacın nefrotoksik özelliğinden dolayı, deoksikolat formu yerini ilacın lipit formlarına bırakmıştır.<sup>14</sup> Son yıllarda, ilacın inhaler formu da kullanıma sunulmuştur.<sup>20</sup>

Mantar hücre zarındaki ergosterole bağlanan amfoterisin B, düşük konsantrasyonlarında potasyum iyon ( $K^+$ ) kanal aktivitesini artırır; yüksek konsantrasyonlarında ise hücre zarında porlar oluşturur. Potasyum ve diğer moleküllerin kaybı, hücre ölümüne neden olur.<sup>19</sup> Hücrenin ölümünde, amfoterisinin B'nin hücre zarına bağlı oksidatif mekanizmalar üzerinden etki ederek, oksidasyonu artırması da oldukça önemlidir.<sup>12</sup> Oksidasyon ile yol açtığı direk membran hasarının, amfoterisin B'nin hızlı fungisidal etkisinin esas nedeni olduğu düşünülmektedir.<sup>12,14</sup> Ayrıca amfoterisin B, memeli fagositik hücrelerinden tümör nekroz faktör ve interlökin-1 gibi sitokinlerin salınımını da arttırmaktadır.<sup>12</sup>

Amfoterisin B, memeli hücrelerindeki sterollere de afinite göstermektedir. Ancak, ergosterole kolesterolden çok daha fazla afinite göstermektedir. İlacın sterollere olan afinitesi, insanlardaki toksik etkilerinin nedenidir.<sup>8,12</sup> Toksik etkilerini azaltmak için de ilacın lipit formları üretilmiştir. Lipit formları, ilacın daha yüksek dozlarının da kullanımını sağlamıştır.<sup>8,17</sup>

Amfoterisin B, oldukça geniş bir antifungal etki spektrumuna sahiptir ve ilaca karşı direnç gelişimi de nadirdir.<sup>17,16</sup> *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin çoğuna, *Cryptococcus neoformans*, mukormikoz etkenlerine, endemik dimorfik etkenlere (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii*) karşı etkilidir. Ancak *Candida lusitaniae*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.rugosa* ve *C.guilliermondii* suşlarına farklı düzeylerde direnç saptanabilmektedir.<sup>14</sup> *Aspergillus* cinsi içinde *A. terreus*, *A. flavus* ve *A. nidulans* diğer türlere göre amfoterisin B'ye daha az duyarlıdır. Ayrıca *Fusarium* spp., *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium* spp., *Exophiala* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ve *Trichosporon asahii* de yüksek amfoterisin B minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerine sahiptirler.<sup>12</sup> *Aspergillus terreus*, *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Trichosporon* spp. ve *Candida lusitaniae*'da ilaca karşı primer direnç görülebilmektedir.<sup>19,21</sup>

Her zaman in vitro duyarlılık test sonuçlarıyla klinik cevap da aynı olmamaktadır. Örneğin *Aspergillus* türleri ile *Coccidioides immitis* in vitro olarak



amfoterisin B'ye duyarlı gözükmelerine rağmen, klinik cevapları değişkenlik gösterebilmektedir.<sup>12</sup>

Amfoterisin B direnci, hücre zarındaki sterollerde değişikliklerle (özellikle ergosterolde azalma) ilişkili bulunmuştur.<sup>14</sup>

Amfoterisin B'nin dokulara dağılımı oldukça iyidir; ancak beyin omurilik sıvısına (BOS) ve eklemlere geçişi zayıftır. Bazı enfeksiyonlarda intratekal veya intraartiküler kullanımı önerilmektedir.<sup>17</sup> İlacın beyin omurilik sıvısına geçişi zayıf olmasına rağmen, kriptokok menenjitinde flusitozinle kombine kullanımı tedavideki yerini korumaktadır.<sup>22</sup>

İlacın ticari olarak 4 formu bulunmaktadır:

1. Amfoterisin B deoksikolat (Fungizone)
2. Amfoterisin B lipit kompleks (Abelcet)
3. Lipozomal Amfoterisin B (Ambisome)
4. Amfoterisin B kolloidal dispersiyon (Amphocil veya Amphotec)<sup>19</sup>

Amfoterisin B'nin akut yan etkileri; infüzyona bağlı gelişen ateş, titreme, dispne ve hipotansiyondur. Kronik yan etkisi ise nefrotoksisitedir. Diğer yan etkileri arasında; hipokalemi, anemi, bulantı, kusma, baş ağrısı, renal tübüler asidoz, tromboflebit, lökopeni, trombositopeni, aritmi, koagülopati, hemorajik enterit bulunmaktadır. İlacın lipit formlarıyla, toksik etkileri büyük oranda azalmıştır.<sup>12,17,19</sup>

### 2.1.2. Azoller

Azol grubu antifungal ilaçlar, yapılarındaki azol halkasındaki nitrojen sayılarına göre imidazol ve triazoller olmak üzere ikiye ayrılırlar. İmidazollerin azol halkalarında 2 nitrojen bulunurken, triazollerde 3 nitrojen bulunmaktadır.<sup>23</sup>

- 1- İmidazol grubu antifungaller: Ketakonazol, mikonazol, klotrimazol, ekonazol
- 2- Triazol grubu antifungaller:
  - a) Birinci jenerasyon triazoller: Flukonazol, itrakonazol
  - b) İkinci jenerasyon triazoller: Vorikonazol, posakonazol, isavukonazol, albakonazol, ravukonazol

Azol grubu ilaçlar, ERG11 geni tarafından kodlanan, sitokrom P450 bağımlı bir enzim olan lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaz enzimini inhibe ederek, lanosterolden ergosterol yapımını engellerler. Sonuçta hücre membran bütünlüğü bozulur ve hücre hasar görür.<sup>17,22,21</sup> Genel olarak fungistatik etki gösterirler.<sup>14</sup> P450 enzim sistemiyle olan ilişkisinden dolayı, azol grubu antifungallerin çeşitli ilaçlarla etkileşimleri bulunmaktadır.<sup>17</sup>

İlk bulunan azol grubu ilaçlar imidazollerdir. Ancak yan etkilerinden dolayı, daha çok topikal kullanımı olan ilaçlardır. İmidazoller içinde, günümüzde yalnızca ketokonazolün sistemik kullanımı bulunmaktadır.

İmidazollerin etki spektrumununun zayıf, tedavi sonrası relaps oranının yüksek ve toksik etkilerinin fazla olması nedeniyle triazoller geliştirilmiştir. Triazoller imidazollere göre; daha geniş bir antifungal etkinliğe sahiptir, daha az yan etkileri vardır, endokrin yan etkileri yoktur, insan hücresindeki sterollere daha az etkilidirler. Triazollerin hepsinin sistemik etkinliği bulunmaktadır. Ravukonazol, isavukonazol ve albakonazol, triazol grubundan henüz araştırma aşamasında olan yeni ilaçlardır.<sup>14,23</sup>

Azol grubu ilaçların ortak yan etkileri: gastrointestinal yakınmalar (bulantı, kusma, diyare gibi), karaciğer transaminazlarında yükseklik ve döküntüdür. En sık gastrointestinal yan etkiler görülmektedir.<sup>12</sup>

Azol grubu ilaçların en büyük dezavantajı, hepatik sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi (özellikle CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4) tarafından metabolize edilmeleridir. Bu nedenle ilaç seviyeleri, bu yol tarafından metabolize edilen diğer ilaçlarla etkilenir. İlaç etkileşimleri en çok itrakonazol ve vorikonazolde olurken; flukonazol ve posakonazolün ilaçlarla etkileşimi daha azdır. Çünkü bu azoller CYP sistemi tarafından aynı ölçüde metabolize edilmezler.<sup>24</sup> Etkileşimde oldukları bazı ilaçlar: rifampin, rifabutin, varfarin, fenitoin, proton pompa inhibitörleri, siklosporin, takrolimus, statinler, karbamazepin, sisaprid, benzodiyazepinler, kalsiyum kanala blokerleridir.<sup>19</sup>

### 2.1.2.1. Ketokonazol

1981 yılında piyasaya giren ketokonazol, imidazol grubu içinde tek sistemik etkinliği olan ilaçtır. Lipofilik yapıdadır.<sup>14</sup> Oral yoldan emilir, ancak bu emilim gastrik pH'nın asiditesiyle ilişkilidir. İlacın oral formu bulunmaktadır, intravenöz formu yoktur. Kan-beyin bariyerini geçişi zayıf olduğu için fungal menenjitlerde kullanılmaz.<sup>23</sup>

Triazollere göre antifungal etkinliği daha azdır. *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, endemik dimorfik mantarlara etkinliği bulunmaktayken; *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., mukormikoz etkenlerine karşı ise etkisizdir.<sup>14</sup>

İlacın kullanımını sınırlayan en önemli unsur ise yan etkileridir. Gastrointestinal ve hepatik toksisiteye neden olabilir. Yüksek dozlardaki kullanımında da önemli endokrin yan etkileri bulunmaktadır. P450 sistemiyle ilişkisinden dolayı testosteron ve kortizol sentezini baskılayarak ciddi endokrin yan etkilere neden olur. Birçok ilaçla da etkileşimi bulunmaktadır.<sup>23</sup>

### 2.1.2.2. Flukonazol

İlk geliştirilen triazol ilaç olan flukonazol, 1990 yılında piyasaya girmiştir.<sup>25</sup> Ketakonazolden farklı olarak, suda çözünen bir bileşiktir. Oral biyoyararlanımı yüksek olup, gastrik pH'dan etkilenmez. Proteinlere bağlanma oranı çok düşüktür. İlacın, BOS dahil tüm dokulara geçişi çok iyidir. İdrarda

%80'i değişmeden atılmaktadır. Yarılanma ömrü de uzun olup, günlük tek doz kullanımı yeterli olmaktadır. İlacın oral ve intravenöz formları bulunmaktadır.<sup>14,23,26</sup>

Flukonazol, *Candida* spp.'ye karşı fungistatik etkilidir, filamentöz mantarlara karşı ise etkisizdir. *Candida* biyofilmlerine karşı etkisizdir.<sup>26</sup> *Candida* türlerinin çoğuna etkilidir, ancak *Candida krusei* ve *Candida glabrata*'ya karşı duyarlılığı azalmış ya da dirençli olabilir. *Candida krusei*, flukonazole intrinsik dirençliyken, *Candida glabrata* genellikle doza bağımlı duyarlıdır.<sup>27</sup> Farklı *Candida* türlerinde de yüksek flukonazol MİK'leri görülebilmektedir Ayrıca flukonazol, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., endemik dimorfik mantarlar ve dermatofitlere etkiliyken; *Aspergillus*, *Fusarium* türleriyle, mukormikoz etkeni küflere karşı etkisizdir.<sup>14,28</sup>

Flukonazol; mukozal ve invazif kandidozlar, kriptokok menenjit ve koksidiyoidomikoz tedavilerinde kullanılabilir. İnvaziv kandidozun yüksek olarak görüldüğü bölümlerde (özellikle yoğun bakım ünitelerinde), seçilmiş yüksek riskli hastalarda profilaktik kullanımı da önerilmektedir.<sup>29,30</sup> Seçilmiş hasta gruplarında flukonazol profilaksisinin, invazif fungal enfeksiyon gelişimini ve mortaliteyi anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir.<sup>27</sup>

İlaç etkileşimi diğer triazolere göre daha azdır.<sup>31</sup> En az yan etkiye sahip azol grubu ilaçtır. İyi tolere edilebilen bir ilaçtır. En sık görülen yan etkileri; baş ağrısı, iştahsızlık, alopesi ve transaminaz yüksekliği, nadiren döküntüdür. Çocuklarda ise; en sık gastrointestinal yan etki, döküntü ve transaminaz

yüksekliği görülebilir. Ancak transaminaz yüksekliği doz bağımlı değildir ve tipik olarak tedavinin kesilmesiyle normale döner.<sup>22,29</sup>

### 2.1.2.3. İtrakonazol

Lipofilik bir triazol olan itrakonazol, 1992 yılında piyasaya çıkmıştır.<sup>25</sup> Flukonazolden daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Ancak, yan etkileri ve ilaç etkileşimleri de flukonazolden daha fazladır. Lipofilik özelliğinden dolayı BOS'a geçişi zayıftır. Karaciğerden elimine edilmektedir.

Oral solüsyon, kapsül ve intravenöz formları vardır. Oral emilim için asidik ortama ihtiyacı vardır. Antiasitler, proton pompa inhibitörleri emilimini azaltmaktadır. Bu nedenle itrakonazol kapsüllerinin, yiyeceklerle ya da asitli sıvılarla alınması önerilmektedir.<sup>14,22</sup>

İtrakonazol, *Aspergillus* türlerine karşı üretilen ilk oral formda ilaçtır.<sup>15</sup> *Candida* ve *Aspergillus* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudoallescheria boydii*, *Sporothrix schenkii*, endemik dimorfik mantarlar ve dermatofitlere etkiliyken; *Fusarium* türleriyle, mukormikoz etkeni küflere karşı etkisizdir.<sup>14</sup>

En sık görülen yan etkileri: bulantı, kusma, hipokalemi, ödem, hipertriglisemi, transaminaz yüksekliği, baş ağrısı ve döküntüdür. Kardiyak yan etkileri de bildirilmiştir.<sup>19,22,31</sup>

#### 2.1.2.4. Vorikonazol

Vorikonazol, 2002 yılında piyasaya çıkmıştır.<sup>12</sup> Flukonazolün sentetik bir türevidir. Düşük molekül ağırlıklı, suda çözünen, geniş spektrumlu ikinci jenerasyon bir triazoldür.<sup>22</sup> Oral ve intravenöz kullanılabilir. İlacın, BOS dahil tüm dokulara dağılımı oldukça iyidir. Karaciğerde metabolize edilmektedir. İdrarla atılmaktadır.<sup>19</sup> İlacın yarılanma ömrü, diğer triazollere göre daha kısadır.<sup>32</sup>

*Candida* ve *Aspergillus* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Pseudoallescheria boydii*, *Trichosporon* spp., endemik dimorfik mantarlara ve *Fusarium* türlerine etkilidir. *Mucormycetes*'lere karşı ise etkisizdir. Mayalara karşı fungistatik, *Aspergillus* türlerine karşı ise fungisidal etkilidir. İnvaziv aspergilloz tedavisinde primer ilaç olarak onay almıştır.<sup>14</sup> *Candida* türleri içinde, vorikonazol direnci en çok *C. glabrata*'da görülmektedir.<sup>33</sup>

İlacın profilaktik kullanımı bulunmamaktadır. Flukonazole göre, çok sayıda ilaçla etkileşimi ve daha fazla yan etkisi vardır.<sup>15</sup> En sık görülen yan etkisi geçici görme bozukluğudur. Görme bozukluğu infüzyonla ilişkili ve geri dönüşümlüdür. Tipik olarak infüzyondan 30 dakika sonra başlar, başladıktan 30 dakika sonra da azalır. Diğer yan etkileri arasında transaminazlarda yükseklik, döküntü, halüsinasyon ve konfüzyon vardır.<sup>19,22</sup>

### 2.1.2.5. Posakonazol

Posakonazol, itrakonazolün hidroksillenmiş derivativesidir. 2007 yılında lisans alan posakonazol, azol grubu ilaçlar içinde en geniş antifungal etki spektrumuna sahip, ikinci jenerasyon, lipofilik yapıda, bir triazoldür. Sadece oral formu bulunmaktadır. Proteinlere bağlanma oranı çok yüksektir. En fazla feçesle atılmaktadır.

Posakonazolün etki spektrumu vorikonazole benzerdir. Tek farkı, *Mucormycetes* 'lere de etkinliği olmasıdır. Bu gruba etkili tek azoldür. Ancak bu etkinliği, amfoterisin B kadar fazla değildir.<sup>32,34,24</sup>

Posakonazol, diğer antifungal ilaçları tolere edemeyen ya da diğer ilaçlarla tedaviye refrakter mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ve invazif mantar enfeksiyonlarının profilaksisinde kullanılmaktadır.<sup>32</sup>

Posakonazolün, itrakonazol ve vorikonazole oranla daha az ilaç etkileşimi bulunmaktadır. En sık görülen yan etkileri: bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare ve baş ağrısıdır.<sup>28,34</sup>

### 2.1.3. Ekinokandinler

2000'li yıllarda keşfedilmiş antifungal ilaçlardır. Mantar hücre duvarındaki 1,3-β-D-glukanı nonkompetitif inhibe ederek etki eden, semisentetik lipopeptid yapıda antifungal ilaçlardır. Sonuçta glukan sentezinin inhibisyonuyla, hücre duvar bütünlüğü, hücre morfolojisi bozulur ve hücre ölür. Memeli hücrelerinde,



1,3- $\beta$ -D-glukan bulunmadığından, mantarlar için selektif ilaçlardır. Bu yüzden de yan etkileri açısından güvenilir ilaçlardır.<sup>12,14,19</sup>

*Candida* türleri için fungisidal, *Aspergillus* türleri için ise fungistatik etki gösterirler. Özellikle flukonazole dirençli *Candida* türlerinin tedavisinde çok etkilidirler. *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon*, *Fusarium* türleriyle, mukormikoz etkeni mantarlara karşı ise etkili değildirler.<sup>12,14,19</sup> *Cryptococcus neoformans*, hücre duvarında  $\alpha$  glukan içerdiğinden dolayı ekinokandinlere dirençlidir.<sup>35</sup> *Candida* türleri içinde özellikle *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'de yüksek MİK değerleri görülebilmektedir.<sup>36</sup>

Ekinokandinlerin, diğer antifungallerden önemli bir farkları *Candida* biyofilmlerine olan etkileridir. Kandidemilerin önemli bir nedeni, biyofilmle enfekte kateterlerdir. Biyofilmler, dışa atım pompa mekanizmalarındaki değişimler ve azalan sterol sentezine bağlı olarak, genellikle antifungallerle tedaviye refrakterdirler. Ekinokandinlerle yapılan in vitro biyofilm çalışmalarında, özellikle *C. albicans*'da fungisidal etkinlikleri izlenmiş, *C.parapsilosis* için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kaspofunginin, ayrıca biyofilm oluşmasını erken dönemde inhibe ederek, *C. albicans*'ın epitel hücrelerine yapışmasını engelleme özelliği de bulunmaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında, kaspofungin kullanımının *Candida* biyofilm ile enfekte santral venöz kateterli farelerde, disemine enfeksiyon insidansını azalttığını göstermektedir. Mikafungin ve anidulafungin de biyofilmler üzerine etkin bulunmuştur.<sup>35,37</sup>

Ekinokandinlerin oral biyoyararlanımları çok zayıf olduğundan, sadece intravenöz kullanımları bulunmaktadır. Proteinlere bağlanma oranları çok yüksektir. Vitreusa ve BOS'a geçişi çok azdır.

Yan etkileri diğer antifungallerle karşılaştırıldıklarında çok azdır. Ancak hızlı verildiklerinde infüzyona bağlı reaksiyonlar (taşikardi, hipotansiyon, tromboflebit) görülebilir. Bu nedenle, infüzyonun 1 saat boyunca yapılması önerilmektedir.<sup>19,22,38</sup>

Şu ana kadar 3 ekinokandin klinik kullanım için onay almıştır: kaspofungin (2001 yılında erişkinler için, 2008 yılında 3 aydan büyük çocuklar için FDA onayı almıştır), mikafungin (2005 yılında FDA onayı almıştır) ve anidulafungin (2006 yılında FDA onayı almıştır). Etki spektrumları üçünün de benzerdir. İyi tolere edilirler ve ilaç etkileşimleri de çok azdır.<sup>8,37</sup>

İlk bulunan ekinokandin silofungindir; ancak sistemik kullanımında ciddi yan etkileri olması sebebiyle kullanılamamıştır.<sup>15</sup>

Kaspofungin, ekinokandin grubundan ilk kullanıma giren ilaçtır. Kandidemi, invazif kandidoz, özofageal kandidoz ve diğer antifungal tedavilere cevap vermeyen ya da o tedavileri tolere edemeyen invazif aspergillozlu hastaların tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>14,19</sup> Ayrıca, çocuklarda kullanımı FDA onayı almış tek ekinokandindir.<sup>39</sup> Siklosporinle kullanıldığında karaciğer enzimlerinde artışa neden oldukları için, siklosporinle birlikte kullanımı önerilmemektedir. Ayrıca rifampin ve takrolimusla kullanıldığında da doz ayarlanması gerekmektedir.<sup>19</sup>

Mikafungin ve anidulafungin, yeni ekinokandinlerdir. İkisinin de ilaç etkileşimleri çok azdır. Özofagus kandidozu ve kandidemi tedavilerinde kullanılırlar. Mikafungin ek olarak, invazif kandidozun önlenmesi için profilakside de kullanılmaktadır.<sup>14,40</sup>

İnvaziv kandidozlu hasta gruplarında yapılan çalışmalarda, ekinokandinler diğer antifungallerle (amfoterisin B, flukonazol) ve birbirleriyle (kaspofungin-mikafungin) karşılaştırılmıştır. Etkinlikleri benzer bulunmuş; ancak ekinokandinlerin diğer antifungallere göre yan etki ve ilaç etkileşimlerinin daha az olduğu görülmüştür. Pahalı ilaçlar olmalarına rağmen; mevcut literatüre dayanarak, ekinokandinler ile tedavi, ilaca bağlı etkilerinin az olması nedeniyle, polyenler ve azollerle karşılaştırıldığında maliyet etkin bulunmaktadır.<sup>36,41</sup>

#### **2.1.4. Yeni antifungal ilaçlar**

Yeni antifungal ilaç geliştirilmesi çalışmalarında; bu ilaçların daha geniş spektrumlu olmasına, tıbbi önemi olan, nadir görülen türlere de etkili olmasına, mevcut ilaçlara dirençli türlere de etkili olmasına, fungisidal etkili olmasına, daha az toksik olmasına, ilaç-ilaç etkileşimlerinin az olmasına, daha gelişmiş farmakokinetik özellikleriyle doz sıklığının azalmasına, oral ve parenteral kullanım olasılığına dikkat edilir.<sup>14,42</sup>

Bir çok antifungal ilaç ya da madde henüz araştırma aşamasındadır;

Yeni polyen: Lipozomal nistatin

Yeni azoller: Ravukonazol, albakonazol, isavukonazol, pramikonazol

Yeni ekinokandinler: Aminokandin

Enfumafungin deriveleri: Ekinokandinler gibi 1,3- $\beta$ -D-glukanı inhibe eder.

Ancak yapısal olarak ekinokandinlerden farklıdır, oral kullanılabilir ve ekinokandin dirençli suşlara etkilidir.

Nikkomisin Z: Mantar hücre duvarındaki kitin sentezini inhibe eder.

Kitin sentez inhibitörü bileşikler: Berberubin derivesi (bir alkaloid türevi), dikafein tipi bileşikler

Sordarin/Azasordarin: Mantar hücresindeki elongasyon faktör 2 üzerine etkileriyle protein sentezini inhibe ederler.

Antifungal özellikte bazı maddeler: Çeşitli antimikrobiyal peptidler, Guanidin deriveleri, Piridin deriveleri, kinolinyum bileşikleri...<sup>14,19,42,43</sup>

## **2.2. *Candida*'da Antifungal İlaçlara Direnç**

Antifungal direnç; mikrobiyolojik direnç, klinik direnç ya da hem mikrobiyolojik hem de klinik direncin olduğu ortak bir direnç şeklinde görülebilir.

Mikrobiyolojik direnç, ilacın minimum inhibitör konsantrasyonundaki artıştır. İn vitro olarak etkenin ilaca karşı duyarlılığının azalması ya da olmamasıdır.<sup>9,44</sup> Mikrobiyolojik direnç, primer (intrinsik) veya sekonder (kazanılmış) olabilir. Primer dirençte, etken ilaçla in vivo ya da in vitro daha önce

karşılaşmamış olmasına rağmen ilaca dirençli saptanır. Klinik örneklerde, tür tanımlaması yapılması bu yüzden çok önemlidir. Sekonder dirençte ise, etken bir antifungal ilaçla karşılaşmıştır, sonuçta geri dönüşümlü olarak bu ilaca geçici adaptasyon geliştirebilir ya da genetik değişiklikler sonucu ilaca direnç kazanır.<sup>45,46</sup> Mikrobiyolojik (in vitro) direnç, doza bağımlı (klinik olarak antifungal ilacın yüksek dozlarıyla aşılabilir) ya da inokulum miktarına (test edilen mantarın inokulum miktarını arttırınca in vitro etkinliği değişir) bağımlı da olabilir.<sup>47</sup>

Klinik direnç, uygun antifungal tedavinin uygulanmasına rağmen görülen tedavi başarısızlığıdır. Klinik direnç, her zaman mikrobiyolojik dirençle beraber olmaz.<sup>9,44,48</sup> Klinik dirençte pek çok faktör etkili olabilir. Konağın bağışıklık durumu, enfeksiyonun yeri, ilacın enfeksiyon bölgesindeki etkinliği, enfeksiyonun şiddeti, yabancı cisim varlığı, tedavi dozu ve süresi bu faktörlerden bazılarıdır.<sup>14</sup>

Bakterilerden farklı olarak, antifungal direnç genleri plazmid ya da transpozonlar aracılığıyla hücreden hücreye aktarılmazlar. Antifungal direnç genellikle yavaş gelişmektedir.<sup>44,46</sup>

Antifungal direnç mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar, en sık görülen fungal enfeksiyon etkeni olan *Candida* türleriyle, özellikle de *Candida albicans*'la yapılmıştır. Moleküler direnç mekanizmaları da, en sık etkenler olan *Candida*, *Aspergillus* ve *Cryptococcus neoformans* için çalışılmıştır. Diğer mantarlara ait bilgiler ise çok azdır.

Antifungal ilaçların etki mekanizmaları birbirinden farklı olduğu için, ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları da her ilaç grubu için birbirinden farklıdır.<sup>14,49</sup>

### 2.2.1. Polyenlere Direnç

Polyenler, en eski antifungal ilaç grubu olmalarına rağmen, polyenlere karşı direnç oldukça nadir görülmektedir.<sup>50</sup>

Amfoterisin B'ye karşı, *Candida lusitaniae*, *Aspergillus terreus*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* ve *Scedosporium* türlerinde primer direnç görülebilmektedir. *Candida glabrata*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* de ise yüksek MİK değerleri görülmektedir. *Candida* türlerinde ve *Cryptococcus neoformans*'ta sekonder direnç de bildirilmiştir.<sup>14,46,51</sup>

Polyen dirençli *Candida* ve *Cryptococcus* izolatlarının, polyen duyarlı izolat ile karşılaştırıldığında nispeten düşük ergosterol içeriği olduğu görülmüştür. Ergosterol sentezinde yer alan ERG3 genindeki kusurlara bağlı olarak, membranda farklı sterollerin biriktiği bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda ayrıca ERG2, ERG6, ERG11 genlerinde de mutasyonlar gösterilmiştir. Ayrıca, amfoterisin B direncinde, artan katalaz aktivitesinin aracılığıyla, oksidatif hasara karşı hassasiyetin azalmasının da rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>9,46,50</sup>

### 2.2.2. Azollere direnç

Azol grubu ilaçlar sık kullanıldıklarından, direnç gelişimi oldukça önemlidir. Azol grubu ilaçlara direncin artmasının; klinikte uzun süreli tedavilerde ve profilakside kullanılmalarına ve tarımsal pestisit olarak azol fungusidlerin kullanılmalarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.<sup>52</sup>

Azol direnci *Candida* türlerinde dört temel mekanizmayla gerçekleşmektedir<sup>9,12,14,46,49,52,53</sup>:

1. İlaç konsantrasyonunda azalma: Aktif dışa atım pompaları ile olmaktadır. *Candida* türlerinde dışa atım pompaları, 2 gen ailesi tarafından kodlanmaktadır: CDR (ATP-binding cassette super family) ve MDR (major facilitators class). Bu genlerin aşırı çalışması (up-regulation), azollerin hücre dışına aktif atılmasına neden olur, dolayısıyla hücre içindeki ilaç konsantrasyonu düşer. CDR (CDR1,CDR2) genlerinin aşırı çalışması, çoklu azol direnci sebebiyken; MDR (MDR1)'deki değişiklik, sadece flukonazol direncine neden olmaktadır.
2. İlacın hedef bölgesinde değişiklik: İlacın hedef enzimi olan lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaz (CYP51) enzimi, ERG11 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gendeki nokta mutasyonlar sonucu, azoller hedef bölgelerine düşük afinite gösterirler ya da hiç bağlanamazlar.
3. İlacın hedefindeki enzimde değişiklik: ERG11 genindeki amplifikasyon ve ekspresyonun artması sonucu, aşırı miktarda enzim

oluşur. Sonuçta, ilacın terapötik dozları aşırı miktardaki enzimi inhibe etmeye yeterli olmaz.

4. Ergosterol biyosentez yolunda değişiklik: Azollerin fungistatik, yani büyümei inhibe edici etkisi; ilacın membrandaki ergosterole etkisinden sonra, toksik ürün olan 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol birikimine bağlıdır. Ancak ERG3 genindeki mutasyonlar sonucu, bu toksik ürün değişir, 14 $\alpha$ -metilfekosterol birikir. Membran fonksiyonel olur, azoller kullanılsa da artık etki edemezler. ERG3 mutasyonunda, polyenlere de direnç olmaktadır.

### 2.2.3. Ekinokandinlere direnç

*Candida* türlerinde, ekinokandin direnci nadir görülmektedir. Ekinokandin dirençli *Candida* türleri incelendiğinde, 1,3- $\beta$ -D-glukan sentezinde önemli bir gen olan FKS1’de nokta mutasyonları saptanmıştır. Ekinokandinlere karşı sekonder dirençte temel mekanizma, FKS1 genindeki aminoasitlerin yer değiştirmeleridir. *C. glabrata*’daki ekinokandin direncinde ise, FKS2 genindeki mutasyonların da rol aldığı görülmüştür.<sup>9,37,49,50</sup>

FKS mutasyonları intrinsik ya da kazanılmış olabilir. Ekinokandinler için yüksek MİK değerleri gösteren *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*’de intrinsik FKS mutasyonları saptanmıştır.<sup>49</sup>



#### 2.2.4. Çoklu ilaca direnç (ÇİD)

Farklı gruplardaki ilaçlara direnç gelişmesi, çoklu ilaç direnci (ÇİD) olarak adlandırılmaktadır. Çoklu ilaca direncin ortaya çıkması, antifungal tedavide önemli bir engel oluşturmaktadır. Çok faktörlü, birçok direnç mekanizmasını beraber içeren bir durum olması, klinisyenleri çözüm bulmakta zorlamaktadır.<sup>54</sup>

Bir izolatta, farklı direnç mekanizmalarının aynı anda bulunmasına bağlı olarak çoklu ilaç direnci gelişebilmektedir. Özellikle literatürde, bu konuda olgu sunumları bulunmaktadır. Örneğin, *C. glabrata*'da FKS2'de nokta mutasyonuna bağlı ekinokandin direnciyle, CDR1 ve CDR2'nin aşırı çalışmasına bağlı azol direncinin birarada bulunduğu olgular mevcuttur.<sup>9,55</sup>

Çeşitli mutasyonlara bağlı, çoklu ilaç direnci ortaya çıkabilmektedir. Örneğin; ERG3 mutasyonu olduğunda, membrandaki ergosterol yokluğuna bağlı olarak, azollerle aynı zamanda polyenlere de direnç olmaktadır.<sup>46,48</sup>

Çoklu ilaç direncinde, dışa atım pompaları da önemli bir nedendir. İki önemli dışa atım pompa ailesi bulunmaktadır: ATP bağlayan kaset ailesi (ABC-ATP binding cassette family) ve major kolaylaştırıcı süper ailesi (MFS-major facilitator superfamily).<sup>54</sup> ABC içinde, *Candida albicans*'ta TAC1 (transcriptional activator of CDR genes) tarafından düzenlenen CDR (*Candida* drug resistance) 1 ve 2; MFS içinde ise Mrr1 (multidrug resistance regulator) tarafından düzenlenen MDR1 (multidrug resistance) ve ayrıca FLU1 (fluconazole resistance) genlerinin aşırı çalışması dirençte görev almaktadır. Bu dışa atım pompaları özellikle azol grubu ilaçlarda dirençten sorumlu bulunmuşlardır. Ancak CDR1 ve CDR2 azol

grubu dışında, topikal antifungallerden terbinafin ve amorolfin direncinde de etkilidirler. Kaspofungin direncindeki rolleri ise tartışmalıdır.<sup>56,57,58</sup>

### 2.3. *Candida*'da Antifungal Duyarlılık Testleri

Antifungal ilaçların duyarlılık düzeylerini saptamak için, in vitro minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ölçülmekte, böylece klinik yanıt öngörülebilmektedir. Ancak her zaman klinik yanıtla, in vitro duyarlılık uyumlu olmayabilir. “90-60 kuralı”na göre; etken in vitro duyarlı bulunmuşsa, tedaviye %90 yanıt alınacakken, in vitro dirençli ise de tedaviye %60 yanıt alınacaktır.<sup>59,60</sup>

Antifungal duyarlılık testleri uygulanmadan önce tür tanımı yapılması çok önemlidir, intrinsik dirençli türler saptandığında tedavi ona göre belirlenecektir.

Rutin olarak antifungal duyarlılık testinin klinik bir *Candida* izolatına yapılması için; steril bir vücut bölgesinden izole edilmiş olması, invazif bir enfeksiyonun olması, beklenmedik bir tedavi başarısızlığı varlığı, tedavi sonrası geliştiği düşünülen sekonder direncin varlığı ya da *Candida glabrata* gibi en az bir antifungale dirençli bir türün izole edilmiş olması gerekmektedir.<sup>59</sup>

Antifungal duyarlılık testleri için kullanılan birçok yöntem vardır. Ancak, farklı teknik faktörlere (inokulum konsantrasyonu, besiyerinin içeriği, şekli ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi) bağlı sonuçlar değişkenlik gösterebilir. Bu yüzden standardize edilmeleri gerekir. 2 uluslararası kuruluş, duyarlılık testlerinin standardizasyonu için çalışmaktadır: Amerika Birleşik Devletleri

kökenli “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” ve Avrupa kökenli “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)”<sup>61</sup>

Son yıllarda sınır değerlerin standardizasyonunda, epidemiyolojik “cut off” değeri (ECOFF) ve “türe özgü klinik sınır değer” terimleri geliştirilmiştir. Vahşi tip köken (Wild Type–WT), kazanılmış ya da mutasyonel direnç mekanizmalarından hiçbirinin olmadığı izolatdır. Vahşi olmayan kökende (Non Wild Type-NWT) ise, antimikrobilyale karşı kazanılmış direnç vardır. Epidemiyolojik “cut off” değeri, vahşi tip popülasyonun üst sınırı olarak tanımlanmaktadır. Yani, ECOFF’un altında kalan MİK değerleri, vahşi tip izolatları göstermektedir.<sup>62</sup>

Antifungal duyarlılık testlerinde kullanılan yöntemler: sıvı makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri, agar dilüsyon, disk difüzyon ve E-test yöntemleridir.<sup>59</sup>

### **2.3.1. Sıvı Dilüsyon Testleri**

Sıvı makrodilüsyon yöntemi, tüplerde çalışılmakta, daha fazla malzeme ve zaman gerektirmektedir. Bu yüzden ancak örnek sayısı az olan küçük laboratuvarlar için uygun olabilir. Günümüzde pek tercih edilmemektedir.<sup>59</sup>

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, en çok kullanılan yöntemdir. CLSI ve EUCAST aynı yöntemi önermektedirler, ama aralarında hem yöntemin yapılışı bakımından hem de kabul edilen sınır değerleri bakımından bazı farklılıklar (Tablo 1 ve 2’de sunulmaktadır) bulunmaktadır.

Kalite kontrolü için, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 veya *Candida parapsilosis* ATCC 22019 gibi referans kökenlerden biri kullanılmalıdır.

MİK değerlendirilirken; amfoterisin B için üremenin olmadığı ilk kuyucuk (MİK 0) kabul edilirken, azoller ve flusitozin içinse kontrol kuyucuğuna göre üremede %50 azalma olan kuyucuk (MİK 2) kabul edilmektedir.<sup>59</sup>

**Tablo 1.** Sıvı mikrodilüsyon yönteminin CLSI ve EUCAST'a göre karşılaştırılması <sup>59,61,63</sup>

Standardize Yöntem	CLSI	EUCAST
	Mayalar (M27-A3) Küfler (M38-A2)	Mayalar (EDef.7.2) Küfler (EDef.9.1)
Besiyeri	L-glutaminli, bikarbonatsız, MOPS ile tamponlanmış, %0.2 glukoz eklenmiş RPMI 1640 besiyeri	L-glutaminli, bikarbonatsız, MOPS ile tamponlanmış, % 2 glukoz eklenmiş RPMI 1640 besiyeri
Plaklar	96 kuyucuklu U tabanlı	96 kuyucuklu düz tabanlı
İnokulum yoğunluğu	0.5-2.5x10 <sup>3</sup> cfu/ml	1-5x10 <sup>5</sup> cfu/ml
Sıcaklık	35°C	35-37°C
İnkübasyon süresi	24-48 saat	24-48 saat
Okuma yöntemi	Görsel	Spektrofotometrik (530 nm)

**Tablo 2.** CLSI ve EUCAST'a göre *Candida albicans* için MİK sınır değerleri <sup>64</sup>

	CLSI				EUCAST		
	Duyarlı	Doza bağımlı duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Amfoterisin B	Belirli değil				≤1	-	>1
Flukonazol	≤2	4	-	≥8	≤2	4	>4
İtrakonazol	≤0.12	0.25-0.50		≥1	Belirli değil		
Vorikonazol	≤0.12	-	0.25-0.50	≥1	≤0.125	-	>0.125
Posakonazol	Belirli değil				≤0.06	-	>0.06
Kaspofungin	≤0.25	-	0.50	≥1	Belirli değil		
Mikafungin	≤0.25	-	0.50	≥1	Belirli değil		
Anidulafungin	≤0.25	-	0.50	≥1	≤0.03	-	>0.03

Son yıllarda kaspofungin ile yapılan çalışmalarda, MİK değerlerinde sorunlar gözlemlendiği için, kaspofungin rutin antifungal duyarlılığının çalışılmasının yanlış olacağı, kaspofungin yerine diğer ekinokandinlerin (mikafungin, anidulafungin) çalışılmasının daha uygun olacağı önerilmektedir. <sup>65</sup>

Kolorimetrik değerlendirme yapan, MİK değerlerinin belirlenmesinde görsel kolaylık sağlayan ticari sistemlerde bulunmaktadır. <sup>63,66</sup>

### 2.3.2. Disk difüzyon testi

Bakteriler için rutin laboratuvarında en çok kullanılan yöntem olan disk difüzyon yöntemi, mantarlar için çok tercih edilmemektedir. Mayalar, inhibisyon zonu içinde de üreyebildiklerinden değerlendirmek zordur. Besiyeri olarak, %2 dekstroz ve 0.5µg metilen mavisi eklenmiş Müller Hinton agar önerilmektedir. 0.5 McFarland bulanıklıkta inokulum hazırlanmalı, sonuçlar 24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmelidir. Zon çapları değerlendirilirken, üremenin belirgin azaldığı noktadan itibaren çaplar ölçülmeli ve zon içinde bulunan mikrokoloniler dikkate alınmamalıdır.<sup>59,61</sup>

### 2.3.3. E-test yöntemi

E-test; kolay uygulanması, tekrarlanabilirliğinin kolay olması ve MİK değeri vermesi nedeniyle önemli bir yöntemdir. Hem mayalar hem de küfler için kullanılabilir. Besiyeri olarak, %2 glukoz eklenmiş RPMI agar önerilmektedir. 0.5 McFarland bulanıklıkta inokulum hazırlanmalı, sonuçlar 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmelidir. MİK değerleri okunurken, strip üzerinde inhibisyon elipsinin olduğu ilk temas noktası MİK olarak değerlendirilmeli ve zon içindeki mikrokoloniler dikkate alınmamalıdır.<sup>59,61,67</sup>

Yapılan bir çalışmada, E-test ve referans yöntem karşılaştırıldığında en az uyum özellikle *C.glabrata* ve *C.tropicalis*'te bulunmuştur. E-testin, *C. glabrata* için 48 saate kıyasla 24 saatte daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.<sup>61</sup>

### 2.3.4. Kullanılan diğer yöntemler

Agar dilüsyon yöntemi: Çeşitli miktarlarda ilaç içeren besiyerleri hazırlanarak uygulanmaktadırlar. Küfler için daha uygundur. Standardizasyonu zordur.<sup>59</sup>

Otomatize sistemler: VITEK 2 sistemi, tür tanımı ve antifungal duyarlılık sonucu vermektedir.<sup>61,68</sup>

Akım (Flow) sitometrisi: Antifungal ilaçla karşılaşan hücrenin canlılığı, DNA'ya bağlanan boyalarla ölçülmektedir. Florasan mikroskopla değerlendirilir. 4 saat gibi kısa bir sürede sonuç verir, ama pahalı bir yöntemdir.<sup>59,63</sup>

Hücre duvarındaki ergosterol miktarının ölçülmesi: Özellikle azol grubu ilaçların etkinliği araştırılır.<sup>61</sup>

MALDI-TOF MS: Yeni geliştirilen hızlı ve basit bir yöntemdir. 3 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir. Şu an için *Candida albicans*'ta kullanılmaktadır.<sup>63</sup>

Moleküler yöntemler: Son yıllarda, direncin gösterilmesinde moleküler yöntemler (DNA dizi analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), mikroarray teknolojisi) kullanılmaktadır. Böylece, direnç ile ilgili genler ve mutasyonları ortaya konmaktadır. Örneğin, PZR ile atım pompası genleri olan CDR ve MDR genleri gösterilebilmektedir.<sup>59</sup>

### **2.3.5. İlaç Etkileşimlerinde Kullanılan Testler (İn vitro Sinerji Testleri)**

Fungal enfeksiyonların tedavisinde, antifungal ilaçların çeşitli kombinasyonları da kullanılmaktadır. Ayrıca antifungal ilaçların, farklı ilaç gruplarıyla ya da antimikrobiyal maddelerle de etkileşimleri söz konusudur. İlaçların birarada test edilmelerini sağlayan kombinasyon testleri: zamana karşı öldürme (“Time-kill”) yöntemi, dama tahtası (checkerboard) yöntemi ve E-test sinerji testidir.<sup>69</sup>

Sinerjistik etkileşimi araştıran testler henüz standardize edilmemiştir. İn vitro antifungal kombinasyon testlerinin sonuçları, kullanılan yöntem ve analiz türüne bağlıdır. Farklı yöntem veya analiz türü kullanıldığında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Klinikle uyumları tam belirlenememiştir. Bu yüzden yöntemlerin değerlendirilmesi zordur.<sup>59,61,70</sup>

#### **2.3.5.1. Zamana bağlı öldürme (Time-kill) yöntemi**

Zamana bağlı öldürme yöntemi antifungal ilaçların, konsantrasyona ve zamana bağlı fungisidal aktivitelerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemle, antifungal ilaçların, hangi konsantrasyonda ve kaçınıcı saatte mantara karşı fungisidal aktivite gösterdikleri belirlenmektedir. Dolayısıyla, zamana bağlı öldürme yönteminde, mantar ile antifungal ilaç arasındaki dinamik ilişki tespit edilmektedir. Ayrıca, antifungal ilacın farmakodinamik özellikleri, diğer antifungal ilaçlar ile olan sinerjistik veya antagonistik etkileşimi de



incelenebilmektedir. Ancak, zaman alıcı, uygulaması zor ve sınırlı sayıda ilaçla çalışılabilen bir yöntemdir.<sup>71,72,73,74</sup>

Zamana bağlı öldürme yöntemi, henüz standardize edilmemiştir. Standart bir inokulum hazırlanır, farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren sıvı besiyerine eklenir. Kontrol amacıyla, bir de ilaç içermeyen besiyerine konur. İnokulasyonun başlangıç zamanında ve sonra belirlenen farklı saatlerde besiyerlerinden seri dilüsyonlar yapılarak, koloni sayımları yapılır. Kontrol ve farklı ilaç konsantrasyonlarının sonuçları, zamana karşı belirlenir. Üreme kontrolüne göre,  $3\text{-log}_{10}$  CFU/ml azalma olduğunda, yeterli fungisidal aktivite kabul edilmektedir. Sinerji değerlendirirken ise, en etkili maddeye göre kombinasyonla  $\geq 2\text{-log}_{10}$  CFU/ml azalma olması sinerji olarak kabul edilir.<sup>71,75,76</sup>

### **2.3.5.2. Dama tahtası (Checkerboard) yöntemi**

Dama tahtası yöntemi; iki boyutlu, iki ajanlı bir sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Referans mikrodilüsyon yöntemini temel almaktadır. İn vitro olarak ilaçların kombinasyonun aktivitesinin, ilaçların tek başlarına aktivitelerine göre nasıl olduğu değerlendirilir. Etkileşimler isobolografik olarak da gösterilebilmektedir.<sup>77</sup>

Dama tahtası yöntemi, uygulaması daha kolay ve laboratuvarlar arasında standardize olan mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı bir yöntem olduğundan, ilaç etkileşimlerinin araştırılmasında en sık kullanılan yöntemdir.<sup>70</sup>

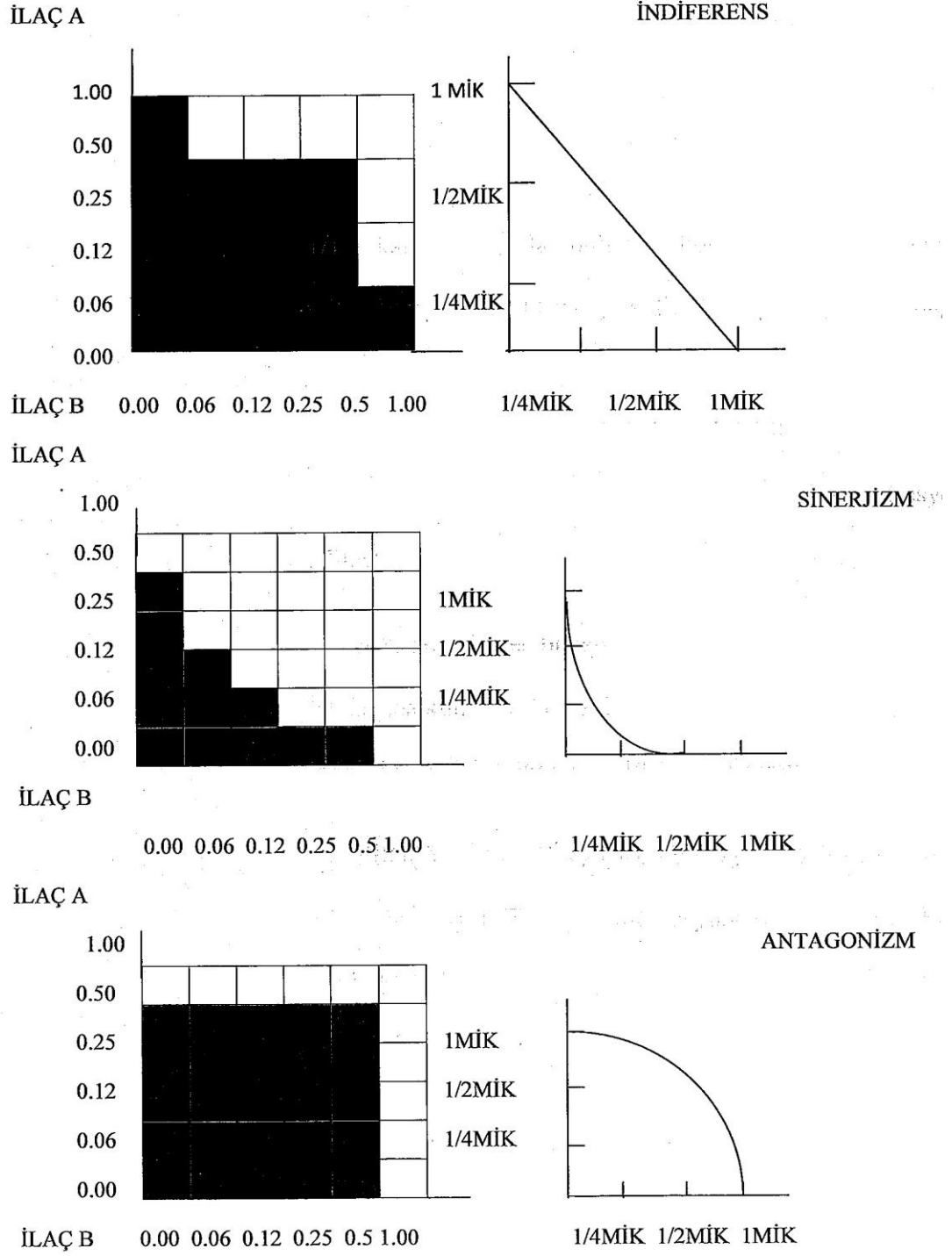
Sinerji, ajanların birarada kullanıldıklarında elde edilen etkinin tek başına kullanıldıklarından daha fazla olması iken; antagonizma, birarada kullanıldıklarında elde edilen etkinin tek başına kullanıldıklarından daha düşük etkili olmasıdır. Ancak etkileşime bağlı bir değişiklik yoksa, yani ajanlar tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamına eşitse, bu durumda farklı terimler kullanılmaktadır. İndiferens, aditif, tanımlanamayan ya da etkisiz kullanılan bazı terimlerdir.<sup>73</sup>

İlaçların kombinasyonlarının çalışılmasından önce, her ilacın MİK değeri saptanır. Kombinasyon testi için, saptanmış MİK değerinin 4-8 katı ile en az 1/8-1/16 katı aralığında bulunan konsantrasyonlar konulmalıdır. 96-kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarına, antimikrobiyal ajanlar dağıtılır, 0.5 McFarland bulanıklık standardında maya inokulumu eklenir. İnkübasyon sonrası, MİK'ler belirlenir. Her ajan için fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) hesaplanır. Sonuçta iki ajan için "fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FİKİ)" elde edilir.<sup>77,78</sup>

FİK değeri, her bir ajanın kombinasyonda kullanıldığı zamandaki MİK'inin tek başına kullanıldığındaki MİK değerine bölünmesi ile elde edilen değerdir. FİK indeksi (FİKİ) ise, iki ajanın FİK değerlerinin toplanmasıyla elde edilen değerdir.

$$FİKİ (\sum FİK) = FİK_A \text{ (Kombinasyondaki ilaç A'nın MİK'i / Tek başına ilaç A'nın MİK'i)} + FİK_B \text{ (Kombinasyondaki ilaç B'nin MİK'i / Tek başına ilaç B'nin MİK'i)}$$

$FİKİ \leq 0.5$  ise sinerjizm,  $0.5 - 4$  arasında ise indiferens (etkileşim yok, tanımlanamayan),  $> 4$  ise antagonizm olarak değerlendirilir.<sup>78,79,80,81,82,83</sup>



**Şekil 1.** Dama tahtalarının isoblogramlarla gösterilmesi <sup>77</sup>

## 2.4. Biyosidler

Biyosidler, mikroorganizmaları inaktive eden, geniş spektrumlu kimyasal ajanların genel adıdır. Antiseptide, dezenfeksiyonda, temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.<sup>11,84</sup>

Biyosidlerin antibiyotiklerden farklı olarak, spesifik bir hedef bölgeleri yoktur, genellikle çok sayıda hedef bölgeleri bulunmaktadır. Birçok farklı mekanizmayla etkinliklerini gösterirler.<sup>85</sup>

Antisepsi ve dezenfeksiyonda kullanılan biyosidler:

- 1- Alkoller: Etanol, izopropanol
- 2- Aldehitler: Gluteraldehit, formaldehit, benzaldehit, ortofitaldehit
- 3- Biguanidler: Klorheksidin
- 4- Fenoller ve krezoller
- 5- Bifenoller: Triklosan, heksaklorofen
- 6- Kuaterner amonyum bileşikleri: Benzalkonyum klorür, setilpridinyum klorür, benzotonyum klorür
- 7- Asitler: Asetik asit, benzoik asit, sorbik asit
- 8- Alkaliler: Sodyum hidroksit, sodyum karbonat, amonyum hidroksit, kalsiyum oksit
- 9- Halojenler: İyot bileşikleri, klor, kloroform, hipokloritler
- 10- Oksitleyici ajanlar: Hidrojen peroksit, perasetik asit
- 11- Ağır metaller: Civa, gümüş, bakır, çinko, arsenik<sup>86,87,88</sup>

Biyosidler etki mekanizmalarına göre 4 ana kategoride yer alırlar; oksidanlar, katyonik biyosidler, zayıf asitler ve elektrofilik ajanlar. Oksidanlar, radikal aracılı reaksiyon yoluyla organik materyali okside ederler. Katyonik membran aktif biyosidler, membran hasarına yol açarak, hücre lizisine neden olurlar. Zayıf asitler, hücrede uygun pH dengesinin sağlanmasına engel olarak, hücre içi asidifikasyona ve metabolizmanın bozulmasına yol açarlar. Elektrofilik ajanlar ise, hücrel nükleofillerle kovalent reaksiyona girerek, enzimleri inaktive ederler.<sup>87</sup>

Çalışmamızda kullandığımız klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşikleri, katyonik biyosidlerdir. Bakterilerde, mayalarda ve *Acanthamoeba castellanii*'de esas etkilerini membran hasarına yol açarak gösterirler.<sup>89</sup>

#### **2.4.1. Klorheksidin**

Biguanid grubu bir biyosid olan klorheksidin, 1954 yılında kullanıma girmiştir. Antiseptikler içinde en sık kullanılan ajandır. Özellikle el yıkama ürünleri ve oral ürünlerde (özellikle diş hekimliğinde tedavi amacıyla da) sıklıkla kullanılır. Geniş spektrumludur ve etkisi uzun sürelidir. Etkisi pH bağımlıdır, etkinliği en iyi pH 7-8'de görülmektedir. Organik materyal varlığında (kan, pü, mukus gibi) etkinliği azalmaktadır. Suda kolay çözünmediğinden, genellikle diglukonat tuzu, hidroklorit veya asetat formunda kullanılmaktadır. En yaygın olarak % 0.5–4 konsantrasyonlarda suda çözünen glukonat formu kullanılır.<sup>84,88,90</sup>

Klorheksidinin geniş bir etki spektrumu vardır. Bakterisidal bir ajandır. Özellikle Gram pozitif bakterilere karşı daha etkilidir. Mayalara karşı oldukça etkilidir. Virüslere etkinliği sınırlıdır. Zarfsız virüslere, sporlara ve mikobakterilere etkisizdir. *Acanthameoba castellanii* trofozoitlere etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

Bakterilerde, hücre duvarı ve stoplazma zarına etkilidir. Membran aktif bir ajandır. Katyonik bir biguanid olan klorheksidin, negatif yüklü bakteriyel hücre duvarına bağlanır. Hücre duvarı ve dış membranı pasif difüzyonla geçerek, stoplazmik veya iç membrana etki eder. Membran hasarıyla, intraselüler moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olur. Yüksek konsantrasyonlarda, hücre içinde koagülasyona neden olur, proteinler ve nükleik asitler presipite olur.<sup>84,90,91</sup>

Klorheksidin, maya hücrelerinde de bakterilerle benzer şekilde plazma membran hasarına yol açarak etki göstermektedir.<sup>92</sup> Maya hücresindeki negatif yüklü gruplarla reaksiyona girer, hücre duvarı sentezini inhibe eder, hücre içeriği dışarı sızar ve hücre ölümü gerçekleşir. Yüksek konsantrasyonlarda, hücre içinde koagülasyona neden olur. Klorheksidin glukonat, *Candida* türlerine terapötik konsantrasyonlarda fungusidal etkilidir ve önemli ölçüde inorganik (örn. akrilik diş protezlerine) ve organik yüzeylere (örn. bukkal epitelyal hücrelere) yapışmasını önler.<sup>93,94,95,96</sup>

Yapılan çalışmalarda klorheksidinin, *Candida albicans*'ta post antifungal etkiye sahip olduğu, germ tüp oluşumunu ve fosfolipaz üretimini baskıladığı,

hücre yüzey hidrofobitesinde azalmaya yol açtığı, böylece *Candida*'nın patojenitesini baskıladığı belirlenmiştir.<sup>97,98,99</sup>

Klorheksidin maruziyetinde, *Candida* hücrelerinin yapısal bütünlüğünde kayıp, yapışma yeteneğinde azalma ve hücre duvarının parçalandığı görülmüştür. Ayrıca akrilik diş protezlerindeki *Candida albicans* biyofilmlerine karşı, klorheksidin çok etkili bir antifungal ajan olduğu görülmüştür.<sup>100</sup> Yapılan çalışmalarda, klorheksidin *Candida albicans* biyofilmlerine karşı flukonazolden ve diğer bir çok biyosidden daha etkili olduğu bulunmuştur.<sup>101,102</sup>

Klorheksidin klinik kullanım alanları: El dezenfeksiyonu (genel, operasyon öncesi), işlem öncesi cilt dezenfeksiyonu (cerrahi öncesi, damar katateri takılması), damar katateri bakımı, damar katateri enfeksiyonlarının önlenmesi (emdirilmiş katater bölgesi örtüleri, emdirilmiş katater, ventilatör ilişkili pnömoninin önlenmesi için orofarengeal dekolonizasyon), yoğun bakım hasta banyosu, MRSA dekolonizasyonu.<sup>91</sup> Ayrıca diş hekimliğinde, antiseptik gargara ve protez dezenfektanı olarak çok sık kullanılmaktadır.<sup>96,103</sup>

İrritan ve toksik etkileri oldukça azdır. Nadiren dermatit yapabilir. Literatürde olgu sunumları şeklinde hipersensitivite reaksiyonu ve anafilaksi gelişimi, orta kulağa bulaştığında ototoksik etki, gözde korneal hasar bildirilmiştir.<sup>90</sup>

### 2.4.2. Benzalkonyum klorür

Kuaterner amonyum bileşigidir. Nitrojene kovalent bağlanan dört organik gruptan oluşurlar. 1930'lu yıllarda kullanılmaya başlamıştır. Yüzey aktif etkili, katyonik deterjanlardır. Düşük düzey dezenfektanlardır. En iyi etkilerini alkali pH'da gösterirler. Temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Kuaterner amonyum bileşikleri, bakterilere (özellikle Gram pozitif bakterilere etkilidirler, Gram negatif bakterilere etkinlikleri zayıftır), mayalara (*Trichophyton* spp. bu bileşiklere dirençlidir) ve zarflı virüslere etkilidirler. Zarfsız virüslere, mikobakterilere ve sporlara etkisizdirler.<sup>88,104</sup>

Bakteride, stoplazma membranına etkilidirler. Hidrofilik kısımları, membrandaki negatif yüklü gruplarla etkileşime girer; hidrofobik kısımları da, membranın hidrofobik bölümüyle etkileşime girer. Membranın yapısı bozulur. İntraselüler düşük molekül ağırlıklı maddeler hücre dışına çıkar, nükleik asit ve protein degradasyonu olur. Otolitik enzimler tarafından lizis gerçekleşir. Sonuçta, stoplazmik membranın yapı ve bütünlüğünün bozulmasıyla, bakteri hücre hasarı gerçekleşir.<sup>84,105</sup>

Mayalarda, plazma membranına etkilidirler. Membrandaki lipit yapıları hasarlandırarak, sonuçta plazma membranının yapı ve bütünlüğünü bozarlar. Böylece hücre içindeki moleküller dışarı sızar.<sup>84</sup>

Dilüe çözeltilerinde Gram negatif bakteriler (özellikle *Pseudomonas* spp., *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*) üreyebilmektedir. Bu



yüzden, hastanelerde genel kullanım için önerilmezler. Antiseptik olarak değil, kritik olmayan yüzeylerde dezenfektan olarak kullanımları önerilmektedir.<sup>88,106,107</sup>

### 2.4.3. Biyosidlere Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklerde direnç net bir şekilde tanımlanmışken, biyosidlerde direnç kavramı net değildir. Antimikrobiyal ilaç için belirlenmiş sınır değerlerin üzerinde MİK değerleri saptandığında, mikroorganizma dirençli kabul edilmektedir. Oysa biyosidler için belirlenmiş sınır değerler bulunmamaktadır.<sup>108</sup> Bu nedenle; biyosidler için “direnç” terimi yerine, “azalmış duyarlılık”, “duyarsızlık” veya “tolerans” terimlerinin kullanılmasının daha uygun olacağı önerilmektedir.<sup>85</sup>

Bakterilerde biyosid direnci, ilk kez 1950’li ve 1960’lı yıllarda tanımlanmıştır. 1970’li yıllarda antibiyotik dirençli bakterilerde, biyosid duyarlılıklarıyla ilgili yayınlar yapılmaya başlanmıştır. 1980’li yıllarda civa direncinin indüklenebilir olduğu, plazmid kaynaklı ve konjugasyon veya transdüksiyon yoluyla aktarılabilir olduğu gösterilmiştir. Bu yıllarda biyosidlere azalmış duyarlılık tanımlanmaya başlamıştır. Sonraki yıllarda da biyosid direnciyle antibiyotik direnci arasındaki ilişki üzerine çalışmalar öne çıkmıştır, hala araştırmalar devam etmektedir.<sup>86</sup>

Biyosidlerin yaygın kullanımı, önerilen konsantrasyonlarının altında kullanılmaları, bilinçsiz ve yanlış uygulanmaları, stok solüsyonlarını içeren şişelerin uygun olmayan koşullarda saklanmaları ve dilüe edilmiş biyosidlerin uzun süre kullanılmaları sonucunda, biyosidlere adaptasyon ve direnç

gelişmektedir. Düşük dozlarda biyosid maruziyetinde, hücre hasarı daha az olmaktadır, bu da fenotipik değişikliklere ve gen ekspresyonu indüksiyonuna neden olarak daha dirençli mikroorganizmaların gelişmesine yol açar. Ayrıca biyosid kullanımı sonrası ortamda kalan biyosid rezidülerine bağlı da direnç gelişebileceği düşünülmektedir.<sup>86,87,88,109</sup>

Biyosidlerin antimikrobiyal etkinliklerini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Örneğin; mikroorganizmanın türü, mikroorganizmanın miktarı, mikroorganizmanın üreme periyodu, biyosid konsantrasyonu (en önemli faktördür), temas süresi, pH, sıcaklık, ortamda bulunan organik madde varlığı gibi.<sup>85,87</sup>

Mikroorganizmaların biyosidlere direnç sıralaması; prionlar, *Cryptosporidium*, bakteri sporları, mikobakteriler, kistler, zarfsız küçük virüsler, trofozoitler, Gram negatif bakteriler, mantarlar, zarfsız büyük virüsler, Gram pozitif bakteriler ve zarflı virüsler şeklindedir.<sup>84,89</sup>

Bakterilerin biyosidlere direnç sıralaması; sporlu bakteriler, aside dirençli bakteriler, Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakteriler şeklindedir. Gram negatif bakteriler içinde özellikle *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve *Serratia marcescens* biyosidlere daha az duyarlılık gösterirler. Bakterilerin biyosid duyarlılığındaki farklılıklarında, hücrenin dış tabakalarının kimyasal bileşimi ve yapısındaki farklılıklar oldukça önemlidir.<sup>88,106,110,111</sup>

Biyosid direnci; doğal (intrinsik), fonksiyonel ve kazanılmış direnç olarak görülebilmektedir.<sup>112</sup>

Doğal direnç nedenleri arasında; bakterilerin dış tabaka yapılarının farklılığı, bakterilerin glikokaliks, biyofilm, “slime” oluşturabilmeleri oldukça önemlidir. Biyosidler, hedef bölgelerine ulaşabilmek için bakterilerin dış tabakalarını geçmek zorundadırlar. Mikobakterilerin lipitten zengin duvar yapıları, sporlu bakterilerdeki spor duvar yapısı, Gram negatif bakterilerdeki dış membran yapısı bu bakterileri biyosidlere doğal olarak dirençli yapmaktadır. Kromozomal kodlanan dış atım sistemlerinin varlığı ve biyosid inaktivasyonu da doğal dirençte önemli mekanizmalardır.<sup>85,113,89</sup>

Fonksiyonel direnç, fenotipik tolerans ya da fenotipik (fizyolojik) adaptasyon olarak da tanımlanmaktadır. Doğal direnç içinde de geçmektedir. Mikroorganizmanın özel büyüme koşullarında, biyosidlere maruz kaldıklarında gösterdikleri dirençtir. Örneğin; biyofilm oluşumu, fenotipik uyum sağlayarak dirence neden olmaktadır. Biyofilm içine yerleşmiş mikroorganizmaların, biyositlere duyarlılıkları azalmıştır.<sup>110,112,92</sup>

Kazanılmış direnç, mutasyona bağlı ya da plazmid veya transpozonlar aracılığıyla başka bir hücreden direnç içeren genlerin transferiyle gelişir.

Mutasyona bağlı direnç, biyosidin artan konsantrasyonlarına kademeli olarak maruz kalınmasına bağlı oluşmaktadır. Antibiyotiklerden farklı olarak hedef bölge mutasyonu ise, biyosidlerde birden çok hedef bölge olduğundan nadir görülmektedir. Ancak, triklosanın, düşük konsantrasyonlarında, *E.coli*'de spesifik bir enzim olan enol redüktazı inhibe ettiği görülmüş, bu enzimde değişikliğe neden olan ya da bu enzimi kodlayan *fabI* geninin aşırı ekspresyonuna neden olan

mutasyon varlığında triklosana direnç geliştiği bildirilmiştir. Antitüberküloz ilacı olan izoniazid de aynı enzimi inhibe ederek etki göstermektedir.<sup>11,85,106</sup>

Bakterilerde plazmid aracılığıyla kodlanan direnç mekanizmaları; azalmış alım ve dışa atımdır. Biyosidin hücre içine alımının azalması ya da hücreden atılımının artmasıyla, biyosid hücre içinde etkin düzeyine ulaşamaz ve azalmış duyarlılık oluşur.

Kazanılmış dirençte, azalmış permeabilitenin özellikle Gram negatif bakterilerde önemli bir rolü vardır. Bu permeabilite değişiklikleri şunlardır: hücre yüzeyinin hidrofobik yapısındaki değişiklikler, dış membran yapısında değişiklikler, dış membranın protein kompozisyonundaki değişiklikler ve dış membran yağ asidi kompozisyonundaki değişiklikler.<sup>110</sup>

Dışa atım pompalarını kodlayan genler, genellikle plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Bakterilerde bulunan bu dışa atım sistemleriyle, biyosidler hücre dışına atılabilmektedir. Dışa atım pompa sistemleri, 5 ana sınıfa ayrılmaktadır<sup>110,114</sup>;

- 1- MFS (Major facilitator superfamily), örneğin; *Escherichia coli*'de EmrB, *Staphylococcus aureus*'ta qacA/B gibi
- 2- ABC (ATP-binding cassette family), örneğin; *Lactococcus lactis*'te LmrA gibi
- 3- SMR (Small multidrug resistance family), aslında daha büyük bir grup olan DMT (drug /metabolite transporter superfamily)'nin bir üyesidir.

SMR için örneğin; *E.coli*'de EmrE, *S. aureus*'ta qacC ve qacD, Gram negatif bakterilerde qacE, qacEA1, qacF, qacG gibi.

- 4- RND (resistance-nodulation-division family), örneğin; *E.coli*'de AcrAB ve OqxAB, *Serratia marcescens*'de SdeXY, *Pseudomonas aeruginosa*'da MexAB, MexEF gibi
- 5- MATE (multidrug and toxic compound extrusion family), örneğin; *S. aureus*'ta MepA, *Neisseria spp.*'de NorM ve *P. aeruginosa*'da PmpM gibi

Bu dışı atım pompa sistemlerinden sadece ABC'de ATP hidroliziyle, diğer sistemlerde ise proton gradyenti ile enerji edilmektedir.

Özellikle qac genleri üzerinde çok çalışılmıştır. Bir çok farklı tipi olan qac genleri katyonik biyosidlere ve bazı antibiyotiklere dirençte rol alırlar.<sup>85</sup>

Biyosid ve antimikrobiyallere direnç beraber görülebilmektedir. Bazı antibiyotiklere dirençli olan bakterilerde, biyosidlerin de duyarlılığında azalma görülmüştür. Bakteride, biyosid ve antibiyotik aynı hedef bölge üzerinden etkiliyse ya da biyosidlere ve antibiyotiklere ortak bir direnç mekanizması varsa, her ikisine de direnç oluşabileceği düşünülmektedir. Plazmidlerde, antibiyotik ve biyosid direnç genleri de birlikte bulunabilmektedir.<sup>86,105,111,115</sup>

Biyosidlerin uygunsuz kullanımının, antibiyotik direncine yol açabileceği düşünülmüş ve çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda literatürde örnekler olmakla birlikte, kanıtlanmış kesin sonuçlara ulaşılamamıştır. Biyosidlerin duyarlılığını belirlemede standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır.

Biyosidlerin duyarlılığındaki azalmanın ya da direncin, klinik sonuçları da tartışmalıdır. Bu konularda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Mantarlarda, biyosid duyarlılığı ya da direnciyle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Mantarlar için özellikle hücre duvar yapılarının özelliği, hücre duvarındaki glukan içeriği, duvar kalınlığı, geçirgenliği ve plazma membranı biyosid direncinde oldukça önemlidir. Küflerin, biyosidlere mayalardan çok daha az duyarlı oldukları bulunmuştur. *C.albicans*'ın maya formu biyosidlere daha duyarlıyken; hif formu daha az duyarlı bulunmuştur.<sup>84,89</sup>

Biyofilm varlığı, biyosid direncinde oldukça önemlidir. *Candida* biyofilmlerinin, biyosidlere duyarlılığının çok daha azalmış olduğu görülmüştür.<sup>92,116,117</sup>

Mayalarda dışa atım pompası sistemlerinin, katyonik biyosidlerin direncinde rol oynadıklarına dair veri bulunmamaktadır. Mayalardaki biyosid direnciyle ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **2.4.3.1. Klorheksidin direnci**

Klorheksidine karşı, mikroorganizmalar doğal ya da kazanılmış dirence sahip olabilirler. Örneğin; bakteri sporları ve mikobakteriler klorheksidine doğal olarak dirençlidirler.<sup>91</sup>

Gram negatif bakteriler, dış membran yapılarındaki farklılıktan dolayı biyosidlere Gram pozitiflerden daha dirençlidirler. *Pseudomonas aeruginosa*, dış

membranında yüksek  $Mg^{+2}$  içermektedir; *Proteus* spp.'nin ise daha az asidik özellikte bir dış membranı vardır. Bu nedenlerle Gram negatif bakteriler içinde de özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus* spp., klorheksidine intrinsik olarak çok daha az duyarlı bulunmuştur.<sup>110,111</sup>

Klorheksidin bakteriyostatik konsantrasyonlarına (in vitro kullanılan 4mg/L) maruz kalınca bakteri suşu ölmez, ancak inhibe oluyorsa, bu durum klorheksidine tolerans olarak tanımlanmıştır. Klorheksidin bakterisidal konsantrasyonuna (40000mg/L) maruz kalan, ancak diğer bakteriler ölürken, yaşamaya devam eden bakteri suşu ise klorheksidine dirençli olarak tanımlanmıştır.<sup>91</sup>

Klorheksidin direncinde, dışa atım pompaları oldukça önemli rol oynamaktadır. Klorheksidin duyarlılığıyla ilişkili pek çok dışa atım pompası tanımlanmıştır. Örneğin; *Staphylococcus* spp.'de özellikle qacA/B, ayrıca smr (eski adı qacC) geni ve norA'nın aşırı ekspresyonu da klorheksidin duyarlılığıyla ilişkili bulunmuştur. Gram negatif bakterilerde AcrAB-TolC sistemi, *Serratia marcescens*'te SdeXY, *E.coli*'de OqxAB klorheksidin duyarlılığında rol oynayan dışa atım pompa sistemlerine örnektir. Ancak dışa atım pompası genlerini taşıyan her izolat klorheksidin dirençli değildir. Genlerin o sıradaki ekspresyonları da önemli bulunmuştur. Ayrıca her dirençli izolatta, direnç geni taşımayordur, farklı direnç mekanizmaları bulunabilmektedir.<sup>91,110,112,114,118</sup>

Çok ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae*'da, klorheksidin duyarlılığının daha az olduğu belirlenmiştir.<sup>119</sup>

Vankomisin dirençli enterokoklarla, vankomisin duyarlı olanlar arasında klorheksidin duyarlılığında anlamlı fark bulunmamıştır.<sup>90</sup>

Yapılan bazı çalışmalarda ise, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kökenlerinde klorheksidin MİK değerleri, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) kökenleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Klorheksidin, MRSA dekolonizasyonu için yaygın kullanılan bir ajan olduğundan bu azalmış duyarlılık önemlidir. Ancak saptanan in vitro MİK değerleri, genellikle kullanılan in vivo düzeylerin altında olduğundan klinik kullanımda sıklıkla klorheksidin duyarlılığı devam etmektedir.<sup>91,112</sup>

Literatürdeki iki çalışmada, klorheksidine azalmış duyarlılığın klinik yansıması izlenmiştir. Bir çalışmada, düşük düzey mupirosin direnciyle birlikte klorheksidin direnç genlerini (qacA/B) taşıyan MRSA'larda dekolonizasyon tedavisinin başarısız olduğu ve MRSA taşıyıcılığının devam ettiği görülmüştür.<sup>120</sup> Diğer çalışmada ise, yoğun bakım ünitesinde MRSA'sı olan hastalara klorheksidin bazlı dekolonizasyon protokolü (mupirosin kullanılmadan) uyguladıklarında, klorheksidin duyarlı kökenlerde çok başarılı sonuçlar alırken, yüksek MBK değerlerine sahip ve qacA/B geni taşıyan kökenlerde dekolonizasyonun başarısız olduğunu görmüşlerdir.<sup>121</sup>

#### **2.4.3.2. Kuaterner amonyum bileşiklerine direnç**

Biyosid direnci konusunda, en çok çalışılan grup kuaterner amonyum bileşikleridir. Kuaterner amonyum bileşiklerine duyarlılığın azalmasında, hücre



membranında değişiklikler ve dışa atım pompaları oldukça önemli mekanizmalardır.<sup>87,105,122</sup>

Kuaterner amonyum bileşikleri, alkali pH'da daha etkilidirler. *Serratia marcescens*'in asidik pH'da yapılan tekrarlayan pasajlarında, alkali pH'ya göre direncin daha yüksek oranda arttığı tespit edilmiştir.<sup>109</sup>

*P.aeruginosa*'da hücre membranındaki yağ asidi kompozisyonundaki değişikliklere bağlı olarak kuaterner amonyum bileşiklerine direnç olduğu görülmüştür.<sup>108</sup>

Kuaterner amonyum bileşiklerine dirençte, Gram-pozitif bakterilerde (qac A/B ve smr, qac G, qac H gibi) ve Gram-negatif bakterilerde (emr E, qac E ve qac EΔ1 gibi) rol alan pek çok dışa atım pompaları tanımlanmıştır.<sup>110,122</sup>

Örneğin; qac G'nin bulunduğu *S.aureus* türlerinin, duyarlı kontrol türlerinden dört-beş kat fazla MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. *S.aureus*'ta qacA geni taşıyan pSK01 plazmidinin, trimetoprim ve aminoglikozitlere de direnç genlerini taşıdığı, klinik izolatlarda qacA/B genlerinin taşındığı plazmidlerde, betalaktamaz ve ağır metallere de direnç genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir.<sup>108,122</sup>

*Enterococcus* spp. için, qacZ'nin benzalkolyum klorür toleransı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.<sup>123</sup> Ayrıca, MATE dışa atım ailesinden *S. aureus*'ta MepA benzalkonyum klorür ve klorheksidin direnciyle, *Neisseria* spp.'de NorM ve *P. aeruginosa*'da PmpM genleri ise benzalkonyum klorür direnciyle ilişkili bulunmuştur.<sup>110</sup>

Bakteri hücresi, biyosid ve antibiyotikler için ortak bir direnç mekanizmasına sahip olabilir. Örneğin; *P.aeruginosa*'da amikasin ve tobramisin direncine, benzalkonyum klorür toleransında artış eşlik etmektedir.<sup>85</sup> Ancak, benzalkonyum klorür toleransının izlendiği *P.aeruginosa*'da, diğer membran aktif ajanlara da azalmış duyarlılık izlenirken, antibiyotiklerin duyarlılığında ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.<sup>105,124</sup>

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereçler

#### 3.1.1. Besiyerleri, Ticari kitler

- Sabouraud Dekstroz Agar (Oxoid, İngiltere)
- L-glutaminli, bikarbonatsız RPMI 1640 medium (Sigma, ABD)
- Agaroz (Sigma, ABD)
- İnsan serumu
- ID 32 C (bioMérieux, Fransa)

#### 3.1.2. Kimyasallar

- MOPS (3- [N-morfolino] propansülfonik asit) (Amresco, ABD)
- Flukonazol (Pfizer, ABD)
- Nistatin (Sigma, ABD)
- Klorheksidin diğlukonat (Sigma, ABD)
- Benzalkonyum klorür (Sigma, ABD)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma, ABD)
- Glukoz (Labm, İngiltere)

#### 3.1.3. Kullanılan Araç ve Cihazlar

- Etüv (Elektro-Mag, M5040BR, Türkiye)

- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin Dondurucu, -20 °C (Uğur, Türkiye)
- Derin Dondurucu, -80 °C (New Brunswick Scientific, ABD)
- Terazı (Kern, Almanya)
- pH Metre (Fisher Scientific, ABD)
- McFarland Dansitometre (PhoenixSpec BD, ABD)
- Işık Mikroskopu (Olympus, Japonya)
- Filtre (0.2 µm'lik membran filtre, Corning)
- 96 kuyucuklu, steril, düz tabanlı mikrodilüsyon plakları
- Vorteks
- Spektrofotometre (Tecan Sunrise™, İsviçre)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Mikropipetler (Expell, Meksika-Beta Pette™, ABD)
- Steril pipet uçları
- Petri Kapları
- Mezur
- Parafilm
- Enjektör
- Öze
- Sporlar
- Steril tüpler
- Lam, lamel

### 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kökenler

Bu çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 3 tanesi flukonazole duyarlı ve 3 tanesi flukonazol dirençli 6 *Candida albicans* klinik kökeni ile 1 *Candida albicans* (ATCC 10231) standart kökeni olmak üzere toplam 7 *Candida albicans* kökeni dahil edilmiştir.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

#### 3.2.1.1. Sabouraud dekstroz agar (SDA) hazırlanması

100 ml besiyeri için;

- Sabouraud dekstroz agar 6.5 gr
- Agar 0.5 gr
- Distile su 100 ml

Hazırlanan besiyeri karışımı, otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra steril petri kaplarına, kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülüp, katılaşıncaya kadar bekletilmiştir. Besiyeri kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

### 3.2.1.2. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması

1 L besiyeri için;

- RPMI 1640 (L-glutaminli, bikarbonatsız) (Sigma) 10.4 gr
- MOPS (3- [N-morfolino] propansülfonik asit) 34.53 gr
- Steril distile su 1000 ml
- Glukoz 18 gr

900 mL distile suda 10,4 g RPMI 1640 (L-glutaminli, bikarbonatsız) toz besiyerine 18 gr glukoz (RPMI besiyerinin içinde 2 gr glukoz bulunduğundan, 18 gr eklenince %2 glukoz oranına ulaşılmaktadır) eklenerek çözüldü. Tampon madde olarak 34,53 gr MOPS eklendi. Besiyerinin pH derecesi 1 mol/L NaOH kullanılarak, oda ısısında 7'ye ayarlandı. Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendikten sonra, 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. Kullanılana kadar +4°C'de saklandı.

### 3.2.2. Antifungal ilaçların ve biyosidlerin hazırlanması

Flukonazol ve nistatinin toz halindeki etken maddeleri kullanılmıştır. EUCAST standardına ve üretici firmaların önerilerine uygun şekilde flukonazol distile su içinde ve nistatin DMSO içinde çözülerek, istenilen final konsantrasyonlarına göre stok çözeltileri hazırlanmıştır. Kullanılincaya kadar -80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

Klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür, steril distile su içinde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır.

### **3.2.3. *Candida albicans* Tür Tanımlaması**

Çalışmaya alınan klinik örnekler, mantarların üretilmesinde kullanılan genel üretim besiyeri olan SDA besiyerine ekilmiştir. Etüvde 37 °C’de, 24-48 saat inkübe edildikten sonra, koloniler direkt mikroskopi ve Gram boyası ile incelenmiştir. Sonrasında maya kolonileri germ tüp testi ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonu sağlayan yarı otomatize ID 32C sistemi kullanılarak *Candida albicans* tür tanımlaması doğrulanmıştır.

#### **3.2.3.1. Germ tüp testi**

SDA’da üremiş olan saf maya kolonilerinden öze ile alınarak, 0.5 ml insan serumu içeren tüplerde süspansiyon hazırlanmıştır. Etüvde 37 °C’de maksimum 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası serum örnekleri lam lamel arasında preparat hazırlanarak, ışık mikroskopunun 40x büyütmesinde incelenmiştir. Ana maya hücresinden boğumlanmadan çıkan, ana maya hücresinin yarısı kadar genişlikte ve 3-4 katı uzunlukta olan uzantılar germ tüp olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.2.3.2. Karbonhidrat asimilasyon testi-ID 32C sistemi**

ID 32 C (bioMérieux, Fransa) mayaların karbonhidratları asimile etme özelliklerine göre tanımlanmalarını sağlayan yarı otomatize bir sistemdir.

32 kuyucuklu striplerde, bir kontrol kuyucuğu dışındaki kuyucukların her birinde dehidrate karbonhidrat maddeleri (D-galaktoz, actidione (sikloheksimid),

D-sakkaroz, N-asetil glukozamin, laktik asit, L-arabinoz, D-sellobiyoz, D-rafinoz, D-maltoz, D-trehaloz, potasyum 2-keto-glukonat, metil- $\alpha$ -D-glukopiranozit, D-mannitol, D-laktoz, inozitol, D-sorbitol, D-ksiloz, D-riboz, gliserol, L-ramnoz, palatinoz, eritritol, D-melibiyoz, sodyum glukuronat, D-melezitoz, potasyum glukonat, levulinat, D-glukoz, L-sorboz, glukozamin, eskülin) bulunmaktadır.

Kontrol kuyucuğuna C besiyerinden 135  $\mu$ l konmuştur. SDA'da üremiş olan 24-48 saatlik maya kolonilerinden alınarak, süspansiyon medyum (%0,85 NaCl) içinde 2 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 250  $\mu$ l alınarak C besiyerine aktarılmıştır. Stripteki her bir kuyucuğa, bu besiyerinden 135  $\mu$ l konmuştur. Stribin kapağı kapatılarak 30°C'de, nemli ortamda, 24-48 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda mayaların üremesine göre değerlendirme yapılmıştır. Kontrol kuyucuğunda üreme olmamıştır. Bulanık görünen kuyucuklarda ise üreme pozitif kabul edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklardan elde edilen sayısal değer APIWEB güncel web sayfası üzerinden kodlanmış ve tür tanımı belirlenmiştir (7147 / 3400 = *Candida albicans*).

#### **3.2.4. Maya süspansiyonlarının hazırlanması**

SDA besiyerine ekimleri yapılan suşların, 24 saatlik kültürlerinden steril distile su kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonların steril distile su ile 1/10 sulandırılmaları yapılmıştır. Sonuçta 1-



$5 \times 10^5$  CFU/mL'lik maya süspansiyonları elde edilmiştir. Süspansiyonlar yapıldıktan sonra 30 dakika içinde mikroplaklara inokulasyonları yapılmıştır.

### 3.2.5. Antifungal ve biyosidlerin duyarlılık testi

Duyarlılıkları EUCAST Edef 7.2<sup>62</sup> kriterlerine uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Besiyeri olarak L-glutaminli, bikarbonatsız, %2 glukoz eklenmiş, MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Antifungal ilaçların ve biyosidlerin stok solüsyonlarından, uygun çözücülerile istenilen final konsantrasyonlarının iki katı olacakları şekilde besiyeriyle sulandırım serileri her biri için 10'ar tüpe hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu, steril, düz tabanlı mikroplaklara, uygun konsantrasyonlarını içeren tüplerden alınarak 1'den 10'a kadar her kuyucuğa 100'er  $\mu$ l'lik hacimlerle dağıtılmıştır. Her sıradaki 11. kuyucuk besiyeri kontrolü, 12. kuyucuk ise üreme kontrolü olarak bırakılarak, bu kuyucuklara ilaç konmamıştır. Hazırlanmış olan  $1-5 \times 10^5$  CFU/mL'lik maya süspansiyonlarından 100'er  $\mu$ l'lik hacimler alınarak, 11.kuyucuk olan besiyeri kontrolü hariç tüm kuyucuklara dağıtılmıştır. Böylece istenilen final ilaç konsantrasyonları ve inokulum yoğunluğu sağlanmıştır. Final konsantrasyonları; flukonazol için 0.25-128  $\mu$ g/ml, nistatin için 0.03-16 ug/ml, klorheksidin glukonat için 0.12-64 mg/L ve benzalkonyum klorür için 0.5-128 mg/L'dir. Final inokulum yoğunluğu ise 0.5-2.  $5 \times 10^5$  CFU/mL'dir.

Plaklar 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar hem görsel hem de spektrofotometrik (530 nm'de okutulur) olarak değerlendirilmiştir.

Standartlara göre MİK değeri; flukonazol için üremenin %50 olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon, nistatin için üremenin tamamen inhibe olduğu konsantrasyon olarak kabul edilmiştir. Biyosidler için standart sınır değerler olmadığı için, üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuklar MİK değeri kabul edilmiştir.

### **3.2.6. Kombinasyon testleri**

Her bir *Candida albicans* kökeni ve her kimyasal ajan için, 96 kuyucuklu ve düz tabanlı steril mikropaklar kullanılarak dama tahtası yöntemi uygulanmıştır. *Candida albicans* kökenlerinde, flukonazol-klorheksidin, flukonazol-benzalkonyum klorür, nistatin-klorheksidin ve nistatin-benzalkonyum klorür etkileşimleri araştırılmıştır.

#### **3.2.6.1. Dama tahtası (Checkerboard) yöntemi**

Besiyeri olarak duyarlılık testlerinde olduğu gibi MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Flukonazol ile olan etkileşimleri araştırmak için çalışmaya başlamadan önce stok ilaç çözeltileri flukonazol dirençli ve duyarlı suşlar için farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde bu besiyeri ile sulandırılmıştır. Standart protokole uygun olarak hazırlanan ilaç sulandırmaları 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropaklarda kombine edilmiştir. Kombinasyonlarda, antifungal ilaçlar için (flukonazol veya nistatin) yatay sıra, biyosidler (klorheksidin diglukonat veya

benzalkonyum klorür) için ise dikey sıra kullanılarak dilüe edilmiştir. SDA besiyerine pasajlanmış mayaların, plaklardaki son inokulum konsantrasyonları  $0.5-2.5 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde hazırlanan süspansiyonundan alınarak, besiyeri kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara dağıtılmıştır.

A1 kuyucuğu üreme kontrolü, H12 kuyucuğu ise besiyeri kontrolü olarak bırakılmıştır. Plaklarda ilaçların eş zamanlı olarak tek başlarına MİK'leri de tekrar değerlendirilmiştir. Hazırlanan kombinasyonlar tablo 3-8'de verilmiştir.

Plaklar etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde plaklar hem görsel olarak hem de spektrofotometre cihazında 530 nm'de okutularak değerlendirilmiştir.

**Tablo 3.** Flukonazol Duyarlı kökenlerin mikroplaklardaki Flukonazol← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları (mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	F0.06	F0.12	F0.25	F0.5	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
K0.5	K0.5+ F0.06	K0.5+ F0.12	K0.5+ F0.25	K0.5+ F0.5	K0.5+ F1	K0.5+ F2	K0.5+ F4	K0.5+ F8	K0.5+ F16	K0.5+ F32	K0.5+ F64
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
K1	K1+ F0.06	K1+ F0.12	K1+ F0.25	K1+ F0.5	K1+ F1	K1+ F2	K1+ F4	K1+ F8	K1+ F16	K1+ F32	K1+ F64
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
K2	K2+ F0.06	K2+ F0.12	K2+ F0.25	K2+ F0.5	K2+ F1	K2+ F2	K2+ F4	K2+ F8	K2+ F16	K2+ F32	K2+ F64
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
K4	K4+ F0.06	K4+ F0.12	K4+ F0.25	K4+ F0.5	K4+ F1	K4+ F2	K4+ F4	K4+ F8	K4+ F16	K4+ F32	K4+ F64
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
K8	K8+ F0.06	K8+ F0.12	K8+ F0.25	K8+ F0.5	K8+ F1	K8+ F2	K8+ F4	K8+ F8	K8+ F16	K8+ F32	K8+ F64
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
K16	K16+ F0.06	K16+ F0.12	K16+ F0.25	K16+ F0.5	K16+ F1	K16+ F2	K16+ F4	K16+ F8	K16+ F16	K16+ F32	K16+ F64
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
K32	K32+ F0.06	K32+ F0.12	K32+ F0.25	K32+ F0.5	K32+ F1	K32+ F2	K32+ F4	K32+ F8	K32+ F16	K32+ F32	NK

F: Flukonazol K:Klorheksidin PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol

**Tablo 4.** Flukonazol Dirençli kökenlerin mikroplaklardaki Flukonazol← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları (mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
K2	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
K4	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
K8	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
K16	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
K32	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
K64	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
K128	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	K128+	NK
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	

F: Flukonazol K:Klorheksidin PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol

**Tablo 5.** Flukonazol Duyarlı kökenlerin Mikroplaklardaki Flukonazol ← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	F0.06	F0.12	F0.25	F0.5	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
B4	B4+ F0.06	B4+ F0.12	B4+ F0.25	B4+ F0.5	B4+ F1	B4+ F2	B4+ F4	B4+ F8	B4+ F16	B4+ F32	B4+ F64
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
B8	B8+ F0.06	B8+ F0.12	B8+ F0.25	B8+ F0.5	B8+ F1	B8+ F2	B8+ F4	B8+ F8	B8+ F16	B8+ F32	B8+ F64
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
B16	B16+ F0.06	B16+ F0.12	B16+ F0.25	B16+ F0.5	B16+ F1	B16+ F2	B16+ F4	B16+ F8	B16+ F16	B16+ F32	B16+ F64
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
B32	B32+ F0.06	B32+ F0.12	B32+ F0.25	B32+ F0.5	B32+ F1	B32+ F2	B32+ F4	B32+ F8	B32+ F16	B32+ F32	B32+ F64
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
B64	B64+ F0.06	B64+ F0.12	B64+ F0.25	B64+ F0.5	B64+ F1	B64+ F2	B64+ F4	B64+ F8	B64+ F16	B64+ F32	B64+ F64
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
B128	B128+ F0.06	B128+ F0.12	B128+ F0.25	B128+ F0.5	B128+ F1	B128+ F2	B128+ F4	B128+ F8	B128+ F16	B128+ F32	B128+ F64
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
B256	B256+ F0.06	B256+ F0.12	B256+ F0.25	B256+ F0.5	B256+ F1	B256+ F2	B256+ F4	B256+ F8	B256+ F16	B256+ F32	NK

F: Flukonazol B: Benzalkonyum klorür PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol

**Tablo 6.** Flukonazol Dirençli kökenlerin Mikroplaklardaki Flukonazol ← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
B0.5	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+	B0.5+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
B1	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+	B1+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
B2	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
B4	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
B8	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
B16	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	F1024
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
B32	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	NK
	F1	F2	F4	F8	F16	F32	F64	F128	F256	F512	

F: Flukonazol B: Benzalkonyum klorür PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol

**Tablo 7.** Mikroplaklardaki Nistatin← ve Klorheksidin ↑ Konsantrasyonları(mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8	N16
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
K1	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+	K1+
	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8	N16
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
K2	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+	K2+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
K4	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+	K4+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
K8	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+	K8+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
K16	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+	K16+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
K32	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+	K32+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
K64	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	K64+	NK
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	

N:Nistatin K:Klorheksidin PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol



**Tablo 8.** Mikroplaklardaki Nistatin← ve Benzalkonyum klorür ↑ Konsantrasyonları (mg/L)

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>	<i>A5</i>	<i>A6</i>	<i>A7</i>	<i>A8</i>	<i>A9</i>	<i>A10</i>	<i>A11</i>	<i>A12</i>
PK	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>	<i>B4</i>	<i>B5</i>	<i>B6</i>	<i>B7</i>	<i>B8</i>	<i>B9</i>	<i>B10</i>	<i>B11</i>	<i>B12</i>
B2	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+	B2+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>	<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8</i>	<i>C9</i>	<i>C10</i>	<i>C11</i>	<i>C12</i>
B4	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+	B4+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>	<i>D5</i>	<i>D6</i>	<i>D7</i>	<i>D8</i>	<i>D9</i>	<i>D10</i>	<i>D11</i>	<i>D12</i>
B8	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+	B8+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	<i>E11</i>	<i>E12</i>
B16	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+	B16+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>	<i>F8</i>	<i>F9</i>	<i>F10</i>	<i>F11</i>	<i>F12</i>
B32	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+	B32+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>	<i>G6</i>	<i>G7</i>	<i>G8</i>	<i>G9</i>	<i>G10</i>	<i>G11</i>	<i>G12</i>
B64	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+	B64+
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	N8
<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5</i>	<i>H6</i>	<i>H7</i>	<i>H8</i>	<i>H9</i>	<i>H10</i>	<i>H11</i>	<i>H12</i>
B128	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	B128+	NK
	N0.007	N0.01	N0.03	N0.06	N0.12	N0.25	N0.5	N1	N2	N4	

N:Nistatin B:Benzalkonyum klorür PK: Pozitif kontrol NK: Negatif kontrol

### 3.2.6.2. Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) ve FİK indeksinin hesaplanması

Öncelikle flukonazol, nistatin, klorheksidin ve benzalkonyum klorürün tek başlarına *C. albicans* üzerine MİK değerleri belirlendi. Daha sonra flukonazol-klorheksidin, flukonazol-benzalkonyum, nistatin-klorheksidin ve nistatin-benzalkonyum klorür kombinasyonlarının bulunduğu kuyucuklar üreme yönünden değerlendirilmiştir. Her köken için yapılan kombinasyonlarda, üreme olan kuyucuklarda FİK indeksi hesaplanmıştır.

FİK indeksi, iki ilacın FİK değerlerinin toplanması ile bulunmuştur. FİK değeri ise, her ilacın kombinasyonda kullanıldığı zamandaki MİK'inin, tek başına kullanıldığındaki MİK'ine bölünmesi ile elde edilen değerdir.

$$FİK_A = \text{Kombinasyondaki ilaç A'nın MİK'i} / \text{Tek başına ilaç A'nın MİK'i}$$

$$FİK_B = \text{Kombinasyondaki ilaç B'nin MİK'i} / \text{Tek başına ilaç B'nin MİK'i}$$

$$FİK_I (\sum FİK) = FİK_A + FİK_B$$

FİK indeksi;  $\leq 0.5$  ise sinerjistik, 0.5 ile 4 arasında ise etkileşim yok (indiferens),  $>4$  ise antagonistik olarak değerlendirilmiştir.<sup>77,78,80,81,82,125</sup>

## 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 6 klinik ve 1 standart *Candida albicans* kökeni için öncelikle flukonazol, nistatin, klorheksidin ve benzalkonyum klorürün duyarlılıkları çalışılmıştır. Daha sonra flukonazol-klorheksidin, flukonazol-benzalkonyum, nistatin-klorheksidin ve nistatin-benzalkonyum klorür kombinasyonları dama tahtası yöntemiyle denenmiş, üreme sonuçlarına göre FİK değerleri hesaplanmıştır.

### 4.1. Flukonazol Ve Nistatinin İn Vitro Duyarlılık Test Sonuçları

*Candida albicans* kökenlerinin MİK değerleri 24 ve 48. saatte, 530 nm'de okutularak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. MİK değeri, flukonazol için üreme kontrolüne (pozitif kontrol) göre üremede %50 azalmanın olduğu en düşük ilaç konsantrasyonu olarak, nistatin için ise üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. EUCAST standartlarına göre<sup>126</sup>; amfoterisin B için direnç sınırı >1 ug/ml kabul edilmiş, flukonazol için ise MİK değerleri >4 ug/ml olan örnekler dirençli, 4 olanlar orta duyarlı, ≤2 olanlar ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Nistatin için belirlenmiş sınır değerler olmadığından, çalışmamızda MİK değerleri belirtilmiştir. Kökenlerin MİK değerleri Tablo 9'da görülmektedir.

#### 4.2. Klorheksidin Ve Benzalkonyum Klorürün İn Vitro Duyarlılık Test Sonuçları

Klorheksidin ve benzalkonyum klorür için standart MİK değerleri bulunmadığı için üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değerleri olarak kabul edilmiştir. Kökenlerin MİK değerleri Tablo 9'da görülmektedir.

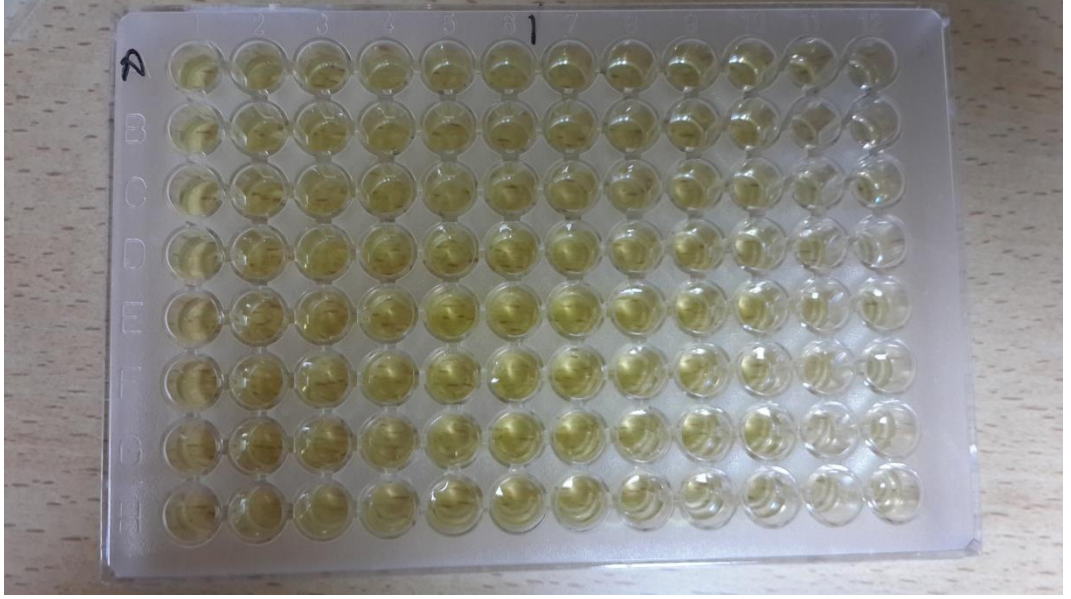
**Tablo 9.** *Candida albicans* kökenlerinin tek başına flukonazol, nistatin, klorheksidin ve benzalkonyum klorür için MİK değerleri (mg/L)

<i>Candida albicans</i>	Flukonazol	Nistatin	Klorheksidin	Benzalkonyum
1	2	0.12	16	128
2	64	0.25	16	4
3	2	0.12	8	128
4	2	0.12	2	4
5	128	0.12	16	2
6	128	0.06	16	4
ATCC 10231	8	0.12	2	8

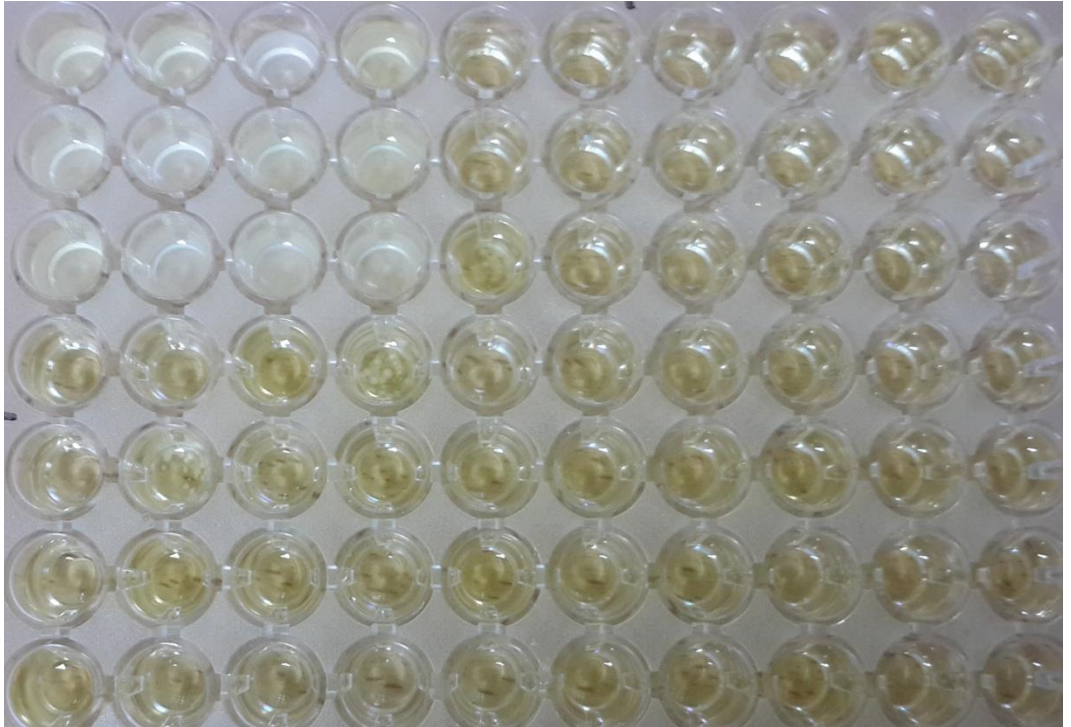
### 4.3. Kombinasyon Testinin Sonuçları

Çalışmaya alınan *Candida albicans* kökenleri için flukonazol-klorheksidin, flukonazol-benzalkonyum klorür, nistatin-klorheksidin ve nistatin-benzalkonyum klorür kombinasyonlarında, her iki ajanın 24. ve 48.saatteki MİK değerleri hem görsel olarak, hem de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Her köken için FİK değerleri ve FİK indeksleri ( $\Sigma$ FİK) hesaplanmıştır.

*Candida albicans* kökenlerinin flukonazol-klorheksidin, flukonazol-benzalkonyum klorür, nistatin-klorheksidin ve nistatin-benzalkonyum klorür kombinasyonlarının FİK indekslerinin minimum ve maksimum değerleri ve bu değerlere göre etkileşimlerinin sonuçları Tablo 10 ve 11'de görülmektedir. En yüksek sinerji oranı flukonazol-klorheksidin kombinasyonunda görülmüştür.



A: İnkübasyon öncesi kombinasyon testinin görüntüsü



B: İnkübasyon sonrası kombinasyon testinin görüntüsü

**Resim 1.** Dama tahtası yönteminin uygulandığı bir plağın örnek görüntüsü

**Tablo 10.** *Candida albicans* kökenlerinin flukonazolle biyosid kombinasyonlarının FİK indekslerinin minimum ve maksimum ( $\sum FİK_{\min}$  -  $\sum FİK_{\max}$ ) değerleri ve değerlerin analizine göre elde edilen in vitro etkileşim sonuçları

<i>Candida albicans</i>	Flukonazol- Klorheksidin $\sum FİK_{\min}$ - $\sum FİK_{\max}$	Flukonazol- Klorheksidin Etkileşim sonucu	Flukonazol- Benzalkonyum Klorür $\sum FİK_{\min}$ - $\sum FİK_{\max}$	Flukonazol- Benzalkonyum Klorür Etkileşim sonucu
1	1.0 - 2.5	Etkileşim yok	1.0 - 8.0	Antagonizma
2	0.12 - 0.53	Sinerji	1.25 - 2.25	Etkileşim yok
3	1.12 - 3.0	Etkileşim yok	4.5 - 16	Antagonizma
4	2.25 - 3.0	Etkileşim yok	0.75 - 2.0	Etkileşim yok
5	0.28 - 0.51	Sinerji	1.0 - 2.0	Etkileşim yok
6	0.24 - 0.62	Sinerji	0.75 - 2.25	Etkileşim yok

**Tablo 11.** *Candida albicans* kökenlerinin nistatinle biyosid kombinasyonlarının FİK indekslerinin minimum ve maksimum ( $\sum FİK_{\min}$  -  $\sum FİK_{\max}$ ) değerleri ve değerlerin analizine göre elde edilen in vitro etkileşim sonuçları

<i>Candida albicans</i>	Nistatin- Klorheksidin $\sum FİK_{\min}$ - $\sum FİK_{\max}$	Nistatin- Klorheksidin Etkileşim sonucu	Nistatin- Benzalkonyum klorür $\sum FİK_{\min}$ - $\sum FİK_{\max}$	Nistatin- Benzalkonyum klorür Etkileşim sonucu
1	1.5 - 2.2	Etkileşim yok	1.0 - 2.0	Etkileşim yok
2	0.56-1.0	Etkileşim yok	1.5 - 3.0	Etkileşim yok
3	2.0 - 3.0	Etkileşim yok	2.0 - 4.0	Etkileşim yok
4	1.2 - 3.0	Etkileşim yok	1.2 - 3.0	Etkileşim yok
5	1.0 - 2.3	Etkileşim yok	1.0 - 2.2	Etkileşim yok
6	2.1 - 4.0	Etkileşim yok	2.5 - 4.0	Etkileşim yok



## 5. TARTIŞMA

Fungal enfeksiyonların sıklığı son yıllarda giderek artmaktadır. Tüm dünyada *Candida* türleri fungal enfeksiyonların en sık etkenleridir. Lokal mukokutanöz enfeksiyonlara neden olabildikleri gibi, hayatı tehdit eden invazif enfeksiyonlara da neden olabilmektedirler. Mortalite ve morbiditesi yüksek olan hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri 4. sırada yer almakta, yoğun bakım enfeksiyonlarında ise tüm etkenler içinde *Candida* türleri 3.sırada yer almaktadır. *Candida* türlerinin dağılımı hastaneler ve ülkeler arasında değişiklik göstermektedir; ancak tüm dünyada *Candida albicans* florada da kandidozlar içinde de en sık rastlanan etkindir.<sup>4,6,7,26</sup>

*Candida* enfeksiyonlarına karşı primer savunma mekanizması deri ve mukozal yüzeylerin bütünlüğüdür. Sağlıklı kişilerde bile, deri bütünlüğü bozulduğunda ya da mukozal hasar oluştuğunda *Candida* invazyonu gelişebilmektedir.<sup>127</sup>

Fungal enfeksiyonların artışı ile antifungal profilaksi ve tedavi de yaygınlaşmıştır. Bununla beraber antifungal ilaç direncinde de artış meydana gelmiştir. Fungal enfeksiyonların varlığında, tür tanımlaması ve gerekli durumlarda antifungal duyarlılık testlerinin yapılması büyük önem taşımaktadır.<sup>8,9</sup>

Antifungal ilaçlar içinde en çok kullanılan üç ilaç grubu; polyenler, azoller ve ekinokandinlerdir.

Polyen grubu antifungaller topikal kullanılan nistatin ve sistemik tedavide kullanılan amfoterisin B'den oluşmaktadır. En eski antifungal ailesi olmalarına rağmen, polyen grubu antifungallere sekonder direnç oldukça nadir görülmektedir. Son yıllarda amfoterisin B'ye primer dirençli *Candida albicans* dışı türlerde ve *Candida* dışı fungal etkenlerdeki artışlar, mikrobiyoloji laboratuvarlarında tür tanımlamasının önemini ortaya koymaktadır.<sup>50,51</sup>

Azoller içinde flukonazol, profilaktik ve tedavi amacıyla en sık kullanılan ilaçtır. Ancak son yıllarda fungistatik etkili bir ilaç olan flukonazole direnç gelişimi yaygınlaşmaya başlamıştır.<sup>26</sup>

Antisepsi ve dezenfeksiyon amacıyla biyosidlerin kullanımı, sadece hastanelerde değil günlük hayatımızda da yaygınlaşmıştır.

Katyonic biyosidler olan klorheksidin glukonat ve benzalkonyum klorür, aynı zamanda klinik kullanımları da olan antimikrobiyal ajanlardır. Etkilerini membran hasarı oluşturarak gösterirler.<sup>87,91,96,128</sup>

Enfeksiyon kontrolü için kullandığımız biyosidlerin yaygınlaşmasının, hem etkenlerin biyosidlere duyarlılığının azalmasına hem de antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişimine neden olabileceği düşünülerek bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.<sup>85,109,113</sup> Literatür incelendiğinde çalışmaların çoğunun bakteriler üzerine olduğu görülmektedir. Mayalarla ilişkili çok az sayıda yayın bulunmaktadır.

Biyosidlerin mayalardaki duyarlılığını belirlemek için belirlenmiş standart bir yöntem bulunmamaktadır. Çalışmamızda biyosidlerin duyarlılığı, EUCAST

Edef 7.2 önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Biyosidler için belirlenmiş sınır değerler de bulunmadığı için, sonuçlarımızda sadece MİK değerleri verilmiştir.

Salim ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Candida* spp. izolatları üzerine klorheksidinin in vitro antifungal etkisini araştırmışlar ve etkinliğini flukonazol ile karşılaştırmışlardır. CLSI standartlarına göre, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 76 klinik ve 3 standart *Candida* spp. izolatının klorheksidin ve flukonazol MİK değerlerini belirlemişlerdir. Klorheksidin MİK değerleri 0.78-6.25 mg/L arasında bulunmuştur. 32 *Candida albicans* izolatı için klorheksidin MİK değerlerinin geometrik ortalaması 24. saatte 4.05 mg/L, 48. saatte 5.03 mg/L olarak belirlenmiştir. Flukonazol dirençli izolatların hiçbirinde klorheksidinin klinik kullanımdaki konsantrasyonlarına direnç saptanmamış ve klorheksidinle flukonazol arasında in vitro çapraz direnç tespit etmemişlerdir.<sup>93</sup>

Block ve Furman tarafından yapılan çalışmada, klinik örneklerden elde edilen çeşitli mikroorganizmaların klorheksidin duyarlılıklarını agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. 35 *Candida albicans*'ın dahil olduğu bu çalışmada, *Candida albicans* klorheksidin MİK'lerini 16-128 mg/L arasında, geometrik ortalama MİK değerini 87.9 mg/L olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada aynı zamanda hastanede klorheksidin kullanımının yoğunluğunun, mikroorganizmaların klorheksidin duyarlılığı üzerine etkisini de incelemişlerdir. Klorheksidin kullanımının fazla olduğu alanlarda, tüm mikroorganizmaların duyarlılığı beraber değerlendirilirse anlamlı olarak negatif bir korelasyon

bulunmuş, ancak tek başlarına mikroorganizmaların duyarlılığıyla anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.<sup>129</sup>

Şu ana kadar biyosid duyarlılığıyla ilgili yapılmış en geniş çalışma Morrissey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in klinik izolatlarının klorheksidin, benzalkonyum klorür, triklosan ve sodyum hipoklorit için MİK ve MBK/MFK (minimal bakterisidal konsantrasyon/minimal fungisidal konsantrasyon) değerlerini belirlemişler ve bu değerlerin sonucunda 4 biyosid için etkenlere göre epidemiyolojik “cut off” değerleri (ECOFF) önermişlerdir.<sup>130</sup> Biyosid duyarlılığında belirlenmiş sınır değerler olmadığı için bu çalışma önemli bir yol gösterici olmuştur. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden klinik 200 *Candida albicans* izolatının en sık kullanılan 4 biyosid olan klorheksidin, benzalkonyum klorür, triklosan ve sodyum hipoklorite duyarlılıkları CLSI yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmamızda da kullandığımız klorheksidin (0.5-64 mg/L konsantrasyonları aralığında çalışılmıştır) için MİK<sub>50-90</sub> 8 mg/L, MFK<sub>50</sub> 8 mg/L, MFK<sub>90</sub> 16 mg/L; benzalkonyum klorür (0.5-128 mg/L konsantrasyonları aralığında çalışılmıştır) için MİK<sub>50-90</sub> 4 mg/L, MFK<sub>50</sub> 8 mg/L, MFK<sub>90</sub> 16 mg/L olarak bulunmuştur. Önerilen ECOFF değerleri ise klorheksidin için MİK 16 mg/L, MFK 32 mg/L; benzalkonyum klorür için MİK 16 mg/L, MFK 32 mg/L'dir.<sup>130</sup>

Bizim çalışmamızdaki 6 klinik *Candida albicans* izolatının klorheksidin duyarlılıkları 2-16 mg/L arasında; benzalkonyum klorür için 2-128 mg/L arasında

bulunmuştur. Morrissey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre<sup>130</sup> değerlendirdiğimizde; klorheksidin için MİK değeri 16 mg/L bulunan 4 klinik izolat ECOFF değerinde kabul edilmiş, MİK değerleri 2 mg/L ve 8 mg/L olan diğer iki köken klorheksidine duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Benzalkonyum klorür için ECOFF MİK değeri 16 mg/L olarak kabul edilmiş; MİK değerleri 128 mg/L olan 2 izolat duyarlılığı azalmış, MİK değeri 2 mg/L olan 1 izolat ve 4 mg/L olan 3 izolat ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

Dirençli mayaların varlığı, kombinasyon tedavilerinin kullanımını gündeme getirmiştir. Ancak antifungal ilaçların farklı etki mekanizmasına sahip ilaçlar ya da antimikrobiyal maddelerle kombinasyonları her zaman başarılı sonuçlar getirmemektedir, yan etkiler ve ilaç etkileşimleri artabilmektedir. Kombinasyon testlerinin uygulanmasında ve değerlendirilmesinde standart yöntemler bulunmadığından, literatürde testlerin sonuçlarında da çelişkili sonuçlar bulunabilmektedir.<sup>131</sup> İn vitro kombinasyon testlerinin sonuçlarının in vivo klinik uyumu da net değildir.<sup>61,132</sup>

İn vitro etkileşimler araştırılırken en sık kullanılan 2 yöntem dama tahtası yöntemi ile FİK indeks analizi ve zamana bağlı öldürme testleridir. Biz çalışmamızda dama tahtası yöntemi kullanarak etkileşimleri belirledik.

Literatürde mayalarda in vitro etkileşim çalışmaları araştırıldığında, çalışmaların çoğunlukla antifungal ilaçların farklı antifungallerle ya da antibiyotiklerle kombinasyonlarının üzerine olduğu görülmektedir.<sup>133,131</sup>

Chaturvedi ve arkadaşları yaptıkları çok merkezli çalışmada 5 *Candida* kökeninde (4 klinik, 1 standart suş), 6 antifungal ilacın (amfoterisin B, posakonazol, vorikonazol, anidulofungin, kaspofungin ve mikafungin) 15 farklı kombinasyonunu 8 ayrı laboratuvarda dama tahtası yöntemiyle araştırmışlardır. En çok sinerjistik etkileşimi amfoterisin B'nin dahil olduğu kombinasyonlarda bulmuşlardır, 15 farklı kombinasyonun hiçbirinde antagonizma saptamamışlardır. Laboratuvarlar arasındaki değerlendirmeleri de karşılaştırdıkları bu çalışmada, laboratuvarlar arasında standart bir kombinasyon test uygulamasının gerekliliğini belirtmişlerdir.<sup>134</sup>

Yalçın ve arkadaşları amfoterisin B ve moksifloksasin kombinasyonunun *Candida* türleri üzerine in vitro etkileşimini dama tahtası yöntemiyle araştırmışlar ve test ettikleri suşların çoğunluğunda sinerjistik etki görmüşlerdir.<sup>135</sup>

Sun ve arkadaşları 5 azol dirençli ve 5 azol duyarlı klinik *Candida albicans* kökeni ile yaptıkları bir çalışmada azol grubundan 3 ilaçla (flukonazol, vorikonazol, itrakonazol) tacrolimus arasındaki in vitro etkileşimi dama tahtası yöntemiyle araştırmışlardır. Sonuçta azol duyarlı kökenlerde sinerji ve indifferens etkiler birarada bulunabilirken, azol dirençli kökenlerde ilaçların arasında kuvvetli sinerji saptamışlar, bu sonuçlarını zamana bağlı öldürme testi ile de doğrulamışlardır.<sup>136</sup>

Biyosidler ve antifungaller klinik kullanımda (örneğin; oral kandidoz tedavisi) karşılaşabilmektedirler. Ancak, literatürde çalışmamızda olduğu gibi antifungallerle biyosidlerin etkileşimleri üzerine sınırlı sayıda yayın

bulunmaktadır. Bizde çalışmamızda bu kısıtlı sayıdaki literatüre katkı sağlamak amacıyla *Candida albicans* suşlarında, çok sık kullanılan iki biyosid olan klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün, klinikte sık kullanılan antifungal ilaçlar olan flukonazol ve nistatinle in vitro etkileşimlerini araştırmayı amaçladık.

Calamari ve arkadaşları oral kandidozlu 10 hastadan elde ettikleri *Candida albicans* izolatları ile yaptıkları çalışmada, klorheksidin, flukonazol, kitosan ve klorheksidin ve flukonazolün kitosanla kombinasyonlarının hücre yüzey hidrofobisitesi, germ tüp oluşumu, fosfolipaz aktivitesi üzerine etkileri ve postantifungal etkilerini araştırmışlardır. İlaçların tek başlarına virulans faktörleri üzerine etkileriyle, patojeniteyi azalttıklarını saptamışlardır; ancak kombinasyonlarda sinerjistik etki saptamamışlardır.<sup>137</sup>

Camus ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yoğun bakım ünitesinde yatan entübe hastaların bir grubuna hastane enfeksiyonlarının gelişimini önlemek için rutin bir dekontaminasyon protokolü uygulamışlardır. Bu yöntemi uyguladıkları hastaların yoğun bakımda yattıkları sürede her gün ağızlarına ve gastrik tüplerine kolistin, tobramisın ve amfoterisin B içeren bir süspansiyon, burunlarına mupirosin merhem uygulanmış, ayrıca ağız bakımları için klorheksidin içeren gargaralar kullanılmış ve vücut temizlikleri için de yine klorheksidin glukonat uygulanmıştır. Daha sonra bir çok ajanı bir arada içeren bu yöntemi uyguladıkları hastalarla, sadece standart bakım alan kontrol grubu hastalarda hastane enfeksiyonu gelişimleri değerlendirilmiştir. Sonuçta

dekontaminasyon protokolü uyguladıkları grupta, uygulanmayanlara göre enfeksiyon sayılarının çok daha az olduğu görülmüştür.<sup>138</sup>

Monteiro ve arkadaşları gümüş nanopartiküllerinin nistatin ve klorheksidin ile kombinasyonlarının *Candida albicans* ve *Candida glabrata* biyofilmleri üzerine in vitro antifungal etkinliklerini araştırmışlar ve gümüş nanopartiküllerinin nistatin veya klorheksidin ile kombinasyonunun sinerjistik etkili olduğunu tespit etmişlerdir.<sup>139</sup>

Chandra ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, diş köklerindeki *Candida albicans* üzerinde irrigasyon solüsyonları olarak kullanılan %5.25 NaOCl, %2 klorheksidin ve %17 EDTA'nın tek başlarına ve bu ajanların antifungal ilaç olarak %1 klotrimazole beraber kullanılmalarının etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Sonuçta; %5.25 NaOCl ve %2 klorheksidinin, %1 klotrimazole beraber kullanıldıklarında daha iyi bir antifungal etkinliğe sahip olduklarını belirlemişlerdir.<sup>140</sup>

Barkvoll ve Attramadal yaptıkları çalışmada, *Candida albicans*'ta klorheksidin glukonat ve nistatin kombinasyonunu in vitro olarak araştırmışlardır. Kombinasyon MİK değerlerini ilaçların tek başlarına MİK değerlerinden yüksek saptamışlar ve *Candida albicans*'ta klorheksidin glukonat ve nistatin kombinasyonunun uygulanmasının etkili olmadığını öne sürmüşlerdir.<sup>141</sup>

Yu ve arkadaşlarının 24 flukonazol dirençli klinik *Candida albicans* izolatu ile yaptıkları bir çalışmada, triklosan ve flukonazolün in vitro etkileşimini dama tahtası yöntemiyle incelemişler ve triklosan ile flukonazol arasında sinerjistik



etkileşim saptamışlardır. Sonuçlarını zamana bağlı öldürme yöntemi ve agar difüzyon testleriyle doğrulamışlardır.<sup>80</sup>

Higgins ve arkadaşları tarafından azol duyarlı *Candida albicans* izolatları ile yapılan çalışmada ise, triklosanın subinhibitör konsantrasyonlarında (0.5-2 mg/L) flukonazolü antagonize ettiğini saptamışlardır. Benzer şekilde 1 mg/L triklosanın ketokonazol, itrakonazol ve mikonazolü de antagonize ettiği; ancak amfoterinin B aktivitesi üzerine etki göstermediği saptanmıştır. Triklosanın flukonazol üzerine olan antagonistik etkisini ise özellikle *Candida albicans*'ın hifal formunda tespit etmişlerdir.<sup>142</sup>

Kratzer ve arkadaşları *Trichoderma* spp. ile yaptıkları çalışmada, amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, klorheksidin diglukonat ve Akacid plus arasındaki in vitro etkileşimleri dama tahtası yöntemiyle araştırmışlardır. Antifungal ilaçların kombinasyonlarında etkileşim saptanmazken; azollerle klorheksidin arasında sinerjistik etki saptanmıştır.<sup>81</sup> Bu çalışma farklı bir cins mantarla yapılmış olsa da, sonuçları bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur.

Biz çalışmamızda 3'ü azol dirençli, 3'ü azol duyarlı olmak üzere 6 klinik *Candida albicans* kökeni ve 1 standart kökende (ATCC 10231) flukonazol ve nistatinin, klorheksidin glukonat ve benzalkonyum klorür ile in vitro etkileşimlerini dama tahtası yöntemi kullanarak araştırdık. Flukonazol-klorheksidin kombinasyonu sonucunda azol dirençli kökenlerde sinerjistik etki tespit edilirken, azol duyarlı kökenlerde ise sonuçlar indifferens olarak bulunmuştur. Flukonazol-benzalkonyum klorür kombinasyonunda, benzalkonyum

klorür MİK değerlerinin yüksek olduğu 2 kökende antagonizma görülmüştür. Nistatin içeren kombinasyonlarda etkileşim bulunmamıştır.

Özellikle oral kandidozlu hastalarda flukonazol veya nistatin ile klorheksidin içeren ağız bakım ürünleri veya gargaraların kullanımları görülebilmektedir.<sup>139,143</sup> Klorheksidin ile karşılaşabilen bu antifungallerin etkileşimleri özellikle önem taşımaktadır.

İlaç kombinasyonlarında sinerjistik etkinin ortaya çıkmasını sağlayan temel 2 mekanizma; kombinasyonla direncin üstesinden gelmeleri ya da antifungal etkinliklerin artmasıdır. İlaçlardan birinin hücre membran geçirgenliğini arttırması, dışa atım pompası genlerinin inhibisyonuyla dışa atımın azalması, daha hızlı ve güçlü etkili bir ilacın maya sayısını azaltması kalan mayalara diğer ilacın etki etmesi, biyofilm oluşumunun inhibisyonu, farklı hedeflerin inhibisyonu gibi farklı mekanizmalar sonucu sinerjistik etki oluşabilmektedir.<sup>131,132</sup>

Çalışmamızdaki flukonazol dirençli *Candida albicans* kökenlerinin klorheksidin MİK değerleri de Morrissey ve arkadaşlarının çalışmasına göre<sup>130</sup> ECOFF değerindedir. Kombinasyon sonuçlarımız incelendiğinde hem flukonazol hem de klorheksidin MİK'leri yüksek olan bu kökenlerde, sinerjistik etkinin saptanmış olması dikkat çekmektedir. Flukonazol direncinde dışa atım pompaları ve hedef enzim değişikliği (hedef enzimi kodlayan genlerde mutasyon) önemli mekanizmalardır.<sup>9</sup> Klorheksidinin membran aktif bir ajan olarak membran geçirgenliğini değiştirerek ya da dışa atım pompaları üzerine etki ederek

kombinasyonda flukonazol dirençli kökenin direnci yenmesini sağlamış olabileceği düşünülebilir. Ancak kökenlerin direnç mekanizmalarının da araştırılması gerekmektedir.

İlaç kombinasyonlarında antagonistik etkinin ortaya çıkmasına; ilaçlardan birinin diğerinin hedefinde değişikliğe neden olması, aynı hedefe sahip olmaları nedeniyle kompetitif olarak bir ilacın etkisiz kalması ve bilinmeyen farklı mekanizmalar neden olabilmektedir.<sup>132</sup>

Çalışmamızda sadece benzalkonyum klorürün tek başına MİK değerinin çok yüksek olarak tespit edildiği flukonazol duyarlı 2 kökenin flukonazol-benzalkonyum klorür kombinasyonlarında antagonizma tespit edilmiştir. Özellikle flukonazolün tek başına MİK değerlerine göre, kombinasyondaki MİK değerleri bu 2 suşta yükselmesi dikkat çekmektedir. Benzalkonyum klorür duyarlılığının azalmasında dışa atım pompaları ve hücre membran değişiklikleri oldukça önemlidir.<sup>114,122</sup> Dışa atım pompaları flukonazol direncinde de oldukça önemli olup, antagonizmanın nedeni olabileceği düşünülmüştür.

Antifungal biyosid etkileşimleri konusunda daha fazla köken ve farklı türlerle yapılacak, ortaya çıkan etkileşimlerin mekanizmalarının da araştırılacağı daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamıza Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilen 3 tanesi flukonazol duyarlı, 3 tanesi ise flukonazol dirençli olmak üzere 6 klinik *Candida albicans* kökeni ile 1 standart *Candida albicans* kökeni (ATCC 10231) dahil edilmiştir.

Çalışmamızda *Candida albicans* kökenlerinde, çok sık kullanılan iki biyosid olan klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür ile klinikte sık kullanılan antifungal ilaçlar olan flukonazol ve nistatinin in vitro etkileşimleri dama tahtası yöntemi ile araştırılmış, etkileşimler fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeks analizine göre değerlendirilmiştir.

Flukonazol dirençli 3 kökende, flukonazol ve klorheksidin kombinasyonlarında sinerji tespit edilmiştir. Flukonazol duyarlı kökenlerde, flukonazol ve klorheksidin arasında etkileşim saptanmamıştır.

Benzalkonyum MİK değerleri yüksek olan flukonazol duyarlı 2 kökende, flukonazol ve benzalkonyum klorür arasında antagonizma saptanmıştır. Diğer kökenlerde flukonazol-benzalkonyum klorür arasında etkileşim görülmemiştir.

Nistatin içeren kombinasyonlarda etkileşim tespit edilmemiştir.

Antifungaller ve biyosidler arasındaki etkileşimleri ve ortaya çıkan etkileşimlerin mekanizmalarını ortaya koyabilecek daha geniş kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKÇA

1. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74 (4):323-331.
2. Muskett H, Shahin J, Eyres G, Harvey S, Rowan K et al. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: A systematic review. *Crit Care.* 2011;15 (6):R287.
3. Kuzucu Ç, Yetkin G, Çalışkan A. Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen candida türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Erciyes Tıp Derg.* 2007;29 (2):115-119.
4. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23 (2):253-273.
5. Marriott DJE, Playford EG, Chen S, et al. Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. *Crit Care.* 2009;13 (4):R115.
6. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, et al. Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43 (1):78-81.
7. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16 (5):445-452.

8. Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9 (16):2801-2816.
9. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125 (1 SUPPL.):S3-S13.
10. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, eds. Opportunistic Mycoses. In: *Murray: Medical Microbiology.* 7th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2013:675-696.
11. Russell A. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 (4):597-599.
12. Gubbins PO, Anaissie EJ. Antifungal therapy. In: Anaissie. EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, eds. *Clinical Mycology.* 2nd ed. Elsevier Inc.; 2009:161-195.
13. İlkit M. Yüzeyel Mikozların Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar. *ANKEM Derg.* 2000;14 (No.3):280-285.
14. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, eds. Antifungal agents. In: *Murray: Medical Microbiology.* 7th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2013:631-642.
15. Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: Opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* 2010;18 (5):195-204.
16. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49 (Suppl 1):7-10.

17. Mitchell T. Mycology. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA MT, ed. *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*. 26th ed. U.S.A.: McGraw Hill Companies; 2013:704-710.
18. Cohen BE. Amphotericin B membrane action: Role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol*. 2010;238:1-20.
19. Rex JH, Stevens DA. Drugs Active against Fungi , Pneumocystis and Microsporidia. In: Bennett JE, Dolin R, Blase MJ, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. Philadelphia: by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2015:479-494.
20. Godet C, Frat J, Roblot F, Cadranel J. Nebulised liposomal amphotericin B for Aspergillus lung diseases: case series and literature review. *Mycoses*. 2015;58:173-180.
21. Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today Technol*. 2014;11:65-71.
22. Thompson GR, Cadena J PT. Overview of Antifungal Agents. *Clin Chest Med*. 2009;30 (2):203-215. doi:10.1016/j.ccm.2009.02.001.
23. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10 (Suppl. 1):1-10.
24. Chen. S, Sorrell T. Antifungal agents. *Med J Aust*. 2007;187:404-409.
25. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis*. 2000;30 (4):653-657.
26. Sinnollareddy M, Peake SL, Roberts MS, Playford EG, Lipman J, Roberts JA. Pharmacokinetic evaluation of fluconazole in critically ill patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7 (11):1431-1440.

27. Castagnola E, Jacqz-Aigrain E, Kaguelidou F, et al. Fluconazole use and safety in the nursery. *Early Hum Dev.* 2012;88:S11-S15.
28. Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs.* 2011;71 (18):2405-2419.
29. Turner. K, Manzoni. P, Benjamin. D, CohenWolkowicz. M, Smith. B, Laughon. M. Fluconazole pharmacokinetics and safety in premature infants. *Curr Med Chem.* 2012;19 (27):4617-4620.
30. Manzoni P, Mostert M, Jacqz-Aigrain E, Farina D. The use of fluconazole in neonatal intensive care units. *Arch Dis Child.* 2009;94:983-987.
31. Cronin S, Chandrasekar PH. Safety of triazole antifungal drugs in patients with cancer. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:410-416.
32. Schiller DS, Fung HB. Posaconazole: An extended-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Ther.* 2007;29:1862-1886.
33. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, et al. A global evaluation of voriconazole activity tested against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63 (2):233-236.
34. Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad II. Posaconazole: A broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:775-785.
35. Bal AM. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:13-18.
36. Kofla G, Ruhnke M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011;16:159-166.



37. Chen SC, Slavin M, Sorrell T. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. *Drugs*. 2011;71 (1):11-41.
38. Kauffman CA. Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:483-488.
39. Watt K, Benjamin D, Cohenwolkowicz M. Pharmacokinetics of Antifungal Agents in Children. *Early Hum Dev*. 2011;87 (Suppl 1):861-865.
40. Wiederhold NP, Lewis JS. The echinocandin micafungin: a review of the pharmacology, spectrum of activity, clinical efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8:1155-1166.
41. Neoh CF, Slavin M, Chen SCA, Stewart K, Kong DCM. Echinocandins in the treatment of candidaemia and invasive candidiasis: Clinical and economic perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43 (3):207-214.
42. Castelli MV, Butassi E, Monteiro MC, Svetaz L a, Vicente F, Zacchino S a. Novel antifungal agents: a patent review (2011 - present). *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24 (3):323-338.
43. Jiménez-Ortigosa C, Paderu P, Motyl MR, Perlin DS. Enfumafungin derivative MK-3118 shows increased in vitro potency against clinical echinocandin-resistant candida species and aspergillus species isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58 (2):1248-1251.
44. Yeğenoğlu Y. Antifungal direnci gösteren mantarlar. *ANKEM Derg*. 2012;26 (Ek 2):254-260.
45. Sanglard D, Odds FC. Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002;2 (February):73-85.

46. Kanafani Z a, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46:120-128.
47. Dignani M, Solomkin JS, Anaissie EJ. Candida. In: Anaissie EJ, McGinnis M, Pfaller M, eds. *Clinical Mycology*. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2009:197-229.
48. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012;2012:1-26.
49. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol*. 2014;166 (April):471-484.
50. JingLin X, Polvi EJ, Shekhar-Guturja T, Cowen LE. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiol*. 2014;9 (4):523-542.
51. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis*. 2002;2 (September):550-563.
52. Parker JE, Warrilow AGS, Price CL, Mullins JGL, Kelly DE, Kelly SL. Resistance to antifungals that target CYP51. *J Chem Biol*. 2014;7:143-161.
53. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 2002;8 (2):76-81.
54. Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front Pharmacol*. 2014;5 (August):1-13.
55. Ostrosky-Zeichner L. Candida glabrata and FKS mutations: Witnessing the emergence of the true multidrug-resistant Candida. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1733-1734.
56. Morschhäuser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 2010;47 (2):94-106.

57. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, Blaß-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2007;3 (11):1603-1616.
58. Paul S, Moye-Rowley WS. Multidrug resistance in fungi: Regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol.* 2014;5 (April):1-14.
59. Kalkancı A. Antifungal Duyarlılık Testleri. In: Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö, eds. *Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar*. 2nd ed. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012:63-77.
60. Pfaller MA, McGinnis MR. The laboratory and clinical mycology. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, eds. *Clinical Mycology*. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2009:55-77.
61. Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: A global perspective on a variety of methods. *Mycoses.* 2010;53:1-11.
62. Arendrup M, Hope W, Lass-Flörl C, et al. EUCAST definitive document EDef 7.2 Revision: Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:1-21.
63. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role From the Clinical Laboratory Perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6:e2014030.
64. Cuenca-Estrella, M., Verweij PE, Arendrup MC et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:19-37.

65. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, et al. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: Should the clinical laboratory Be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57 (12):5836-5842.
66. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, et al. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73 (4):365-368.
67. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14 (4):643-658.
68. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77 (1):37-40.
69. Öz. Y, Akşit. F, Kiraz. N, Kiremitçi. A. *Candida albicans* izolatlarına karşı amfoterisin B ile flukonazol ve vorikonazol kombinasyonlarının in vitro etkinliği. *Mikrobiyol Bul.* 2008;42:149-155.
70. Steinbach WJ, Stevens DA, Denning DW. Combination and sequential antifungal therapy for invasive aspergillosis: review of published in vitro and in vivo interactions and 6281 clinical cases from 1966 to 2001. *Clin Infect Dis.* 2003;37 (Suppl 3):S188-S224.
71. Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17 (2):268-280.

72. Chaturvedi V, Ramani R, Ghannoum M a., et al. Multilaboratory testing of antifungal combinations against a quality control isolate of *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52 (4):1500-1502.
73. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy - What value are they? *J Antimicrob Chemother.* 2004;54 (5):854-869.
74. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42 (5):1207-1212.
75. Erdem GB. Zamana Bağlı Öldürme Yöntemi. In: Garcia L, Çev.Ed.Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, eds. *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*. 3rd ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2013:5.10.2.1-12.
76. Karatuna O. Sinerji Saptanması İçin Zamana Bağlı Öldürme Testi. In: Çev.Ed., Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, eds. *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*. 3.Baskı ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2013:5.10.3.1-6.
77. Koray GA. Sinerjizm Testi: Sıvı Mikrodilüsyon Dama Tahtası ve Sıvı Makrodilüsyon Metotları. In: Çev.Ed., Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, eds. *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı*. 3rd ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2013:5.12.1-23.
78. Özseven AG, Çetin ES, Özseven L. Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu? *Mikrobiyol Bul.* 2012;46 (3):410-420.
79. Sarıgüzel FM., Sümerkan. B, Metan. G. Karbapenem-Sefaperazon / Sulbaktam Kombinasyonlarının *Acinetobacter baumannii* Suşları Üzerine in vitro Aktivitesi. *Erciyes Tıp Derg.* 2010;32 (1):15-18.

80. Yu L, Ling G, Deng X, Jin J, Jin Q, Guo N. In vitro interaction between fluconazole and triclosan against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55 (7):3609-3612.
81. Kratzer C, Tobudic S, Schmoll M, Graninger W, Georgopoulos A. In vitro activity and synergism of amphotericin B, azoles and cationic antimicrobials against the emerging pathogen *Trichoderma* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58 (September):1058-1061.
82. Guo N, Wu X, Yu L, et al. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;58 (2):193-201.
83. Jin J, Guo N, Zhang J, et al. The synergy of honokiol and fluconazole against clinical isolates of azole-resistant *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol.* 2010;51 (3):351-357.
84. McDonnell G, Russell a. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12 (1):147-179.
85. Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis.* 2003;3 (12):794-803.
86. Russell AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2002; (31):121S - 135S.
87. Araújo P, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv.* 2011;3:826-834.

88. Eryılmaz. M, Akın. A. Dezenfeksiyon ve Antisepsi. *Ankara Ecz Fak Derg.* 2008;37 (4):311-331.
89. Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52 (5):750-763.
90. Weinstein RA, Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Chlorhexidine: Expanding the Armamentarium for Infection Control and Prevention. *Clin Infect Dis.* 2008;46 (2):274-281.
91. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: Is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67 (11):2547-2559.
92. Suci PA, Tyler BJ. A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. *J Microbiol Methods.* 2003;53 (3):313-325.
93. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:65-69.
94. Ellepola ANB, Joseph BK, Altarakemah Y, et al. In vitro Adhesion of Oral *Candida dubliniensis* Isolates to Acrylic Denture Surfaces following Brief Exposure to Sub-Cidal Concentrations of Polyenes, Azoles and Chlorhexidine. *Med Princ Pract.* 2015;24 (1):58-64.
95. Arzmi MH, Abdul Razak F, Yusoff Musa M, Himratul-Aznita WH. Effect of phenotypic switching on the biological properties and susceptibility to chlorhexidine in *Candida krusei* ATCC 14243. *FEMS Yeast Res.* 2012;12 (3):351-358.

96. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis.* 2001;7 (1):11-17.
97. Ellepola ANB, Joseph BK, Khan ZU. Changes in the cell surface hydrophobicity of oral candida albicans from smokers, diabetics, asthmatics, and healthy individuals following limited exposure to chlorhexidine gluconate. *Med Princ Pract.* 2013;22 (3):250-254.
98. Kadir T, Gümrü B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of Candida albicans isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol.* 2007;52 (7):691-696.
99. Ellepola ANB, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral Candida albicans from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexi. *Mycoses.* 2014;57 (9):553-559.
100. Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of Candida albicans biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Arch Oral Biol.* 2009;54 (6):588-594.
101. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of Candida albicans biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: A longitudinal study. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53 (2):383-385.
102. Théraud M, Bédouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol.* 2004;53 (10):1013-1018.



103. Anil S, Ellepola AN, Samaranayake LP. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis*. 2001;7 (2):119-122.
104. Günaydın M. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon ve Antisepsi. In: Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Çev.Ed., Başustaoğlu A, eds. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6th ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010:79-83.
105. McBain AJ, Ledder RG, Moore LE, Carl E, Gilbert P, Catrenich CE. Effects of Quaternary-Ammonium-Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility Effects of Quaternary-Ammonium-Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70 (6):3449-3456.
106. Özyurt M. Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Yöntemleri. *Klinik Derg*. 2000;13:41-48.
107. Özsoy MF, Öncül O, Pahsa A, Erdem H, Emekdağ G. Etil Alkol , Povidon İyod ve Benzalkonyum Klorürün *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarına Karşı Etkinliği. *Klinik Derg*. 2001;14 (1):30-32.
108. Chapman JS. Biocide resistance mechanisms. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2003;51:133-138.
109. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect*. 2004;57 (2):97-104.
110. Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R, Gálvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2013;162 (1):13-25.

111. Russell AD. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control*. 2001;29 (4):259-261.
112. Harbarth S, Tuan Soh S, Horner C, Wilcox MH. Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. *J Hosp Infect*. 2014;87 (4):194-202.
113. Maillard JY. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect*. 2007;65 (suppl. 2):60-72.
114. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56 (1):20-51.
115. Braoudaki M, Hilton AC. Adaptive Resistance to Biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents Adaptive Resistance to Biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J Clin Microbiol*. 2004;42 (1):73.
116. Nett JE, Guite KM, Ringeisen A, Holoyda KA, Andes DR. Reduced biocide susceptibility in Candida albicans biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52 (9):3411-3413.
117. Leung CY, Chan YC, Samaranayake LP, Seneviratne CJ. Biocide resistance of Candida and Escherichia coli biofilms is associated with higher antioxidative capacities. *J Hosp Infect*. 2012;81 (2):79-86.
118. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in Staphylococcus species. *Eur J Microbiol Immunol*. 2015;5 (1):44-61.

119. Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect*. 2012;81 (1):15-19.
120. Lee AS, MacEdo-Vinas M, Francois P, et al. Impact of combined low-level mupirocin and genotypic chlorhexidine resistance on persistent methicillin-resistant staphylococcus aureus carriage after decolonization therapy: A case-control study. *Clin Infect Dis*. 2011;52 (12):1422-1430.
121. Batra R, Cooper BS, Whiteley C, Patel AK, Wyncoll D, Edgeworth JD. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2010;50 (2):210-217.
122. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2003;51 (4):271-276.
123. Braga TM, Marujo PE, Pomba C, Lopes MFS. Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter QacZ in resistance to quaternary ammonium compounds. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66 (2):283-286.
124. Loughlin MF, Jones M V, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49 (4):631-639.
125. Nishi I, Sunada A, Toyokawa M, Asari S, Iwatani Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *J Infect Chemother*. 2009;15 (1):1-5.

126. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint Tables for Interpretation of MICs European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint Tables for Interpretation of MICs.*; 2014.
127. Edwards JE. *Candida Species*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. Philadelphia: by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2015:2879-2894.
128. Ryan G, Fain JM, Lovelace C, Gelotte KM. Effectiveness of ophthalmic solution preservatives: a comparison of latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride and travoprost with the sofZia preservative system. *BMC Ophthalmol*. 2011;11 (1):8.
129. Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect*. 2002;51 (3):201-206.
130. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One*. 2014;9 (1):e866669.
131. Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43 (5):395-402.
132. Uzun Ö. Antifungal Kombinasyon Tedavisi. *ANKEM Derg*. 2006;20 (Ek 2):36-37.

133. Chatzimoschou A, Katragkou A, Simitsopoulou M, et al. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55 (5):1968-1974.
134. Chaturvedi V, Ramani R, Andes D, et al. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55 (4):1543-1548.
135. Yalçın. B, Kalkancı. A, Gürelik. F, Fidan. I, Kuştimur. S, Özdek. Ş. Moksifloksasin ve Amfoterisin B Kombinasyonunun *Candida* Türleri Üzerine İn Vitro Sinerjistik Etkisi. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44:65-70.
136. Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L. In vitro interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52 (2):409-417.
137. Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16 (1):23-28.
138. Camus C, Salomon S, Bouchigny C, Al. GA et. Short-Term Decline in All-Cause Acquired Infections With the Routine Use of a Decontamination Regimen Combining Topical Polymyxin, Tobramycin, and Amphotericin B With Mupirocin and Chlorhexidine in the ICU: A Single- Center Experience. *Crit Care Med.* 2014;42 (5):1121-1130.
139. Monteiro DR, Silva S, Negri M, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses.* 2013;56 (6):672-680.

140. Chandra SS, Miglani R, Srinivasan MR, Indira R. Antifungal Efficacy of 5.25% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine Gluconate, and 17% EDTA With and Without an Antifungal Agent. *J Endod.* 2010;36 (4):675-678.
141. Barkvoll, P. Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;67:3:279-281.
142. Higgins J, Pinjon E, Oltean HN, et al. Triclosan Antagonizes Fluconazole Activity against *Candida albicans*. *J Dent Res.* 2012;91:65-70.
143. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11 (2):172-198.

## 8. ÖZET

Bağıışıklığı baskılanmış bireylerin sayısındaki artışla birlikte, fırsatçı mantar enfeksiyonları ve antifungal ilaç kullanımını da artırmıştır. *Candida albicans*, fırsatçı mantar enfeksiyonlarının en sık nedenidir. Ayrıca insanda deri, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde normal flora üyesi olarak da yer alabilir. Biyosidler, geniş spektrumlu antimikrobiyal maddelerdir. Antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılabilirler, kişisel bakım ürünlerinde, temizlik ürünlerinde bulunabilirler. Bu çalışmada, *Candida albicans* suşlarında, çok sık kullanılan iki biyosid olan klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün, klinikte sık kullanılan antifungal ilaçlar olan flukonazol ve nistatinle in vitro etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 3 flukonazol dirençli, 3 flukonazol duyarlı olmak üzere 6 klinik *Candida albicans* kökeni ve 1 standart *Candida albicans* kökeni (ATCC 10231) alınmıştır. Biyosid antifungal kombinasyonları için dama tahtası mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeks analizlerine göre in vitro etkileşim sonuçları değerlendirilmiştir. Flukonazol dirençli kökenlerin hepsinde, flukonazol klorheksidin kombinasyonlarında sinerjistik etki görülmüştür. Benzalkonyum klorür duyarlılığı azalmış flukonazol duyarlı 2 kökende, flukonazol benzalkonyum klorür kombinasyonlarında antagonizma görülmüştür. Nistatin içeren kombinasyonlarda etkileşim görülmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyosid-antifungal, dama tahtası, FİK, sinerji

## 9. SUMMARY

The incidence of opportunistic fungal infections and usage of antifungal drugs have significantly increased due to the raise in the number of immunocompromised patients. *Candida albicans* is the primary cause of opportunistic fungal infection in humans. Species of *Candida* are members of the human normal flora which are located in the skin, gastrointestinal tract and genitourinary tract of the human body. Biocides are compounds that exhibits a broad spectrum of antimicrobial activity. They are used for various purposes like antiseptics, disinfection and preservation. This study aimed to determine the in vitro interaction between nystatine and fluconazole, commonly used antifungal agents in the treatment of fungal infections, and the biocides of chlorhexidine digluconate and benzalkonium chloride against clinical isolates of *Candida albicans*. A total of six clinical isolates (three fluconazole resistant and three fluconazole susceptible ones) of *Candida albicans* were used in this study. *Candida albicans* ATCC 10231 strain was included also as a quality control. In vitro interactions were evaluated by the microdilution checkerboard technique and the results were analyzed by fractional inhibitory concentration (FIC) index. In this study, synergistic effects were detected in fluconazole-chlorhexidine digluconate combinations against fluconazole-resistant *C. albicans* strains. Antagonistic effects were detected in the fluconazole-benzalkonium chloride combinations in fluconazole susceptible and benzalkonium chloride resistant *C. albicans* strains.

**Key words:** Biocide-antifungal, checkerboard, FIC, synergy



## 10.ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Burçak  
**Soyadı** : Cömert Koçak  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Çanakkale-19.07.1985

**Eğitimi** : 2010-2015 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi.

2009-2010 Zonguldak Ereğli Verem Savaş Dispanserinde pratisyen  
hekimlik

2003-2009 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

1996-2003 Çanakkale Milli Piyango Anadolu Lisesi

1991-1996 Çanakkale Gazi İlkokulu

**Yabancı Dili** : İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:** Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği