

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN
TANIMLANMASINDA ve ANTİFUNGAL DUYARLILIĞININ
ARAŞTIRILMASINDA STANDART YÖNTEMLER İLE YENİ
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HAKAN ODABAŞI**

Samsun/2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN
TANIMLANMASINDA ve ANTİFUNGAL DUYARLILIĞININ
ARAŞTIRILMASINDA STANDART YÖNTEMLER İLE YENİ
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. HAKAN ODABAŞI

DANIŞMAN

PROF. DR. ASUMAN BİRİNCİ

Samsun/2016

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinden, çalışmaların yürütülmesine kadar her aşamada bilgi ve desteğinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'YE, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım ilk günden itibaren sürekli destek ve teşviklerini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, uzmanlık eğitimimde büyük katkısı bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a, Prof. Dr. Ahmet Y. ÇOBAN'a, Doç. Dr. Adil KARADAĞ'a, Yrd. Doç. Keramettin YANIK'a ve Yrd. Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca ve her ihtiyaç duyduğumda hem maddi hem manevi desteğini hiç esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kemal BİLGİN'e de ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamda ve uzmanlık eğitimim boyunca büyük desteklerini gördüğüm, bilgi ve becerilerime katkı sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvar çalışanlarına; uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca buraya kadar gelmemde büyük emeği olan aileme, en zor dönemlerimde bana destek olan, sabır gösteren eşim Neslihan ODABAŞI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından PYO.TIP1904.14.014 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.2 <i>Candida</i> 'ların patogonezi	5
2.3 Kandidemide laboratuvar tanı	7
2.3.1 Kültür	7
2.3.2 <i>Candida</i> 'ların identifikasyonu	7
2.3.2.1 Germ tüp testi	8
2.3.2.2 Hif/Pseudohif, Blastaspor ve Klamidospor yapımı	8
2.3.2.3 Biyokimyasal testler	10
2.3.2.3.1 Asimilason ve fermantasyon testleri	10
2.3.2.3.2 Üreaz testi	11
2.3.2.3.3 Hızlı Trehaloz testi	11
2.3.2.3.4 Kromojenik Besiyerleri	12
2.3.3 Kültür dışı tanı yöntemleri	12
2.3.3.1 Serolojik testler	13
2.3.3.2 Moleküler Tanı Yöntemleri	13
2.3.3.3 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI-TOF MS)	14

2.4	Antifungaller	15
2.4.1	AMB ve lipit formülasyonları	16
2.4.2	Azoller	18
2.4.2.1	Flukonazol	19
2.4.2.2	İtrakonazol	20
2.4.2.3	Vorikonazol	21
2.4.3	Ekinokandinler	22
2.5	Antifungal duyarlılık testleri	23
2.5.1	Referans Antifungal Duyarlılık Yöntemleri	24
2.5.2	Antifungal duyarlılığı belirlemede kullanılan diğer yöntemler	25
3	MATERYAL METOD	28
3.1	İzolatlar	28
3.2	İzolasyon ve tanımlama	28
3.2.1	Germ Tüp Testi	28
3.2.2	Pirinç Ekstresi-Tween 80 Agar	28
3.2.3	Kromojenik Besiyeri	29
3.3	Standart antifungal duyarlılık testi	29
3.3.1	Besiyerinin hazırlanması	29
3.3.2	Antifungal stok solüsyonlarının hazırlanması	29
3.3.3	Mikrodilüsyon için plakların hazırlanması	30
3.3.4	İnokulum	32
3.3.5	MİK Değerlerinin Saptanması	34
3.4	Sensititre YeastOne ile antifungal çalışılması	35
3.4.1	Antifungallere göre MİK değerlendirme kriterleri	36
3.5	Veri Analizi	37
4	BULGULAR	39

5	TARTIŞMA	49
6	SONUÇLAR	62
7	KAYNAKLAR	64



TABLO LİSTESİ

Tablo I: Kandidemi riskini arttıran faktörler	6
Tablo II: <i>Candida</i> tanımlanmasında kullanılan bazı ticari yöntemler	12
Tablo III: Kullanımda veya gelişim aşamasında olan sistemik etkili antifungaller	16
Tablo IV: <i>Candida</i> 'larda kullanılan duyarlılık yöntemleri	27
Tablo V: Flukonazol için seri dilüsyonların hazırlanması	31
Tablo VI: AMB, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin için seri dilüsyonların hazırlanması	31
Tablo VII: <i>Candida</i> türlerinin antifungal ilaçlara göre MİK ($\mu\text{g/ml}$) duyarlılık sınır değerleri	35
Tablo VIII: <i>Candida</i> türlerinin dağılımı ve yüzdeleri	39
Tablo IX: Vitek MS ve konvansiyonel yöntemler ile tanımlamanın karşılaştırılma sonuçları.	39
Tablo X: <i>C. albicans</i> suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri.	40
Tablo XI: <i>C. parapsilosis</i> suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre Yeastone mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri	43
Tablo XII: <i>C. glabrata</i> suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre Yeastone mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri	43
Tablo XIII: <i>C. tropicalis</i> , <i>C. kefyr</i> ve <i>C lusitaniae</i> , suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri	45
Tablo XIV: <i>Candida</i> türlerinin antifungaller için her iki yöntemde MİK 50 ve MİK 90 değerleri.	46
Tablo XV: <i>Candida</i> türlerinde referans mikrodilüsyon ile Sensititre YeastOne arasındaki direnç durumları	47
Tablo XVI: Türlerle göre antifungallerin Hata, EU ve KU oranları	48
Tablo XVII: Amfoterisin B için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$) değerleri:	54
Tablo XVIII: Kaspofungin için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$) değerleri:	55
Tablo XIX: Flukonazol için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$)	

değerleri:	57
Tablo XX: Vorikonazol için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$)	
değerleri:	58
Tablo XXI: İtrakonazol için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$)	
değerleri:	59



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Germ tüp testi (çalışmamızdan) <i>C. albicans</i> (a), <i>C. tropicalis</i> (b)	8
Şekil 2: Pirin ektresi Tween 80 besiyerindeki <i>Candida</i> türlerinin mikroskopik görüntüleri (Çalışmamızdan)	10
Şekil 3: Mikroplak kuyucuklarındaki amfoterisin B, vorikonazol ve itrakonazol için final konsantrasyonları	32
Şekil 4: Kaspofungin için final konsantrasyonları	33
Şekil 5: Flukonazol için final konsantrasyonu	33
Şekil 6: Kuyucuklardaki bulanıklığın değerlendirilmesinde kullanılan ayna (çalışmamızdan)	34
Şekil 7: Sensititre YeastOne mikroplağı	36
Şekil 8: Sensititre YeastOne'da AMB MİK okunması(MCS-Diagnostics., 2012)	36
Şekil 9: Sensititre YeastOne'da azol grubu antifunagallerin MİK okunması (MCS-Diagnostics., 2012)	37
Şekil 10: Sensititre YeastOne'da kaspofungin MİK okunması (MCS-Diagnostics., 2012)	37

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADT	: Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri
AMB	: Amfoterisin B
BH	: Büyük hata
BK	: Besiyeri kontrolü
BOS	:Beyin-omurilik sıvısı
C	: <i>Candida</i>
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇBH	: Çok büyük hata
DMSO	:Dimetil sülfoksit
EMB	:Eosin-methylene blue
EU	: Esansiyel uyum
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
FLC	: Flukonazol
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
İTR	: İtrakonazol
KAS	: Kaspofungin
KH	: Küçük hata
KU	: Kategorik uyum
MALDI-TOF MS:	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight

MİK 50	: Suşları %50'sini inhibe eden konsantrasyon
MİK 90	: Suşları %90'sini inhibe eden konsantrasyon
MİK	: Minimum ihhibitör konsantrasyon
PNA-FISH	: Peptide Nucleic Acid Fluorescence İn Situ Hybridization
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
ÜK	: Üreme kontrolü
VOR	: Vorikonazol



ÖZET

Kan Kültürlerinde Üreyen Candida Türlerinin Tanımlanmasında ve Antifungal Duyarlılığının Araştırılmasında Standart Yöntemler İle Yeni Yöntemlerin Karşılaştırılması

İnvaziv Candida enfeksiyonlarının erken ve doğru tanımlanması ve antifungal duyarlılık testlerinin erken ve doğru olarak verilmesi, morbidite ve mortaliteyi azaltmak için önemli bir değere sahiptir. Kültür sonucunda üreyen Candida türlerinin tanımlanması ve antifungal duyarlılığın çalışılması 3-4 gün sürmektedir. Bu sürenin kısaltılması etkin tedavi açısından önemlidir. Bu nedenle yeni alternatif tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda invaziv kandidemi nedeni olan *Candida* türlerinin tanımlanmasında yeni bir sistem olan MALDI-TOF MS(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry) ile tanımlanması ve sonuçların konvansiyonel sistemler ile karşılaştırılması, antifungal duyarlılık için yeni bir sistem olan Sensititre Yeastone (Trek Diagnostic System) antifungal duyarlılık kiti ile çalışılıp sonuçların altın standart test olan mikrodilüsyon metoduyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

OMÜ Tıp Fak. Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, değişik servislere yatan hasta kan örneklerinden izole edilen 71 *Candida* suşu çalışmaya alındı. Tür tayini germ tüp testi, kromojenik besiyeri ve pirinç ekstresi-Tween 80 agar kullanılarak yapıldı. Tür tayini sonucu göre; 37'si (%52,1) *C. albicans*, 34'ü (%47,9) non-*albicans Candida* (20 *C. parapsilosis*, 7 *C. glabrata*, 4 *C. tropicalis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. lusitaniae*) olarak tanımlandı. Konvansiyonel yöntem ile tanımlanmış tüm suşların Vitek MS ile de tanımlaması yapıldı ve konvansiyonel yöntemlerle %100 uyumlu bulundu.

İzolaların amfoterisin B, kaspofungin, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol'e duyarlılıkları referans yöntem ve Sensititre YeastOne mikroplak yöntemi araştırıldı. Referans mikrodilüsyon yöntemi ile Sensititre YeastOne mikroplak yöntemi arasındaki esansiyel uyum oranları tüm *Candida* türleri arasında amfoterisin B'de %94,4, flukonazol %92,9, kaspofungin %100, itrakonazol %94,4 vorikonazol'de %98,6 olarak saptanmıştır. Referans mikrodilüsyon yöntemi ile Sensititre YeastOne mikroplak

yöntemi arasındaki kategorik uyum oranları kaspofungin için %100, flukonazol için %97,1 vorikonazol için %100 olarak tespit ettik

Anahtar Kelime: *Candida* spp., antifungal, MALDI-TOF MS, Sensititre YeastOne, mikrodilüsyon



ABSTRACT

Comparison of Conventional Methods and New Methods in Identification and Antifungal susceptibility of *Candida* spp. from Blood cultures

Early and accurate identification and antifungal susceptibility of invasive candida infections have a significant value in order to reduce morbidity and mortality. After the cultivation, identification and antifungal susceptibility of *Candida* species lasts for 3-4 days. It is important to shorten the time for the treatment of infections. Therefore, new alternative methods are needed for identification and antibiotic susceptibility testing.

In this study, it is aimed to compare MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry) which is a new method in identification of *Candida* spp. and conventional methods in identification of *Candida* spp. from invasive infections and furthermore to compare Sensititre Yeastone (Trek Diagnostic System) a new method for testing antifungal susceptibility with microdilution method which is a gold standart for determination of antifungal susceptibility.

Seventy-one *Candida* strains isolated from blood samples of the patients staying in different services at Ondokuz Mayıs University, Medical Faculty Hospital Medical Microbiology Laboratory were included in the study. Species identification germ tube test was made using chromogenic medium and brass extract-Tween 80 agar. According to species identification result, 37 of the species (52.1%) were identified as *C. albicans* and 34 of them (47.9%) were identified as non-albicans *Candida* (20 *C. parapsilosis*, 7 *C. glabrata*, 4 *C. tropicalis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. lusitaniae*). All conventionally identified strains were also identified with Vitek MS and they were 100% compatible with conventional methods.

Sensitivity of isolates to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole was examined with reference method and Sensititre YeastOne microplate method. Essential agreement ratios between the reference microdilution method and the Sensititre YeastOne microplate method were detected as 94.4% in amphotericin B, 92.9% in fluconazole, 100% in caspofungin, 94.4% in itraconazole, and 98.6% in voriconazole among all *Candida* species. Categorical agreement ratios

between reference microdilution method and Sensititre YeastOne mikroplate method were detected as 100% for caspofungin, 97.1% for fluconazole, and 100% for voriconazole.

Key words: *Candida* spp., antifungal, MALDI-TOF MS, Sensititre YeastOne, microdilution



1 GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunur ayrıca insanların ve hayvanların deri, mukoza ve gastrointestinal sisteminin normal florasında bulunabilirler. *Candida*'lar daha çok immüniteleri baskılanmış, uzun süre hastanede yatan hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara sebep olurlar (Dignani, Solomkin, Anaissie, 2009; Ener, 1999; Hazen ve Howell, 2007; T. Tümbay, 1999). Günümüzde yaklaşık 200 *Candida* türü tanımlanmıştır. En sık hastalık nedeni olan türler ise; *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* ve *C. tropicalis*'tir (Hazen ve Howell, 2007).

Son 20 yılda kandidemi insidansı giderek artmıştır. *Human Immunodeficiency Virus* enfeksiyonuna (HIV) veya immünsupresif ilaç kullanımına bağlı immün yetmezlikli hasta sayısının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanılması, kateter ve protez gibi yabancı cisimlerin daha sık uygulanması, majör cerrahi girişimlerin daha fazla yapılması, yoğun bakım ünitelerinde genel durumu bozuk hastaların uzun süre takip edilmesi bu artışın önemli nedenleridir. (Akalin, 2008; Edwards, 2015; Ener, 1999; Fridkin ve Jarvis, 1996; Ural, 2004).

Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında etken mikroorganizmalar arasında *Candida* türleri dördüncü sırada yer almaktadır (Majid ve Ali, 2009; Pappas ve Mycoses Study, 2011). *C. albicans*, kandideminin en sık sebebidir. Hem profilaksi de hem de tedavide yoğun olarak antifungallerin kullanılması sonucunda antifungallere dirençli veya az duyarlı non-*albicans* türlerinin sayısı giderek artmaktadır (Ener, 1999; Fridkin, 2005; Majid ve Ali, 2009; Maschmeyer, 2006; Ostrosky-Zeichner ve Pappas, 2006; M. A. Pfaller ve ark., 2007; Şahin ve ark., 2006). Ayrıca invaziv *Candida* enfeksiyonlarının, erken tanı ve tedavisindeki yetersizliklere bağlı olarak diğer enfeksiyon türlerine göre morbiditesi ve mortalitesi daha yüksektir (Gubbins, 2011).

Kandideminin erken tanısı ve antifungal duyarlılık testlerinin erken sonuçlandırılması, morbidite ve mortalitenin azaltılmasında önemli bir basamaktır (M. Cuenca-Estrella ve ark., 2012; Garey ve ark., 2006). *Candida* türlerinin tanımlanması, antifungal duyarlılığının çalışılması uzun ve zahmetlidir. Bu sürenin kısaltılması etkin

tedavi açısından önemlidir. *Candida* türlerinin tanımlanmasında en sık olarak konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile tanımlama 72 saate kadar uzayabilmektedir (Çerikçioğlu ve Sancak, 2008; Neppelenbroek ve ark., 2014). *Candida*'larda antifungal duyarlılığının araştırılmasında altın standart test olan mikrodilüsyon metodunun çalışılması ve yorumlanması zordur. Ayrıca sonuçlanması 2 güne kadar uzayabilmektedir. Bu nedenle yeni alternatif tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) 1990 yıllarının başında kullanıma girmiş olup son 3-4 yıldır mikrobiyolojide kullanılmaya başlanmıştır. MALDI-TOF MS; mikroorganizmanın protein profilini çıkarılabilmekte, bu profillerin referans bir spektra ile karşılaştırılması sonucu ile mikroorganizmalar kolaylıkla tanımlanabilmektedirler (Akyar, 2011). Tanımlama dakikalar içinde sonuçlanmaktadır. Bu sayede *Candida* 'lar için tanımlamayı 3-4 günden birkaç dakikaya indirmektedir.

Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic System, USA); kolorimetrik indikatör içeren, 9 antifungalin dilüsyon metoduna uygun olarak dozları ayarlanmış bir mikrodilüsyon plağıdır. Bu sistem antifungal duyarlılık sonucunun rapor edilmesini bir güne indirmektedir. Ayrıca bu yöntemin yorumlanması mikrodilüsyon metoduna göre çok daha kolaydır (Vijgen ve ark., 2011).

Çalışmamızda kandidemi nedeni olan *Candida* türlerinin; yeni bir sistem olan Vitec MS (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanarak konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılması ve antifungal duyarlılıklarının araştırılmasında standart test olan mikrodilüsyon metoduyla yeni bir yöntem olan Sensititre YeastOne'nın karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 *Candida* türlerinin genel özellikleri

Mantarlar; duvar yapısında kitin, kitosan, mannan ve glukon polisakkarit polimerleri içeren tek hücreli veya çok hücreli ökaryotik, hetetrofik organizmalar olup dış ortamda özellikle çürümekte olan besinlerde, suda, toprakta yaygın olarak bulunurlar (Calderone ve Braun, 1991; Çerikçioğlu ve Sancak, 2008; Dignanive ark., 2009; İnci, 1999; Warnock, 2007). Morfolojik yapılarına göre mantarlar, maya ve küf olarak ikiye ayrılırlar (İnci, 1999). Küfler; çok hücreli, septalı veya septasız hif yapılarından meydana gelirken, mayalar ise tek hücreli tomurcuklanan blastasporlardan oluşur (Çerikçioğlu ve Sancak, 2008; İnci, 1999; Warnock, 2007).

İnsanda en sık hastalık nedeni olan mantarlar *Candida*'lardır. *Candida*'lar *Ascomycota* sınıfındaki *Saccharomycetaceae* ailesindedir (Dignanive ark., 2009). *C. albicans*, en sık izole edilen türdür ve mukoza enfeksiyonlarının %90-100'ünün, kan dolaşımı enfeksiyonlarının ise %50-70'inin sebebidir (E. Tümbay, 2010). Enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan diğer türler; daha çok olarak *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* daha az sıklıkla, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. utilis* ve *C. zeylanoides*'tir (Dignanive ark., 2009).

Candida'lar tek hücreli olup klinik örneklerde ve kültürlerde mikroskopik olarak 4-6 µm çapında, gram pozitif olarak boyanan, yuvarlak veya oval, tomurcuklanan hücreler (blastakonidiyum veya blastasporlar) olarak görünürler (Ener, 2008; T. Tümbay, 1999). Özellikle antimikrobiyal kullanımı sonrasında ileri derecede plemorfizm gösterebilirler. Bu blastasporlar uç uca uzanarak birleşmesi sonucunda pseudohif oluştururlar (Çerikçioğlu ve Sancak, 2008; Hazen ve Howell, 2007; İnci, 1999; Warnock, 2007). Gerçek hifte boğumlar bulunmazken pseudohifte ise boğumlar bulunur. *C. glabrata*, pseudohif oluşturmazken, *Candida albicans*, *C. dubliniensis* türleri pseudohifin yanında gerçek hif de oluşturabilir (Dignanive ark., 2009). Pseudohif *Candida*'ların dokulara invazyonunu arttırmaktadır (Çerikçioğlu ve Sancak, 2008;

Dignanive ark., 2009).

Candida 'lar, aerop ortamda, 35°C'de mikrobiyolojide kullanılan genel üretim besiyerlerinde veya mantarlar için seçici besiyerlerinde üreyebilirler. *Candida* kolonileri 24 saat içerisinde oluşmuş olsa bile kolonilerin belirginleşmesi için en az 48 saat beklemek gerekmektedir. *Candida* 'lar için primer seçici besiyeri (pH5,6) Sabouraud dekstroz agar (SDA)'dır. Ayrıca besiyerinin içerisine çeşitli antibiyotikler (kloramfenikol, gentamisin) katılıp bakterilerin üremesi engellenebilir. *Candida* 'lar kültürlerde kirli beyaz krem renginde, yumuşak kıvamlı, tipik olarak maya kokan, düzgün yüzeyli veya göbekli, uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak koloniler oluştururlar (Çerikçioğlu, 2008; Dignanive ark., 2009; Ener, 2008; Hazen ve Howell, 2007; İnci, 1999).

Türler arasındaki morfolojik ayırım; mısır unlu -Tween 80 agara veya pirinç ektresi-Tween 80 besiyerine ekilip yalancı hifin, gerçek hifin, blastakonidiyumların şekil ve yapılarına, klamidiospor oluşturup oluşturmadığına bakılarak yapılır (Dignanive ark., 2009; T. Tümbay, 1999). Ayrıca germ tüp testi *C. albicans* 'ı diğer *Candida* türlerinden ayırt edebilir. Ancak *C. dubliniensis* ve *C. stellatoidea* türleri de germ tüp oluşturabilmektedir (Dignanive ark., 2009).

Hücre duvar yapısının %80-90'ı karbonhidratlardan, %5-15'i proteinlerden ve %2-5'i lipitlerden oluşur. Karbonhidratların ise %20-30'u mannoptein, %50-60'ı β -glukan ve %0,6-9'u kitin yapısındadır. Hücre duvarı, maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) doğrudan görevlidir. Duvar yapısında bulunan bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazı maddeler de aynı zamanda immünolojik determinant taşır (Çerikçioğlu, 2008; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2004; Yiğit ve Benli, 2005).

Tüm mantarlarda olduğu gibi, *Candida* 'ların da hücre membranında bulunan sterol, membran lipidlerinin %20 sini oluşturur. Sterolün %95 i ergosterol formundadır. Ergosterol, antifungal ilaçlar için en önemli hedeftir. Hücre membranı, taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde rol alır. Ayrıca *C. albicans* 'ın sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alırlar (Çerikçioğlu, 2008).

2.2 *Candida*'ların patogenezi

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunduğu gibi, insanın GİS (gastrointestinal sistem), deri, mukoza, vajina ve üretranın normal flora üyeleri arasındadırlar (Dignanive ark., 2009; Hazen ve Howell, 2007; E. Tümbay, 2010; T. Tümbay, 1999). İmmünolojik olarak sağlıklı bireyler, çevresindeki ve normal florasında bulunan mantarlar ile sürekli olarak maruz kalmalarına karşın fungal enfeksiyon geçirme ihtimalleri çok düşüktür. *Candida* türleri daha çok immünesi bozulmuş ve predispozan faktörlerin varlığında fırsatçı enfeksiyon sebebi olarak karşımıza çıkarlar. *Candida*'ların ayrıca kendilerine ait virülans faktörleri de enfeksiyon açısından önemlidir (Saraçlı, 2010).

Candida türleri, her türlü enfeksiyona sebep olabilmekle birlikte toplumda daha çok yüzeysel enfeksiyonlara neden olurlarken; hastanede yatan, genel durumu bozuk hastalarda lokal veya sistemik ciddi enfeksiyonlara neden olurlar (Ener, 1999).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının en sık sebebi olan kandidemi; kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir veya daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi demektir. Diğer sepsis etkenlerinde de olduğu gibi en sık rastlanan belirtisi yüksek ateştir. Diğer sepsis etkenlerinden ayrımı zordur. (Çerikçioğlu, 2008). Kandidemi, mortaliteyi %40-60 yükselmekte ve hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzatmaktadır (Ural, 2004). Kandidemi gelişimi için başlıca risk faktörleri; uzun süre hastanede yatış, antibiyotik tedavisi, damar içi kateterlerin kullanılması, hastanın immün sistemini baskılayıcı sebeplerdir (Giri ve Kindo, 2012). Bu risk faktörleri ayrıntılı olarak tablo I 'de gösterilmiştir (Ener, 1999).

Candida'lar normal florada ve özellikle GİS'de bulunduğundan dolayı enfeksiyonlar daha çok endojen kaynaklı olmakla birlikte eksojen kaynaklı da olabilir. (Edwards, 2015; E. Tümbay, 2010; T. Tümbay, 1999). *Candida*'ların sebep olduğu endojen kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında, öncelikle *Candida*'ların gastrointestinal kanalda sayıca artıp kolonize olmaları gerekmektedir. Alta yatan kronik hastalıklar, yoğun bakım veya yanık ünitesinde bulunmak, immünesüpresif tedavi almak, geniş spektrumlu çoklu antibiyotik kullanmak *Candida*'ların hem endojen kolonizasyonunu hem de invazyonunu kolaylaştırır (Ural, 2004). Eksojen bulaşta ise; sağlık personelinin veya hasta yakınlarının elleri, kullanılan tıbbi araçlar (kateter gibi),

kontamine sıvılar ve beslenme solüsyonları rol oynar (P Munoz, BurilloBouza, 2001; E. Tümbay, 2010; T. Tümbay, 1999; Ural, 2004). Gastrointestinal mukozayı geçerek veya başka yolla (kontamine vasküler kateterler) kana ulaşan *Candida*, fagositik etkinliği yetersiz olan hastalarda kanda çoğalıp tüm organlara yayılabilir (Saraçlı, 2010; T. Tümbay, 1999).

Tablo I: Kandidemi riskini arttıran faktörler

Gastrointestinal kolonizasyonun artmasına sebep olan faktörler

- Antibiyotik kullanılması
- Antiasid veya simetidin tedavisi
- İleus
- Diyareler

Parantral beslenme

Sistemik konak savunmasının bozulmasına neden olan faktörler

- Kortikosteroid tedavisi
- Nötropeni
- Diabetes mellitus
- Böbrek yetmezliği
- Malign hastalıklar
- İleri yaş

İyatrojenik faktörler

- Santral venöz kateter
 - Arteryal kateter
 - Uzun süren cerrahi girişimler(abdominal veya kardiyak)
 - Üriner kateterler
-

Candida enfeksiyonunda konak faktörlerinin haricinde; germ tüp oluşturma, adezyonu sağlayan moleküller, hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, biyofilm oluşturmaya, maya hif dimorfizmi, fenotipik değişim, hidrolitik enzimlere sahip olması, hücre duvarındaki bulunan moleküller gibi virülans faktörleri de etkilidir (Calderone ve Fonzi, 2001; Çerikçioğlu, 2008; Çeriklioğlu, 2012; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2004; Yang, 2003).

2.3 Kandidemide laboratuvar tanı

2.3.1 Kültür

Kandideminin tespitinde altın standart test, pozitif kan kültüründen *Candida*'nın üretilmesidir (Kauffman, MarrThorner, 2015; Ostrosky-Zeichner, 2012). Kandideminin tespitinde en duyarlı yöntem ise lizis santrifüj yöntemidir. Ancak yeni geliştirilen BACTEC ve Bact/ALERT otomatize kan kültürü sistemlerinin de duyarlılığı lizis santrifüj yönteminin duyarlılığına yakındır (Dignanive ark., 2009; Iwen, 2011; Kauffmanve ark., 2015; Michael A Pfaller, 2015). *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* 3-4 günde ürerken; *C. crusei* ve *C. glabrata* daha uzun sürede üremektedir. Bundan dolayı kan kültürü şişelerinin 2 haftaya kadar inkübasyonu uzatılmalıdır (Dignanive ark., 2009). Kandan mantar izolasyon başarısı; alınan kanın miktarına, örnek sayısına ve kullanılan yönteme bağlı olarak değişir (Croxatto, Prod'homGreub, 2012; Michael A Pfaller, 2015).

Kan kültüründe üreme olduğunda, ilk izolasyon için en sık SDA besiyeri olmak üzere, %5 koyun kanlı agar gibi rutin besiyerleri de kullanılabilir (Sutton, 2007). Kloromfenikol, gentamisin, penisilin, streptomisin ve siprofloksasin bakterilerin üremesini engellemek için besiyerine katılabilir (Sutton, 2007; Yıldiran, 1999). Özellikle saprofit mantarların üremesini engelleyen sikloheksimid, bazı *Candida* türlerinin de üremesini inhibe ettiğinden dolayı besiyerlerine katılmamalıdır (Dignanive ark., 2009; Sutton, 2007). Ayrıca primer besiyeri olarak SDA haricinde patates dekstroz agar, Mycosel veya Mycobiotic agar gibi mantara spesifik besiyerleri de kullanılabilir (Yıldiran, 1999).

Ekim yapılan besiyerleri oda ısısında ve 37°C de 48-72 saat inkübe edilmelidirler. Oluşan kolonilerden gram boyama yapılarak organizmanın maya olup olmadığı kontrol edilmelidir (Hazen ve Howell, 2007; T. Tümbay, 1999).

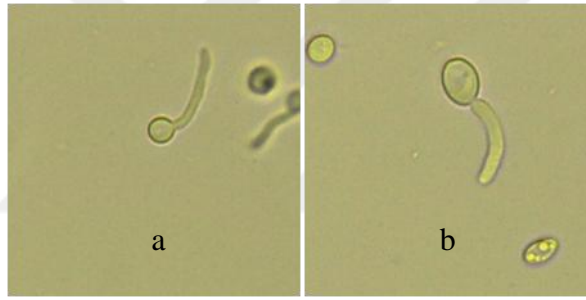
2.3.2 *Candida*'ların identifikasyonu

Günümüzde klinik örneklerden *Candida* türlerinin identifikasyonu için birçok farklı yöntem vardır. Bu yöntemler sırasıyla; geleneksel yöntemler (germ tüp testi, *Candida*'nın morfolojik özellikleri ve karbonhidrat kullanımını ölçen testler), hızlı tanı yöntemleri (enzimatik ve florojenik testler), ticari otomatik sistemler ve son

zamanlardaki moleküler teknikler olarak sayılabilir (Neppelenbroekve ark., 2014)

2.3.2.1 Germ tüp testi

Germ tüp testi *C. albicans*'in tanımlanmasındaki ilk yöntemdir. Klinik örneklerden saptanan *C. albicans* izolatları; insan veya hayvan serumunda 37 C de 2-3 saat inkübe edildiklerinde germ tüp oluşturmaktadır. *C. albicans*'in oluşturmuş olduğu gerçek germ tüp, maya hücrelerinden direkt oluşan ve kısa hif baŐlangıcında daralma olmayan uzantı Őeklindeki yapıdır (Sekil 1a). *C. tropicalis*'in oluşturmuş olduğu yalancı germ tüp ise başlangıç noktasında boğumlanma gösterir (Şekil 1b) (Hazen ve Howell, 2007; Neppelenbroekve ark., 2014; Yıldıran, 1999). Ayrıca *C. dubliniensis* ve *C. stellatoidea* türleri de germ tüp oluşturabilmektedir (Dignanive ark., 2009). Bakteri kontaminasyonunun olması ve yoğun miktardaki maya inokülasyonu germ tüp oluşumunu bozabilir (Hazen ve Howell, 2007; Yıldıran, 1999).



Şekil 1: Germ tüp testi ( alıŐmamızdan) *C. albicans* (a), *C. tropicalis* (b)

2.3.2.2 Hif/Pseudohif, Blastaspor ve Klamidospor yapımı

Candida ların mikroskopik yapılarından olan hif, pseudohif, blastaspor ve klamidiospor yapılarının gösterilmesi cins ve tür düzeyinde tanı amacı ile kullanılabilir (Yıldıran, 1999). Bu yapıların değerlendirilmesi için mısır unlu-Tween 80 agara veya pirinç ektresi-Tween 80 besiyerine Dalmua plak tekniği kullanılarak ekim yapılır (Larone, 2002; Yıldıran, 1999). Bu ekim;

 ze ile besiyerine hafif dokunularak maya kolonisinden bir miktar alınır ve agar yüzeyine ince çizgi ekim yapılır.

İlk çizgiye paralel ikinci ve   nc  çizgi ekimi yapılır.

 izgi ekimin orta kısmına alevden geçirilip ve soĐutulmuŐ bir lamel yerleştirilir

ve oda ısısında 24-48 saat inkübe edilir.

Plak kapağı kaldırıldıktan sonra mikroskop tablasına yerleştirilir. Lamel kaplı alan incelenir.

Kapatılan lamel ve Tween-80, pseudohif yapılarının ve klamidospore oluşumunu arttırmaktadır (Larone, 2002; Neppelenbroekve ark., 2014; Yıldırım, 1999).

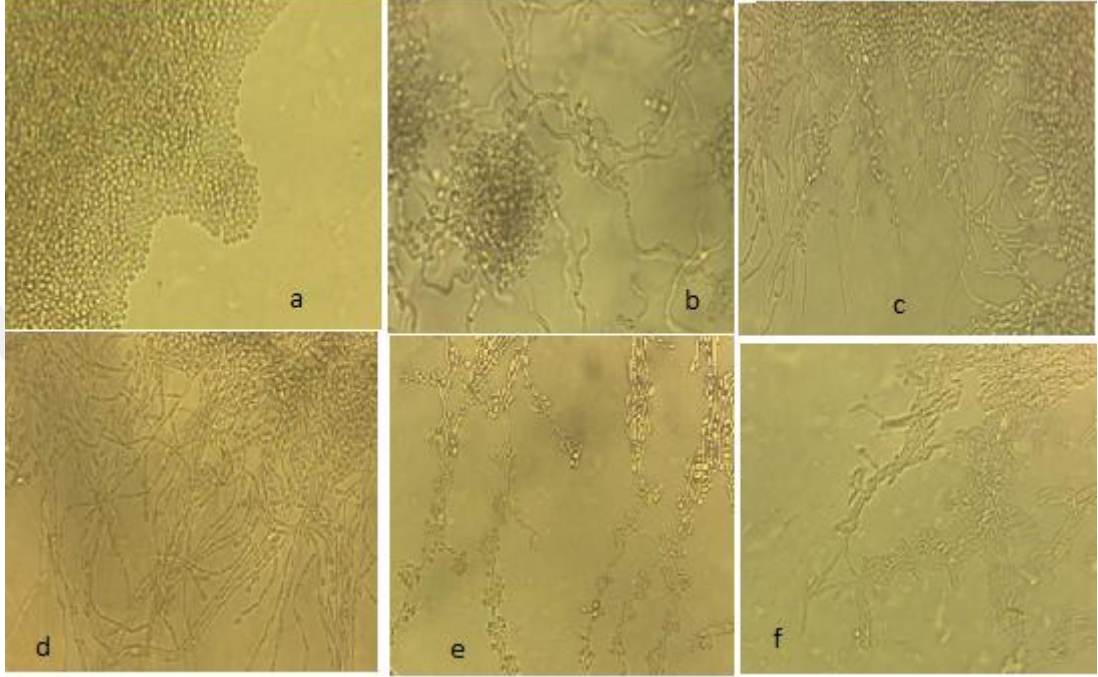
Özellikle klamidospore yapısının saptanması, *C. albicans* ve *C. dublinensis* suşları için tipiktir (Neppelenbroekve ark., 2014). *C. albicans* gerçek veya psödohiflerin ucunda tek klamidospore üretirken; *C. dublinensis* ise gerçek veya psödohiflerin ucunda birden fazla ikili, üçlü veya daha fazla klamidospore üretir. Ancak kesin ayırım yapılamamaktadır ve tanımlama için ileri testlere ihtiyaç vardır (Larone, 2002; Neppelenbroekve ark., 2014).

Diğer *Candida* türlerinin tanımlanmasında klamidospore gibi tipik bir bulgu olmamakla birlikte, mikroskopik morfolojilerinin incelenmesi tanımlamada yardımcı olabilmektedir. Bazı önemli *Candida* türlerinin mikroskopik morfolojik özellikleri (Emel, 1999);

- *C. albicans*: Yalancı ve gerçek hifler, yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler oluşturmuş yuvarlak blastokonidyumlar ve hif uçlarında türe özgü kalın duvarlı, tek veya birkaç tane klamidospore.
- *C. tropicalis*: Yalancı hif boyunca tek tek veya küçük kümeler oluşturmuş yuvarlağımsı blastokonidyumlar; bazen yalancı hif uçlarında klamidospore benzer ancak ince duvarlı yuvarlak veya armut şeklinde hücreler.
- *C. guilliermondii*: Az sayıda kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastosporların oluşturduğu kümeler
- *C. parapsilosis*: Yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidyumlar, arada iri hifler.
- *C. krusei*: Yalancı hifler ve uzun “ağaca benzer” dizilim gösteren blastokonidyumlar.

- *C. glabrata*: Küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan blastokonidyumlar. Yalancı hif oluşturmaz.

C. kefyr: Yalancı hifler ve uzun blastokonidyumlar. Blastokonidyumlar çoğu kez yalancı hiften ayrılıp birbirine koştur bir dizilim gösterirler.



Şekil 2: Pirin ektresi Tween 80 besiyerindeki *Candida* türlerinin mikroskopik görüntüleri (Çalışmamızdan)

C. glabrata (a), *C. albicans* (b), *C. parapsilosis* (c), *C. tropicalis* (d), *C. lusitaniae* (e), *C. kefyr* (f)

2.3.2.3 Biyokimyasal testler

2.3.2.3.1 Asimilasyon ve fermantasyon testleri

Asimilasyon testi; bir mayanın oksijen varlığında belirli bir karbonhidratı veya nitrati tek karbon veya nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer (Hazen ve Howell, 2007; Neppelenbroekve ark., 2014; Pincus, OrengeChatellier, 2007). Özellikle *Candida* türleri için karbonhidrat asimilasyon testlerine göre ayırım yapılır. Nitrat asimilasyon testleri daha çok *Cryptococcus*, ve *Pichia* türlerinin tanımlanmasında kullanılır (Hazen ve Howell, 2007).

Karbonhidrat fermantasyon testi; mayanın karbondioksit ve alkol oluşturmasını

ölçer. Gaz oluşumu fermantasyonun bir göstergesidir (Hazen ve Howell, 2007; Neppelenbroekve ark., 2014; Pincusve ark., 2007). *Candida* türlerinin ayırt edilmesinde karbonhidrat fermantasyon testi, karbonhidrat asimilasyon testine göre daha az duyarlıdır (Neppelenbroekve ark., 2014).

Klasik olarak mayaların karbonhidrat ve nitrat kullanma özellikleri Wickerham ve Burton'ın asimilasyon ve fermantasyon yöntemleriyle incelenir (Hazen ve Howell, 2007; Yıldırım, 1999). Klasik yöntemde her bir test için kullanılacak malzemeler tek tek hazırlanmalı ve asimilasyon reaksiyonu için bulanıklığın oluşmasına, fermantasyon için gaz oluşumuna bakılmalıdır. Testlere negatif diyebilmek için 4 hafta kadar bekletilmelidir (Pincusve ark., 2007).

Rutin laboratuvarlar tarafından asimilasyon ve fermantasyon testlerinin kullanılmasının zaman alması ve zahmetli olmasından dolayı yerini ticari sistemlere bırakmıştır (Hazen ve Howell, 2007; Neppelenbroekve ark., 2014). Ticari sistemler; germ tüp testini, klamidospore oluşumunu, şeker asimilasyon deneylerini veya enzimatik reaksiyonları içermektedir. Bu ticari yöntemler genellikle *Candida* türlerinin daha rahat ve hızlı bir şekilde tanınmasını sağlayan geleneksel testlerin minyatür versiyonunu temsil etmektedir (Neppelenbroekve ark., 2014).

Candida tanımlanmasında kullanılan ticari yöntemler tablo II'de gösterilmiştir (Hazen ve Howell, 2007).

2.3.2.3.2 Üreaz testi

Üreaz testi, bir mayanın üreaz aktivitesini göstermeye çalışır. (Hazen ve Howell, 2007; Yıldırım, 1999). Klinik önemi olan *Candida* 'ların çoğu üreaz negatiftir. Ancak *C. crusei* *C. lipolytica*'nın bazı kökenleri üreaz pozitif olabilirler. Üreaz testi özellikle üreaz pozitif olan *Cryptococcus* ve *Rhodoturla* türlerinin tanımlanmasında kullanılır (Hazen ve Howell, 2007).

2.3.2.3.3 Hızlı Trehaloz testi

Hızlı Trehaloz testi, *C. glabrata*'nın 3 saat içerisinde ön tanımlanmasını yapabilmektedir. Trehaloz testleri yalancı pozitif sonuç verebilir. Ancak *C. glabrata*'nın germ tüp oluşturmaması ve maya hücresinin küçük olması nedeniyle diğer türlerden ayırt edilebilir (Hazen ve Howell, 2007).

2.3.2.3.4 Kromojenik Besiyerleri

Türe özgü kromojenik substratlar içeren bu besiyerlerinde, mayaların ürettikleri enzimlerle bu substratlar reaksiyona girerek, çeşitli renklerde kolonilerin oluşumunu sağlamaktadırlar (Çiçek, Koç, Ertürk, DemirBahçeci, 2014; Freydiere, GuinetBoiron, 2001). CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Fransa), *Candida* ID (Biomerieux, Fransa) CandiSelect (Bio-Rad, Fransa), Oxoid Cromogenic *Candida* Agar(OCCA, Basingstoke, İngiltere), HiChroma (HiMedia Laboratories, Hindistan) ticari kromojenik besiyerlerinden bazılarıdır (Hazen ve Howell, 2007).

Tablo II: *Candida* tanımlanmasında kullanılan bazı ticari yöntemler

Tek tür için		Birkaç tür için	Çok sayıda tür için
Testin adı	Identifiye edilen organizma	Testin adı	Testin adı
Albicans-Sure	<i>C. albicans</i>	CandiSelect	Vitek-Yeast Biochemical Card
Albicans ID	<i>C. albicans</i>	Candida check	Microbial Identification System (MIDI)
Albistrip	<i>C. albicans</i>	CHROMagar	Microscan Rapid Yeast ID
BactiCard Candida	<i>C. albicans</i>	Fungiscreen H	Quantum II
Bichrolatex Albicans Fluoropiate	<i>C. albicans</i>		IDS RapID Yeast Plus System
Germ tüp	<i>C. albicans</i>		Uni- Yeast Tek
Rapidec albicans	<i>C. albicans</i>		API 20C AUX
Murex CA 50	<i>C. albicans</i>		API ID32C
MUAG test	<i>C. albicans</i>		API Candida
PNA FISH Candida	<i>C. albicans</i>		Vitek2 ID-YST
Bichrolate krusei	<i>C. krusei</i>		BBL Minitek
Hızlı trehaloz asimilasyonu	<i>C. glabrata</i>		

2.3.3 Kültür dışı tanı yöntemleri

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanımlanmasında kullanılan en sık test kan

kültürüdür. Ancak genellikle sonucun negatif çıkması ya da geç pozitifleşmesi nedeniyle rutin tanı yaklaşımları yetersiz kalabilmektedir (Manuel Cuenca-Estrella ve ark., 2008; Ostrosky-Zeichner, 2012). Bundan dolayı invaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanımlanmasında son 20 yıldır kültür dışı yöntemlerin önemi artmıştır (Kauffman ve ark., 2015).

2.3.3.1 Serolojik testler

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında, bu enfeksiyonların kategorik ayırımında ve tedavi yaklaşımında yardımcı olmak amacıyla serolojik testlerden faydalanılabilir. Bu amaçla hasta serumunda *Candida*'ların antijenik yapıları, antijenlere karşı oluşan antikorlar ve *Candida* metabolitleri aranabilir (Çerikçioğlu, 1999; Gegic ve ark., 2013; Öztürk, 2011).

Antikor taraması için mannan, enolaz ve intrasitoplazmik antijenlere karşı oluşan antikorlar kullanılır (Michael A Pfaller, 2015). Testlerde kullanılan antijenik yapılara bağlı olarak testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. İmmün yetmezlikli hasta grubunda yalancı negatif sonuçların ve kolonizasyona bağlı olarak yalancı pozitif sonuçların fazla olması nedeni ile duyarlılıkları ve özgüllükleri düşüktür (Öztürk, 2011).

Mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler, sistemik mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla ısıya duyarlı antijen, mannan, D-arabinitol ve enolaz araştırılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan mannan antijen testidir. Mannan; *Candida* hücre yüzeyinin, enfeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Dolaşımdan çabuk temizlenir ve kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir (Hilmioğlu-Polat, 2007). Antijen ve antikor testleri birlikte değerlendirildikleri zaman tanıya daha çok yardımcı olurlar (Hilmioğlu-Polat, 2007; Michael A Pfaller, 2015).

2.3.3.2 Moleküler Tanı Yöntemleri

Geçen yüzyılda mikroorganizmaların tanımlanmasında daha çok biyokimyasal ve fenotipik yöntemler kullanılırken, moleküler yöntemlerin kullanılması son yıllarda artış

göstermiştir (Bilgin, 2005). Bunda moleküler tanı yöntemlerinin, *Candida* türlerinin tanımlanmasında daha hızlı olması, sensitivitenin ve spesifitenin yüksek olması etkilidir (Neppelenbroekve ark., 2014; Michael A Pfaller, 2015). *Candida*'ların tanımlanmasında prob tabanlı veya amplifikasyon tabanlı birçok teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin temel amacı, moleküler hedef kullanılarak genomdaki genetik bölgenin bulunmasıdır (Iwen, 2011).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve diğer benzer amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde küçük miktardaki hedef DNA'yı belirlemeye izin verir. PZR'nin kan örneklerinde 1CFU/ml'ye kadar mantarları belirlemede duyarlı olduğu bildirilmektedir (Koç, 2007). Prob tabanlı yöntemlerden biri olan peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) yöntemi ile kültür sonrasında florasanla işaretlenmiş oligonükleotid proplar kullanılarak *Candida*'ların tanımlanması yapılabilmektedir. *Candida* PNA-FISH, yüksek oranda duyarlılık ve özgüllük gösterir (Iwen, 2011).

Moleküler yöntemlerin daha çok ekipman gerektirmesi, iş yükünü arttırması (Koç, 2007), yüksek maliyetler gibi nedenlerle kullanılması sınırlanmaktadır (Iwen, 2011). Ayrıca aynı anda sınırlı sayıda mantar, PCR veya spesifik proplarla cins ve tür düzeyinde identifiye edilebilmektedir (Koç, 2007).

2.3.3.3 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS; klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri, mantar ve virüslerin tanımlanmasında kullanılan hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli yeni bir yöntemdir (Croxattove ark., 2012; Dhiman, Hall, Wohlfiel, BuckwalterWengenack, 2011; Neppelenbroekve ark., 2014). MALDI-TOF MS'in en önemli avantajı, tanımlamayı dakikalar içerisinde yapması ve çalışma için tek bir koloninin yeterli olmasıdır. MALDI-TOF MS, mikroorganizmaları tespit etmek için türe özgü peptid ve protein modelleri kullanır (Michael A Pfaller, 2015). Çalışma prensibinde mikroorganizma kolonileri çelik slayt üzerinde yayılıp, matriks ile kaplanır. Mikroorganizma proteinleri ve peptidleri lazer yardımıyla buharlaşıp iyonize hale gelirler. İyonize haldeki proteinler yüklü vakum borusu içerisinde dedektöre ulaşırlar. Dedektör proteinlerin ağırlıklarına bağlı olarak varış hızlarını ölçüp, mikroorganizmanın spektrasını oluşturur. Bu yöntem ile mikroorganizmaların protein parmak izleri

oluşturulup daha önceden oluşturulmuş referans spektra ile karşılaştırılarak tanımlama dakikalar içerisinde tanımlama yapılabilmektedir (Dhimanve ark., 2011; Neppelenbroekve ark., 2014; Michael A Pfaller, 2015). Bu yeni proteomik yaklaşım bakterilerin yanı sıra mantarların da hızlı ve doğru şekilde tanımlanmasını sağlayabilmektedir (Eddouzi, Lohberger, Vogne, ManaiSanglard, 2013). Veritabanının geniş olmasından dolayı konvansiyonel yöntemlerin tanımlayamadığı suşları tanımlayabilmektedir (Durán-Valle, Sanz-Rodríguez, Muñoz-Paraíso, Almagro-MoltóGómez-Garcés, 2014). Vitek MS (bioMérieux, Fransa) ve Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) bu yöntemi kullanan iki önemli ticari sistemdir (Deak ve ark., 2015).

2.4 Antifungaller

Sistemik antifungallerin uygulanım alanına girmesi 1950’li yıllarda başlamış, ancak sayıca artışları antibakteriyel maddelerin gerisinde kalmıştır. Bakteriler, prokaryotik yapıda olduğundan insan hücresinden farklı yapıda metabolik hedefleri vardır. Mantarlar, ökaryotik canlılar olduğundan dolayı mantara toksik olan insan hücresine de toksik olabilir (Gubbins ve Anaissie, 2009; Roemer ve Krysan, 2014). Ökaryotik özellikteki mantarlar, aynı özelliği taşıyan memeli konakta hastalık oluşturmaları nedeni ile tedavi edici maddelerin biyokimyasal ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak üretimleri son 10-15 yıla kadar sınırlı kalmıştır (Dalgıç ve Erdal, 2005; Yeğenoğlu, 2012).

Antifungal tedavisi son yıllarda büyük bir değişim göstermiştir. Mantar hastalıklarının tedavisinde uzun bir süre yalnızca amfoterisin-B (AMB) ve 5-florositozin kullanılmıştır. Ancak bu antifungallerin kullanımı zor ve toksik etkilerinin fazla olmasından dolayı yeni antifungallere ihtiyaç duyulmuştur. 1990’ların başında yeni triazol türevlerinin keşfi farklı tedavi olanakları sunmuştur. Son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç gelişiminin gözlenmesi araştırmacıları mevcut ilaçlarda yeniliklere ve farklı mekanizmaları kullanan yeni antifungal ilaçların keşfine yöneltmiştir. Vorikonazol, posakonazol gibi yeni azol türevlerinin geliştirilmesi ve mantar hücre duvarına etkili olan ekinokandin grubu antifungallerin keşfi ile yeni antifungaller elde edilmiştir. Halen bu ilerleme yeterli olmayıp kısıtlı sayıda antifungal vardır (Dalgıç ve Erdal, 2005; Küçüköğlü, 2008; Murray, RosenthalPfaller, 2009).

Sistemik fungal infeksiyonlar için kullanımda veya geliştirilmekte olan ilaçlar ve

etki mekanizmaları Tablo III' özetlenmiştir (Murrayve ark., 2009).

Tablo III: Kullanımda veya gelişim aşamasında olan sistemik etkili antifungaller

Antifungal Ajan	Etki mekanizması
Poliyenler (amfoterisin B ve lipidli formülasyonları, lipozomal nistatin)	Mantar hücre membran ergosterolüne bağlanarak direkt oksidatif membran hasarı oluşturur
Antimetabolitler (5-florositozin)	DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu
Azoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol, isavukonazol)	Sitokrom P450 bağımlı 14 alfa lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini durdururlar
Ekinokandinler (kaspofungin, mikafangin, anidulafungin, aminokandin)	1,3- β -D-glukan sentezini inhibe ederek hücre duvar yapımını bozarlar

2.4.1 AMB ve lipit formülasyonları

Polyen grubu antibiyotiklerinden olan AMB Gold ve arkadaşları tarafından 1955'de *Streptomyces nodosus*'dan üretilmiş ve 1960'da uygulama alanına girmiştir (Dalgıç ve Erdal, 2005; Yeğenoğlu, 2012). AMB, hidrolitik bir polihidroksil zinciri ile lipofilik bir poliyen hidroksikarbon zinciri içeren amfoterik bir bileşiktir (Arıkan ve Rex, 2007). AMB, fizyolojik pH'da ve suda iyi çözünmez. Ayrıca oral ve intramuskuler emilimi iyi değildir (Murrayve ark., 2009). Bundan dolayı paranteral uygulanan AMB formülasyonu AMB deoksikolattır. AMB antifungal etkisini iki mekanizma ile gösterir (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009).

AMB, mantarın hücre yapısında bulunan ergosterole yüksek affinite ile bağlanması sonucunda mantarın hücre membranında iyon kanalları ya da porlar oluşturur (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014).

Bu yapılardan mantarın hücre içeriğinin dışarı sızması sonucunda hücrenin ölümü gerçekleşir (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014). Ayrıca AMB, kolesterol içeren membranlara da az da olsa bağlanabildiğinden insan hücresine de bağlanabilir. Bu özelliğinden dolayı insanda toksik etkiler meydana getirmektedir (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009).

AMB'nin kendisi tarafından tetiklenen oksidatif reaksiyonlar zincirinin oluşmasına bağlı olarak direkt membran hasarı olduğu kabul edilmektedir. Bu mekanizma toksik serbest radikalleri çıkararak AMB'nin gösterdiği hızlı fungisidal aktiviteye büyük katkı sağlamaktadır (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009).

Geniş spektrumlu ve fungisidal olmasından dolayı AMB yaşamı tehdit eden ciddi mikozların tedavisinde kullanılan bir antifungaldir (Murrayve ark., 2009). AMB *Candida* türleri, *Crptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, zigomiçetler, endemik dimorfik mantarların birçoğuna etkilidir. Ancak bu cinslerin bazı türleri ya da kökenlerinde azalmış duyarlılık veya olası direnç tespit edilebilir (Arıkan ve Rex, 2007). *Candida* türlerinden *C. lusitania* başta olmak üzere *C. gullermondi*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. rugosa* AMB'ye karşı azalmış duyarlılık veya direnç gösterebilir (Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009). *Aspergillus terreus*, *Fusaium* türleri, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans*, *Tricosporon* türleri ve bazı esmer mantarlar AMB'ye dirençli olabilirler (Murrayve ark., 2009).

AMB'nin başlıca kullanım endiksayonları invaziv kandidoz, kriptokokkoz, blastamikoz, histoplazmoz, sporotrikoz, koksoidimikoz, parakoksidyomikoz ve antibakteriyel ilaçlara yanıt vermeyen febril nötropenide ampirik olarak kullanılan antifungaldir (Arıkan ve Rex, 2007). Günümüzde primer aspergillus tedavisinde artık vorikonazol tercih edilmektedir (Arıkan ve Rex, 2007; Roemer ve Krysan, 2014).

AMB'nin en sık yan etkisi infüzyona bağlı ateş, titreme, bulantı, kusma, baş ağrısı ve hipotansiyon olmakla birlikte en önemli yan etkisi doza bağlı olan ve hayatı tehdit eden nefrotoksisitedir (Dalgıç ve Erdal, 2005). AMB'nin yan etkilerini azaltmak ve AMB'nin in-vivo etkinliğini arttırmak için lipit formülasyonları geliştirilmiştir (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014; Yeğenoğlu, 2012).

Lipid formülasyonları, intravenöz uygulamadan sonra retiküloendotelial sistemde yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Monositler, makrofajlar ve plazma lipoproteinleri lipid komplekslerin enfeksiyon alanına transportun da rol oynarlar (Dalgıç ve Erdal, 2005). Konvansiyonel AMB'ye göre enfeksiyon alanındaki doku konsantrasyonları daha yüksek buna karşılık serum konsantrasyonu daha düşüktür (Arıkan ve Rex, 2007; Dalgıç ve Erdal, 2005). Bundan dolayı AMB'ye iyi yanıt vermeyen ya da AMB'ye intolarans gözleendiği olgularda kurtarma tedavisinde kullanılabilirler (Arıkan ve Rex, 2007). Ayrıca lipid bileşiklerin böbrek dokusundaki dağılımlarının az olması nefro toksik etkilerini minimale indirir (Arıkan ve Rex, 2007; Dalgıç ve Erdal, 2005). AMB'nin üç ayrı lipid formülasyonu vardır: Lipozomal AMB (AmBisome®), AMB lipid kompleksi (ABLIC® veya Abelcet®), AMB koloidal dispersiyon (ABCD® veya Amphocil®) bu grupta sayılır. Her formülasyonun AMB içeriği, lipid bileşimi, partikül çapı, yapısı ve farmakokinetik özellikleri farklıdır (Dalgıç ve Erdal, 2005).

2.4.2 Azoller

İlk kez 1944'de Wooleyn tarafından sentez edilmiş olup, 1981'de bir imidazol olan ketokonazol; 1990'da flukonazol, 1992'de itrakonazol, 2002'de vorikonazol ve 2006'da posakonazol triazol bileşikleri olarak FDA'dan onay alarak uygulama alanına girmişlerdir (Yeğenoğlu, 2012). Bu grup içerisinde imidazol (azol halkasında 2 nitrojen) ve triazol (azol halkasında 3 nitrojen) olmak üzere iki grup vardır. İmidazoller arasında sadece ketokonazolün sistemik etkinliği varken triazol (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol posakonazol) grubunda bulunan tüm antifungallerin sistemik etkinliği vardır (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009). Triazoller, memeli hücre membranından daha çok mantar hücresine etki etmesi nedeniyle, imidazollerden daha güvenilir ilaçlardır. İmidazollerin kullanımı yüzeysel mantar enfeksiyonlar ile sınırlı iken, triazoller hem yüzeysel hem de invaziv mantar enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Kutlu, 2009). Ravukonazol, albakonazol ve isavukonazol araştırma aşamasında olan triazol grubu antifungallerdir (Murrayve ark., 2009). Yan etkilerinin az olması ve geniş spektrumlu olmalarından dolayı daha çok tercih edilirler (Dalgıç ve Erdal, 2005; Yeğenoğlu, 2012).

Tüm azol grubu antifungaller; mantar hücre membranında bulunan ergosterolün biyosentezinde görev alan sitokrom P450 bağımlı 14 alfa lanosterol demetilaz enzimini

inhibe ederek etki ederler. Bu enzimin inhibisyonu sonucunda lanosterolden ergosterol oluşamaz ve membran sentezi bozulur (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009). Ergosterol inhibisyonu, etken organizmaya ve kullanılan azole karşı ya fungistatik ya da fungisidal aktivite gösterir (Arıkan ve Rex, 2007; Yeğenoğlu, 2012).

2.4.2.1 Flukonazol

Flukonazol suda çözünen oral biyoyararlanımı çok yüksek, toksitesi düşük olan birinci kuşak triazol antifungaldir (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014). Oral veya parenteral olarak kullanılabilir ve serum proteinlerine düşük oranda bağlanır. Santral sinir sistemi başta olmak üzere tüm organlara ve dokulara iyi yayılır (Dalgıç ve Erdal, 2005; J.H. Rex ve Stevens, 2014). Emilimi gastrik asitten ve alınan besinlerdeki yağ miktarından etkilenmez (Arıkan ve Rex, 2007).

Flukonazol, birçok *Candida* türüne ve *Crptococcus neoformans*'a karşı etkilidir. *C. krusei*, flukonazole karşı doğal dirençlidir. *C. glabrata* suşları flukonazole karşı azalmış duyarlılık gösterse bile bu suşların birçoğu flukonazolün yüksek doz kullanılması ile tedavi edilebilir. *C. norvegenesis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. inconspua* suşlarında yüksek minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri saptanabilmektedir. HIV pozitif hastalarda olduğu gibi uzun süreli flukonazolün profilakside kullanılması sonucunda *C. albicans* suşlarında dahil flukonazol direnci saptanabilmektedir (Arıkan ve Rex, 2007). Flukonazolün çoğu endemik dimorfik mantara karşı etkinliği sınırlıdır (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014). Ayrıca flukonazol küf mantarlarına karşı etkili değildir (Arıkan ve Rex, 2007; Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009).

Toksitesininin az olması, uygulama kolaylığı ve maya benzeri mantarların çoğuna karşı gösterdiği fungistatik etkinlikten dolayı, kandidoz, kriptokokkoz ve koksidiyoidomikoz tedavisinde flukonazol önemli bir role sahiptir (Murrayve ark., 2009). Kandidemi ve mukoza kandidozunda başlıca tedavi yöntemi, seçilmiş yüksek riskli gruplarda ise proflaksi olarak kullanılmaktadır. AIDS'li hastalarda kriptokok menenjitinin idame tedavisinde kullanılır ve *Coccidioides immitis*'e bağlı menenjit tedavisinde tercih edilecek ilaçtır. Flukonazol histoplazmoz, blastomikoz ve sporotrikozun tedavisinde ikinci seçenekte yer almaktadır (Murrayve ark., 2009).

Flukonazol tedavisinde yan etkiler nadirdir. Alerjik reaksiyonlar, anjioödem, trombositopeni ve alopesi gelişebilir (Arıkan ve Rex, 2007).

2.4.2.2 İtrakonazol

Kapsül veya süspansiyon formu olarak oral yoldan ve intravenöz uygulanabilen lipofilik triazoldür (Murrayve ark., 2009). Oral formunun biyoyararlanımı yaklaşık %55'tir (J.H. Rex ve Stevens, 2014). Absorbsiyonu tok karnına alınınca artar. Buna karşılık antiasit ve H₂-blokerleriyle azalır. Lipofilik özelliktedir ve %99 oranında plazma proteinlerine bağlanır (J.H. Rex ve Stevens, 2014). Santral sinir sistemi enfeksiyonlarında bile serebrospinal sıvı konsantrasyonu serum konsantrasyonunun %1'inden daha azdır (Dalgıç ve Erdal, 2005).

İtrakonazol, flukonazole dirençli *C.krusei* ve *C. glabrata* izolatlarının bir kısmı dahil *Candida* türlerine, *Crptococcus neoformans*'a, *Aspergillus* türlerine, dermatofitlere, endemik dimorfik mantarlara karşı etkilidir (Arıkan ve Rex, 2007; Murrayve ark., 2009). İtrakonazol küflere ve *Crptococcus neoformans*'ın bazı suşlarına karşı fungisidal aktivite gösterirken mayalara karşı fungistatik aktivite gösterir. İtrakonazol, *Fusarium* ve zigomikoz türlerine karşı etkisizdir (Gubbins ve Anaissie, 2009).

İtrakonazolün kütanöz ve mukozal kandidoz tedavisinde yararlı bulunmasına rağmen, kandidemi tedavisindeki etkinliği tam olarak değerlendirilmemiştir. İtrakonazol dermatofit enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılır ve lenfokütanöz sporotrikoz ile histoplazmoz, blastomikoz ve parakoksidioyidomikozun menenjit dışında ve yaşamı tehdit etmeyen klinik şekillerinde tercih edilecek tedavi şeklidir. Koksidiyoidomikozun menenjit dışındaki klinik şekillerinde, kriptokok menenjitinin idame tedavisinde yararlı olabilir. İtrokonazol aspergillus edavisinde ikinci seçenek bir ajan olduğu düşünülmelidir (Murrayve ark., 2009).

İtrakonazol tedavisine bağlı gelişen yan etkiler, flukonazol tedavisi ile gözlenenlere benzerdir. Ancak, itrakonazole bağlı gelişen gastrointestinal yan etkiler, flukonazol ile gözlenenlere göre daha siktir. İtrakonazol ile nadiren hepatotoksisite gelişebileceği rapor edilmiştir. Özellikle yüksek dozlarda, hipokalemi, ödem ve hipertansiyon gözlenebilir (Arıkan ve Rex, 2007).

2.4.2.3 Vorikonazol

Triazol türevi yeni bir antifungal ilaç olan vorikonazol, FDA tarafından 2002 tarihinde onay almıştır (Küçüköğlü, 2008). Vorikonazol hem oral hem de parenteral kullanılabilir. Vorikonazol oral biyoyararlanımı yüksek olup plazma proteinlerine orta düzeyde bağlanır. BOS'a geçişi iyidir (Küçüköğlü, 2008; P. Munoz, Guinea, RojasBouza, 2010; J.H. Rex ve Stevens, 2014). Gastrik pH'da etkilenmez ancak ilaç gıda ile birlikte uygulandığında emilimi azalır. Oral vorikonazol flukonazole dirençli suşların tedavisinin tamamlanması için kullanılabilir (P. Munozve ark., 2010).

Vorikonazol dermatofitlere, mayalara ve küflere karşı aktivitesi olan bir antifungaldir (Gubbins ve Anaissie, 2009). Vorikonazol, *Candida* türlerine (flukonazole dirençli bazı suşlar da dahil), *Crptococcus neoformans*'a, *Trichosporon* türlerine, *Aspergillus* türlerine (itrakonazole dirençli *Aspergillus. fumigatus* ve AMB'ye dirençli *Aspergillus. terreus* da dahil), *Fusarium* türlerine, endemik dimorfik mantarlatra ve dermatofitlere karşı etkilidir (Arıkan ve Rex, 2007). *Zygomycetes*'lere ve *Sporothrix schenckii*'ye karşı etkili değildir (Arıkan ve Rex, 2007). Vorikonazol mayalara karşı fungistatik, *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal etki gösterir (Murrayve ark., 2009).

Vorikonazolün klinik kullanım endikasyonları, invazif aspergillozun primer tedavisi, *Fusarium* türlerine bağlı gelişen enfeksiyonların kurtarma tedavisi, ösofagiyal kandidoz ve non-nötropenik kandidemili olguların tedavisidir. Hepatosplenik kandidiyazis dahil yaygın *Candida* enfeksiyonlarında vorikonazol ile çok başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Esmer mantarlara bağlı gelişen enfeksiyonlarda da iyi etkinlik gösterdiği gözlenmiş olmakla birlikte, bu konudaki klinik deneyim henüz sınırlıdır (Arıkan ve Rex, 2007; Kebud, 2007; J.H. Rex ve Stevens, 2014).

Vorikonazol kullanımı sırasında en sık gözlenen yan etkiler geçici görme bozuklukları ve karaciğer enzimlerinde yükselmedir. Ayrıca demyelinizan periferik nöropati, döküntü, fotosensitivite, konsantrasyona bağlı olmayan QT uzaması ve aralıklı polimorfik ventriküler taşikardi de gözlenebilir. Bunun dışında, muhtemelen yüksek vorikonazol konsantrasyonlarına bağlı ortaya çıkan halüsinasyonlar, hipoglisemi, elektrolit bozuklukları ve pnömoni de bildirilmiştir. Bu nedenle, vorikonazol dozunun ayarlanabilmesi için plazma vorikonazol konsantrasyonunun ölçülmesi önerilmektedir (Arıkan ve Rex, 2007).

2.4.3 Ekinokandinler

Ekinokandinler, bazı mantarların fermantasyonundan elde edilmiş olan semi-sentetik lipopeptid yapısında atifungallerdir. Ekinokandinler, 1,3- β -D-glukan sentaza hızlı ve geri dönüşümsüz bağlanıp mantar hücre duvarının temel bileşimi olan 1,3- β -D-glukan sentezini inhibe ederler. Mantar hücre duvarı sentezlenemediğinden dolayı mantara karşı fungisidal etkili antifungallerdir. 1,3- β -D-glukan sadece mantar hücresinin yapısında bulunduğundan sadece mantar hücrelerine toksik etkisi olmaktadır (Aderiye ve Oluwole, 2015; Murrayve ark., 2009).

Ekinokandinler, hücre duvar yapısında 1,3- β -D-glukan bulduran mantarlara karşı etkilidirler. Bundan dolayı ekinokandinler *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı etkili olurken; *Cryptococcus neoformans*'a, *Trichosporon* türlerine, *Fusarium* türlerine ve *Zygomycetes* sınıfındaki mantarlara karşı etkili değildirler. Endemik dimorfik mantarlara karşı düşük etkinliğe sahiptirler. *Candida* türlerine karşı fungisidal, *Aspergillus* türlerine karşı fungistatik etki gösterirler (Aderiye ve Oluwole, 2015; Gubbins ve Anaissie, 2009; Murrayve ark., 2009). Günümüzde, çeşitli mikozların tedavisi ya da önlenmesinde kullanılmak üzere onay alan üç ekinokandin (anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin) bulunmaktadır(Murrayve ark., 2009; J.H. Rex ve Stevens, 2014)

Her üçü de siklik lipopeptid yapısında olan, intravenöz yoldan uygulabilen, benzer etkinliğe sahip antifungallerdir. Kaspofungin en çok klinik uygulanımı olan ekinokandindir (J.H. Rex ve Stevens, 2014).Proteine bağlanma oranları yüksektir. Beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyonları düşük olmakla birlikte, tüm organlara yayılabilirler. Ekinokandinlerin tümü çok iyi tolere edilir ve diğer ilaçlarla etkileşimleri çok azdır. Ekinokandinlerin üçü de *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı benzer spektruma ve etkinliğe sahiptir (Murrayve ark., 2009). *Candida* türlerinden *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *C. lusitaniae*'ya karşı kısmen daha az etkili olup daha yüksek MİK sonuçları çıkabilmektedir (Gubbins ve Anaissie, 2009). Kaspofungin, kandidemi de dahil olmak üzere invaziv kandidoz tedavisi ve diğer antifungal tedavilere inatçı ya da bunlara tolerans gösteremeyen invaziv aspergillozlu hastaların tedavisi için onay almıştır. Anidulafungin, özofagus kandidozu ve kandidemi tedavisi; mikafungin ise özofagus kandidozu ve kandidemi tedavisi ile invazif kandidozun önlenmesi için

onay almıştır (Murrayve ark., 2009).

Ekinokandinler, genel olarak minimal düzeyde toksisiteye yol açan güvenilir ilaçlardır. Bugüne kadar ekinokandinlere bağlı gelişen ciddi bir yan etki bildirilmemiştir. Ekinokandin tedavisi sırasında, bulantı, kusma, döküntü olabilmektedir (Arıkan ve Rex, 2007).

2.5 Antifungal duyarlılık testleri

Riskli hasta grubunun artmasına bağlı olarak invaziv fungal enfeksiyon sıklığı artmış, bunun sonucunda hem tedavide hem de profilakside yoğun olarak antifungallerin kullanılması ön plana çıkmıştır. Yoğun antifungal kullanımına bağlı olarak *Candida* 'lar arasında antifungallere karşı ya direnç gelişmekte ya da dirençli suşların seleksiyonu meydana gelmektedir. Bu gözlenen direnç sorunu nedeniyle standart antifungal duyarlılık yöntemlerinin önemi artmıştır. Ayrıca yeni antifungallerin tanımlanması, bu antifungallerin tedavi edici potansiyellerinin ve etkinlik spektrumununun gösterilmesi gerekmektedir. Günümüzde antifungal duyarlılık testleri; yeni geliştirilen ilaçların in vitro etki spektrumunu belirlemek, direnç oranlarına ilişkin epidemiyolojik veriler elde etmek, bu şekilde ampirik tedavilere yön vermek ve antifungallerle klinik izolatların in vitro duyarlılıklarını inceleyerek klinik yanıtı ilişkin öngöründe bulunmak için kullanılmaktadır (Koç, 2012; Michael A Pfaller, 2012)

Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması gereken durumları maddeler halinde özetlersek (M. Pfaller, KauffmanThomer, 2014);

- i. *Candida* spp. steril bir vücut bölgesinden izole edilmiş olması,
- ii. *C. glabrata* gibi en az bir antifungale dirençli olduğu iyi bilinen bir türün izole edilmiş olması,
- iii. *Candida* enfeksiyonu sırasında beklenmedik bir tedavi başarısızlığının gelişmesi,
- iv. Antifungal tedavi sonrası gelişmiş olduğu düşünülen sekonder direncin gösterilmesi koşulları bulunmalıdır

İdeal bir antifungal duyarlılık testinde olması gerekenler (EspinelIngroff ve Pfaller, 2007):

- i. İlacın in vivo aktivitesi ile uyumlu sonuç verebilmeli
- ii. Tedavi sonuçlarını öngörebilmeli
- iii. Duyarlı popülasyonda direnç gelişimini belirleyebilmeli
- iv. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği yüksek olmalı
- v. Çabuk sonuç verebilmeli
- vi. Ucuz ve kolay uygulanabilmeli
- vii. Yeni bulunmuş deneysel ilaçların tedavi edici potansiyelini ön görmeli
- viii. İki ya da daha fazla antifungal ilacın göreceli etkinliklerinin güvenilir bir ölçümünü sağlamalı

2.5.1 Referans Antifungal Duyarlılık Yöntemleri

Enfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla standart referans yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından geliştirilen mayalar için buyyon makro/mikrodilüsyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemi ile European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından geliştirilen buyyon mikrodilüsyon yöntemleridir. Bu yöntemler ile laboratuvarlar arası tekrarlanabilir standart bir metot sağlanmıştır. Ayrıca kullanılan antifungalın klinik breakpoint veya epidemiyolojik cut off değeri belirlenerek tedaviye yön verilebilmektedir (Nachimuthu ve Ostrosky-Zeichner, 2015).

Antifungal buyyon makrodilüsyon yöntemi, CLSI alt komitesi tarafından önerilen ilk yöntem olmasına rağmen, bu testin maliyetli olması, zaman alması ve uygulama zorluğu nedeni ile yerini mikrodilüsyon yöntemi almıştır (Nachimuthu ve Ostrosky-Zeichner, 2015; John H Rex ve ark., 2001).

Buyyon mikrodilüsyon yöntemi, antifungal duyarlılık testleri içinde en yaygın kullanılan yöntemdir (EspinelIngroff ve Pfaller, 2007). CLSI ve EUCAST

mikrodilüsyon yöntemleri birbirine benzemekle beraber bazı farklılıklar vardır. CLSI ve EUCAST'ta kullanılan RPMI besiyeri, inkübasyon sıcaklığı, antifungallerin end point noktasını okuma standardı benzerdir. Bununla birlikte inokülüm miktarında, RPMI'daki şeker oranında, mikrodilüsyon plak şeklinde ve MİK tespitinde farklılıklar vardır. EUCAST'ta, yüksek glukoz konsantrasyonu ve inokulum miktarı kullanılır. Ayrıca düz tabanlı mikrodilüsyon kuyucuğu kullanarak okumayı göz yerine spektrofotometrik olarak yapılmaktadır. Farklılıklara rağmen iki yöntem kıyaslandığında uyumlu sonuçlar alınabilmiştir (Nachimuthu ve Ostrosky-Zeichner, 2015).

CLSI'nın geliştirmiş olduğu referans disk difüzyon yöntemi agar bazlı bir yöntemdir. Besiyeri olarak %2 dekstroz ve 0.5 µl/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar kullanılır. Bu yöntemde, flukonazol ve vorikonazol için duyarlılık değerleri tanımlanmış olup 24 saatlik inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülerek değerlendirilir. Agar disk difüzyon testi, sıvı dilüsyon testinin uygulaması kolay, esnek ve maliyeti düşük bir alternatifidir. Flukonazol diskleri ile yapılan ilk çalışmalar, disk difüzyon testinin *Candida* türlerinde kullanılabilmesine dair umut vermesine rağmen, antifungal ilaçların disk difüzyon testinde kullanımıyla ilgili gelişmeler yavaş ilerleme göstermektedir.(EspinellIngroff ve Pfaller, 2007)

2.5.2 Antifungal duyarlılığı belirlemede kullanılan diğer yöntemler

Referans yöntemler, tüm mantarların test edilmesi veya klinik laboratuvarlarda rutin kullanım için en iyi yöntem olmayabilirler (EspinellIngroff ve Pfaller, 2007). Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin pahalı olması, her laboratuvar tarafından uygulanabilirliğinin düşük olması, sonuç vermesinin uzun sürmesi ve özellikle azol grubu antifungallerin değerlendirmesinin zor olması bu yöntemlerin önemli sorunlarıdır (Arıkan, 2007) Bunlardan dolayı referans yöntemlere alternatif olabilecek daha kolay, tekrarlanabilirliği ve kullanılabilirliği yüksek, ucuz ve uygun yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Koç, 2012). Birçok yöntem olmakla birlikte daha çok üç yöntemin antifungal duyarlılığın çalışılması konusunda tavsiye edilmektedir. Bunlar; E test (AB Biodisk, İsveç), Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic System, USA) kolorimetrik mikropak ve Vitec 2 (Biomerieux, Fransa) antifungal duyarlılık testidir (EspinellIngroff ve Pfaller, 2007; M. Pfallerve ark., 2014).

Gradient difüzyon yöntemi (E test); antimikrobiyal bir ilacın, dengeli bir şekilde

giderek artan konsantrasyonda yerleştirildiği plastik bir şeritten agar bazlı besiyerine difüzyonu temeline dayanan bir yöntemdir (EspinelIngroff ve Pfaller, 2007). E test ile 24-48 saat sonra MİK sonucu alınabilmektedir (Koç, 2012; M. Pfallerve ark., 2014) E testi ile MİK değeri saptanırken en iyi performans gösteren besiyeri, %2 glikoz eklenmiş ve katılaştırılmış RPMI besiyeridir. Endpoint belirleme bazı suşlarda zor olduğundan testin değerlendirilmesi, deneyimli bir kişi tarafından ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmalıdır. E test, *Candida spp* ve *Cryptococcus neoformans* suşları arasındaki azalmış AMB duyarlılığını tespit etmek için hassas ve güvenilir bir yöntemdir (M. Pfallerve ark., 2014). *Candida* türlerinde, E test ile AMB MİK değerinin >0.38 µg/ml olarak saptanması, kandidemi nedeniyle AMB tedavisi alan hastalarda görülen tedavi başarısızlığı ile ilişkili bulunmuştur (EspinelIngroff ve Pfaller, 2007). E testi sonuçları, birçok *Candida* suşu için standart yöntemler ile uyumlu bulunmuştur. Ancak bu uyum kullanılan antifungale, seçilen besiyerine ve *Candida* türüne göre değişebilmektedir (M. Pfallerve ark., 2014).

Vitec 2 antifungal duyarlılık testi, antifungal duyarlılığını spektrofotometrik olarak ölçen tam otomatize ilk sistemdir (Michael A Pfaller, 2008). Antifungal duyarlılığı 12-15 saat gibi daha kısa bir süre içerisinde sonuçlanmaktadır. Ayrıca bu sistem ile aynı anda tanımlama da yapılabilmektedir. Vitec 2 antifungal duyarlılık testi ile referans mikrodilüsyon yöntemleri ile arasındaki uyum yüksektir. (M. Pfallerve ark., 2014; Michael A Pfaller, 2008)

Kromojenik bir yöntem olan Sensititre YeastOne; üreme göstergesi olarak Alamar mavisi içeren, 96 kuyucuklu, 9 antifungalın dilüsyon metoduna uygun olarak dozları ayarlanmış bir mikrodilüsyon plağıdır. Plaklar, içerisindeki antifungaller liyofilize halde bulunduğundan dolayı oda sıcaklığında 24 aya kadar bekleyebilmektedir. Sensititre YeastOne yöntemi ile 24 saat sonra MİK sonucu alınabilmektedir (Michael A Pfaller, 2008). Amfoterisin B ve diğer ilaçlar için maviden pembeye; azoller ve 5-FC için ise mordan pembeye bir renk değişiminin olmadığı ilk çukur MİK değeri olarak kabul edilir. Bu yöntem, azollerde görülen kısmi inhibisyonu (trailing) azaltmaktadır.(EspinelIngroff ve Pfaller, 2007) YeastOne sistemi, referans mikrodilüsyon yöntemleri ile yüksek oranda uyum göstermektedir. Ayrıca 24 saat içerisinde tüm antifungaller için MİK sonucunu vermesi ve yorumlanmasının daha

kolay olması önemli bir avantajdır. (Michael A Pfaller, 2008; Vijgenve ark., 2011)

Candida'larda kullanılan duyarlılık yöntemleri Tablo IV' verilmiştir (Bilgin, 2005)

Tablo IV: *Candida*'larda kullanılan duyarlılık yöntemleri

Dilüsyon Temeline Dayanan Yöntemler	Difüzyon Temeline Dayanan Yöntemler	Diğer Yöntemler
Makrodilüsyon	Disk difüzyon	Ergosterol sentezinin
Mikrodilüsyon	E test	kantitasyonu
Spektrofotometrik yöntemler		Flovsitometrik yöntem
Kolorimetrik yöntemler		
Agar dilüsyon		
Yarı katı agar yöntemi		
Agar tarama yöntemi		

3 MATERYAL METOD

3.1 İzolatlar

Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, değişik servislerde yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen 71 *Candida* suşu dahil edildi. Klinik suşların yanında standart suş olarak *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 çalışmada kullanıldı.

3.2 İzolasyon ve tanımlama

Hastalardan alınan kan örnekleri BacT/Alert (Biomérieux, Fransa) otomatize kan kültürü şişelerine ekildi. Üreme tespit edilen şişelerden kanlı agara (Biomérieux, Fransa) ve EMB (Eosin-methylene blue) agara (Biomérieux, Fransa) pasaj yapılarak, kültürler 36°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreme olan petrilere gram boyama yapılarak maya olduğu tespit edilen kolonilerden SDA'ya (Merck, Almanya) pasaj yapılarak, 24-48 saat 36°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kirli beyaz krem renkli, yumuşak kıvamlı saf olduğundan emin olunan kolonilerden %15 gliserinli buyyon içeren endorflara konularak, -20°C'de saklandı. Suşlar, saklama sonunda kullanılacakları zaman, iki kez SDA'ya pasaj yapılarak, suşların saf oldukları emin olduğunda çalışmaya dahil edildi.

3.2.1 Germ Tüp Testi

Test edilecek maya kolonisinden küçük bir miktar alınarak 0,5 ml insan serumu içerisinde süspansiyon edildi. Bu karışım 37°C'de 2-2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bu karışımdan lam lamel arasında preparat hazırlanarak x400 büyütme ile mikroskopta incelendi. Maya hücrelerinden kısa bir hif başlangıcı şeklinde çıkan ve başlangıç noktasında boğulanmasının olmadığı yapılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp pozitif olan suşlar *C. albicans* olarak değerlendirildi.

3.2.2 Pirinç Ekstresi-Tween 80 Agar

%1'lik Tween 80 (Merck, Almanya) içeren pirinç ekstresi besiyerinin hazırlanması şu şekilde yapıldı; 50 gr pirinç, 300 ml distile su içinde 3 dakika kaynatıldıktan sonra birkaç kat gazlı bez ile süzüldü ve buna 20 gr agar, 20 gr glukoz, 10 ml Tween 80 eklenip distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Bu karışım 121°C'de 15

dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril petrilere döküldü.

SDA'da üremiş olan saf kolonilerden iğne uçlu öze ile bir miktar alınıp pirinç ekstresi-Tween 80 agar üzerine birbirine paralel üç çizgi halinde ekim yapıldı ve ekim alanının üzeri steril bir lamel ile kapatıldı. 26°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası ışık mikroskopunda x400 büyütmede *Candida* türlerinin oluşturduğu mikroskopik morfolojik özellikleri incelendi.

3.2.3 Kromojenik Besiyeri

Kromojenik besiyeri olarak hazır CHROMagar Candida(CHROMagar, Fransa) kullanıldı. Maya kolonilerinden agar üzerine öze ile ekim yapıldı ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerdeki renk değişimleri izlendi. Yeşil renkli koloniler *C. albicans*, mavi renkli koloniler *C. tropicalis* ve açık pembe renkli koloniler *C. krusei* olarak değerlendirildi.

3.3 Standart antifungal duyarlılık testi

Çalışmaya alınan *Candida* türlerinin amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve kaspofungine karşı duyarlılık durumları CLSI'in M27-A3'de tanımladığı kriterlere göre buyyon mikrodilüsyon testi ile belirlendi Kontrol suşları olarak *C. krusei* ATCC 6258, *C.parpsilosis* ATCC 22019 kullanıldı (CLSI, 2008).

3.3.1 Besiyerinin hazırlanması

Duyarlılık testi için besiyeri olarak RPMI 1640 (bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü) (Sigma Chemical Co, USA) kullanıldı. Besiyeri için; 900 ml distile suya 10.4 gr toz besiyeri ve 34.53 gr 0.165 M MOPS [3-(N-morfolino) propansülfonik asit] (Sigma Chemical Co, USA) eklendi ve homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Homojen hale gelen besiyerinin pH'ı oda ısısında 1 M NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su eklendi. Besiyeri 0.22 µm'lik filtrelerle steril şişeler içine süzülerek steril edildi ve kullanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.3.2 Antifungal stok solüsyonlarının hazırlanması

Antifungal etken madde olarak; amfoterisin B (Sigma Chemical Co, USA), flukonazol (Sigma), vorikonazol (Sigma), itrakonazol (Sigma) ve kaspofungin (Sigma) kullanıldı. Flukonazolün 5120 µg/ml'lik stok solüsyonu distile suda; diğer ilaçların

1600 µg/ml'lik stok solüsyonları dimetil sülfoksitte (DMSO) (Merck, Almanya) hazırlanarak -80°C'da saklandı Antifungal ilaç miktarı aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı (CLSI, 2008)

$$Ağırlık (mg)=[Hacim (ml) x Konsantrasyon (µg/ml)] / Potens (µg/mg)]$$

3.3.3 Mikrodilüsyon için plakların hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce ilaç stok solüsyonları dondurucudan çıkarıldı ve solüsyonların erimesi beklendi. İlaç stok solüsyonları RPMI besiyeri ile her ilaç için önerilen final konsantrasyonların 2 katı olacak şekilde dilüsyonları hazırlandı. Amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol stok solüsyonlarından son konsantrasyonları 16-0,03 µg/ml olması için 32-0,06 µg/ml; flukonazol stok solüsyonundan son konsantrasyonu 64-0,125 µg/ml olması için 128-0,25 µg/ml; kaspofungin stok solüsyonundan son konsantrasyonu 8-0,015 µg/ml olması için 16-0,03 µg/ml olacak şekilde çift kat dilüsyonları steril tüpler içinde hazırlandı. Antifungallerin seri dilüsyonlarının hazırlanması tablo V-VI' verilmiştir.

Çalışma için steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanıldı. Mikrolakların 11 ve 12. kuyucuğuna antifungal içermeyen 100 µl RPMI besiyeri koyuldu. Kuyucuklardan 11. kuyucuk üreme kontrolü, 12. kuyucuk ise sterilite kontrolü olarak kullanıldı. Her bir yatay sıraya en yüksek ilaç konsantrasyonu 1. kuyucukta, en düşük ilaç konsantrasyonu 10. kuyucukta olacak şekilde seri olarak antifungal ilaç dilüsyonlarından otomatik pipetle 100'er mikrolitre dağıtıldı. İnokulum eklenmeyecekse mikrolakların kapakları kapatılıp -80°C'de saklandı. Çalışma öncesi oda sıcaklığında bir süre bekletildi.

Tablo V: Flukonazol için seri dilüsyonların hazırlanması

Basamak	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Hacim(ml)	Besiyeri (ml)	Ara konsantrasyon (µg/ml)	RPMI ile 1/5 dilüsyon (µg/ml)
1.	5120	Stok	1	7	640	128
2.	640	Basamak 1	1	1	320	64
3.	640	Basamak 1	0,5	1,5	160	32
4.	160	Basamak 3	1	1	80	16
5.	160	Basamak 3	0,5	1,5	40	8
6.	160	Basamak 3	0,5	3,5	20	4
7.	20	Basamak 6	1	1	10	2
8.	20	Basamak 6	0,5	1,5	5	1
9.	20	Basamak 6	0,5	3,5	2,5	0,5
10.	2,5	Basamak 9	1	1	1,25	0,250

Tablo VI: AMB, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin için seri dilüsyonların hazırlanması

Basamak	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Hacim(ml)	DMSO (ml)	Ara konsantrasyon (µg/ml)	RPMI ile 1/50 dilüsyon (µg/ml)
1.	1600	Stok			1600	32
2.	1600*	Stok	0,5	0,5	800	16
3.	1600	Stok	0,5	1,5	400	8
4.	1600	Stok	0,5	3,5	200	4
5.	200	Basamak 4	0,5	0,5	100	2
6.	200	Basamak 4	0,5	1,5	50	1
7.	200	Basamak 4	1	3,5	25	0,5
8.	25	Basamak 7	0,5	0,5	12,5	0,25
9.	25	Basamak 7	0,5	1,5	6,25	0,125
10.	25	Basamak 7	0,5	3,5	3,13	0,125
11.	3,13**	Basamak10	0,5	0,5	1,565	0,06

*: Kaspofungin için başlangıç basamağı, **: Kaspofungin için son basamak

3.3.4 İnokulum

Her bir izolat için SDA besiyerinde üremiş saf *Candida* kolonilerinden alınarak 5 ml steril serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığında ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyon vortekslenerek homojenize edildikten sonra, süspansiyondan 0.1 ml alınarak 4.9 ml RPMI içeren besiyerine konuldu (1/50 dilüsyon). Bu süspansiyon da vortekslenerek homojenize edildikten sonra süspansiyondan 0.25 ml alınarak 4.75 ml RPMI besiyeri içeren tüpün içine konuldu (1/20 dilüsyon). Toplamda $1/20 \times 1/50 = 1/1000$ dilüe edilmiş oldu ($1-5 \times 10^3$ hücre/ml).

Hazırlanan inoklüm solüsyonundan, mikroplakta 2x final antifungal konsantrasyonunu içeren ilk 10 kuyucuğa ve üreme kontrol kuyucuğu olan 11. kuyucuğa 100 µl eklendi. Onikinci kuyucuk sterilite kontrolü olduğundan dolayı inokülüm konulmadı. Böylece ilaç konsantrasyonları ve maya inokülüm miktarı ($0.5-2.5 \times 10^3$ hücre/ml) yarıya inerek final değerlere ulaşılmış oldu. Mikroplakların üzeri kendi kapakları ile kapatılıp 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Hem 24. saate hem de 48. saate değerlendirme yapıldı.

Antifungal ilaçların mikroplak kuyucuklarındaki final konsantrasyon değerleri Şekil 3, 4 ve 5'te gösterilmiştir.

SuşNo	16µg/ ml	8µg/ ml	4µg/ ml	2µg/ ml	1µg/ ml	0,5µg /ml	0,25µ g/ml	0,125 µg/ml	0,06µ g/ml	0,03µ g/ml	ÜK	BK
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Şekil 3: Mikroplak kuyucuklarındaki amfoterisin B, vorikonazol ve itrakonazol için final konsantrasyonları

ÜK:Üreme kontrolü, BK:Besiyeri kontrolü

SuşNo	8µg/ ml	4µg /ml	2µg/ ml	1µg/ ml	0,5µg/ ml	0,25µ g/ml	0,125 µg/ml	0,06µ g/ml	0,03µ g/ml	0,015 µg/ml	ÜK	BK
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Şekil 4: Kaspofungin için final konsantrasyonları

ÜK:Üreme kontrolü, BK:Besiyeri kontrolü

SuşNo	64µ g/ml	32µg /ml	16µ g/ml	8µg/ ml	4µg /ml	2µg/ ml	1µg/ ml	0,5µ g/ml	0,25µ g/ml	0,125µ g/ml	ÜK	BK
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

Şekil 5: Flukonazol için final konsantrasyonu

ÜK:Üreme kontrolü, BK:Besiyeri kontrolü

3.3.5 MİK Değerlerinin Saptanması

Değerlendirme öncesi mikroplaklar, kuyucuklardaki bulanıklığın homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Ayna (Şekil 6) yardımıyla kuyucukların bulanıklık dereceleri skorlandı.

Skorlar	Skorların Anlamı
+4	Üreme kontrol kuyucuğu ile eşit bulanıklıkta
+3	Üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklığın %75'i kadar bulanık
+2	Üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklığın %50'si kadar bulanık
+1	Üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklığın %25'i kadar bulanık
0	Bulanıklık yok (optik olarak berrak)

Bu skorlamaya göre amfoterisin B için 0, azoller ve kaspofungin için +2 olan en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi. MİK değeri okumaları CLSI'n önerdiği gibi amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin için 24 saat sonra, itrakonazol için 48 saat sonra yapıldı.

Amfoterisin B için CLSI tarafından direnç sınır değerleri belirlenmediğinden dolayı suşların bu antifungalle olan sonuçları duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilmedi. Ayrıca her tür için flukonazol, vorikonazol, kaspofungin ve itrakonazol için direnç sınır değerleri bildirilmediğinden dolayı direnç sınır değerleri belli olan suşlar için değerlendirilme yapılabilir. *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara göre duyarlılık sınır değerleri tablo VII' de verilmiştir (CLSI, 2012).



Şekil 6: Kuyucuklardaki bulanıklığın değerlendirilmesinde kullanılan ayna (çalışmamızdan)

Tablo VII: *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara göre MİK ($\mu\text{g/ml}$) duyarlılık sınır değerleri

Tür	Antifungal	Duyarlı	Doza bağlı duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
<i>C. albicans</i>	kaspofungin	≤ 0.25	-	0.5	≥ 1
	flukonazol	≤ 2.0	4.0	-	≥ 8
	vorikonazol	≤ 0.12	-	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. parapsilosis</i>	kaspofungin	≤ 2	-	4	≥ 8
	flukonazol	≤ 2	4.0	-	≥ 8
	vorikonazol	≤ 0.12	-	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. tropicalis</i>	kaspofungin	≤ 0.25	-	0.5	≥ 1
	flukonazol	≤ 2.0	4.0	-	≥ 8
	Vorikonazol	≤ 0.12	-	0.25-0.5	≥ 1
<i>C. glabrata</i>	kaspofungin	≤ 0.12	-	0.25	≥ 0.5
	flukonazol	-	≤ 32	-	≥ 64

3.4 Sensititre YeastOne ile antifungal çalışması

Çalışma test prosedürüne göre yapıldı. SDA besiyerinde üremiş saf *Candida* kolonilerinden alınarak, kit içerisindeki distile su dolu tüpler ile 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan sonra vortekslenerek homojen hale getirildi. Bu süspansiyondan 20 μl alınıp kit içerisinde çıkan 11 ml'lik YeastOne Broth'a aktarıldı ve homojen hale getirmek için vortekslendi. Final inokulum $1.5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml olmuştur. Liyofilize halde antifungalleri içeren Sensititre YeastOne mikroplağın her bir kuyucuğuna 100 μl bu süspansiyondan eklendi. Plağın üzeri bantla kapatılıp 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Mikroplak sadece bir suş içindir. Bir plakta 9 tane antifungal çalışılmakta bunlar; Amfoterisin B (0.12–8 $\mu\text{g/ml}$), 5-flusitozin (0.06–64 $\mu\text{g/ml}$), anidulafungin (0.015–8 $\mu\text{g/ml}$), kaspofungin 0.008–8, mikafungin (0.008–8 $\mu\text{g/ml}$), flukonazol (0,12-256 $\mu\text{g/ml}$), itrakonazol (0.015–16 $\mu\text{g/ml}$), posakonazol (0.008–8 $\mu\text{g/ml}$) ve vorikonazol (0.008–8 $\mu\text{g/ml}$)' dür. Mikroplağın şematik görüntüsü selkil-7'de verildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	AND 0.015	AND 0.03	AND 0.06	AND 0.12	AND 0.25	AND 0.5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0.12
B	MF 0.008	MF 0.015	MF 0.03	MF 0.06	MF 0.12	MF 0.25	MF 0.5	MF 1	MF 2	MF 4	MF 8	AB 0.25
C	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AB 0.5
D	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
E	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	AB 2
F	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AB 4
G	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	AB 8
H	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256

Şekil 7: Sensititre YeastOne mikroplağı

AB:Amfoterisin B, FC: 5-Flusitozin, AND: Anidulafungin, CAS: Kaspofungin, MF: Mikafungin, FZ: Flukonazol, IZ: İtrakonazol, PZ: Posakonazol, VOR: Vorikonazol

Değerlendirme göz ile renk değişimlerine bakılarak yapıldı. Pembe renk üremeyi, mor renk kısmi inhibisyonu, mavi renk ise üremenin olmadığını gösterir. İnkübasyon sonunda pozitif kontrol kuyucuğunun rengi maviden pembeye dönmüş ise mikroplak değerlendirilmeye alındı. Ancak büyüme kontrolü hafif mor veya hala mavi ise mikroplak tekrar inkübasyona kaldırıldı. Üremenin olmadığı veya kısmi üremenin engellendiği ilk kuyucuk MİK olarak değerlendirildi (MCS-Diagnostics., 2012).

3.4.1 Antifungallere göre MİK değerlendirme kriterleri

Amfoterisin B

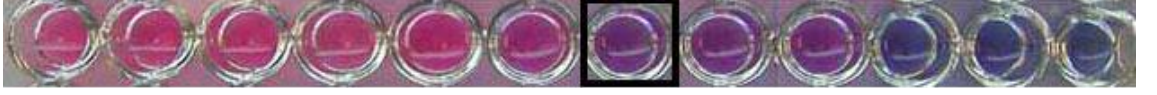
Üreme kontrolüne göre aşıkarak renk değişikliğinin olduğu ilk kuyucuk (mavi) MİK olarak değerlendirilir (Şekil 8).



Şekil 8: Sensititre YeastOne'da AMB MİK okunması(MCS-Diagnostics., 2012)

Flusitozin ve azol grubu antifungaller

Üreme kontrolüne göre daha az yoğun renk değişikliği gösteren ilk kuyucuk (mor) MİK olarak değerlendirilir (Şekil 9).



Şekil 9: Sensititre YeastOne'da azol grubu antifungallerin MİK okunması (MCS-Diagnostics., 2012)

Kaspofungin

Üreme kontrolüne göre daha az yoğun renk değişikliği gösteren ilk kuyucuk (mor) MİK olarak değerlendirilir (Şekil 10).



Şekil 10: Sensititre YeastOne'da kaspo fungin MİK okunması (MCS-Diagnostics., 2012)

MALDI-TOF MS ile çalışma:

Tanımlama için Vitec MS (Biomérieux, Fransa) cihazı kullanıldı. Çalışma test prosedürüne göre yapıldı. Çalışmaya dahil edilen *Candida*'ların her birinin SDA besiyerinde 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilmiş saf kolonilerinden steril 1µl'lik tek kullanımlık öze ile alınarak *Candida* VITEC MS slayt kuyucuğuna uygun olarak yayıldı. Kuyucuk üzerine 0,5µl formik asit ilave edilip kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuk üzerine 1µl matris solüsyonu ilave edilip kurumaya bırakıldı. Bu işlemler her *Candida* için tekrarlandı.

3.5 Veri Analizi

Veri analizi, Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (ADT) için Food and Drug Administration klavuzuna göre yapılmıştır. Buna göre ADT'de, Esansiyel uyum (EU), kategorik uyum (KU), çok büyük hata (ÇBH), büyük hata (BH) ve küçük hata (KH) aşağıdaki formüller ve tanımlamalar kullanılarak hesaplanmıştır (FDA, 2009)

KU: Değerlendirilen yeni yöntem ve CLSI referans metodunun duyarlı, orta

duyarlı, dirençli kategorik sonuçları arasında, uyum olmasıdır.

$$KU = \frac{\text{Referans metodla kategorik uyumlu olanlar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

EU: Değerlendirilen yeni yöntem ve CLSI referans metod sonuçlarının, aynı olması veya aralarındaki farkın +/- 1 dilüsyon içinde olması.

$$EU = \frac{\text{Referans metodla tam uyumlu veya +/- 1 dilüsyon içinde uyumlu olanlar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

BH: CLSI referans kategorik sonucu duyarlı, yeni yöntemin sonucu dirençli ise, büyük hata denir.

$$BH = \frac{\text{Kategorik uyuma dayalı büyük hatalar}}{\text{Referans metodla duyarlı bulunan toplam organizma sayısı}} \times 100$$

KH: CLSI referans kategorik sonucu dirençli veya duyarlı, yeni yöntemin sonucu orta duyarlıya veya tam tersi CLSI referans kategorik sonucu orta duyarlı, yeni yöntem sonucu dirençli veya duyarlıya küçük hatadır.

$$KH = \frac{\text{Kategorik uyuma dayalı küçük hatalar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

ÇBH: CLSI referans kategori sonucu dirençli ve yeni yöntem sonucu duyarlıya çok büyük hatadır.

$$\text{ÇBH} = \frac{\text{Kategorik uyuma dayalı çok büyük hatalar}}{\text{Referans metodla dirençli bulunan organizma sayısı}} \times 100$$

4 BULGULAR

Kan kültürlerinden izole edilen 71 *Candida* suşunun tür tayini germ tüp testi, kromojenik besiyeri ve pirinç ekstresi-Tween 80 agar kullanılarak yapıldı. Tür tayini sonucu göre; 37'si (%52,1) *C. albicans*, 34'ü (%47,9) non-*albicans Candida* (20 *C. parapsilosis*, 7 *C. glabrata*, 4 *C. tropicalis*, 2 *C. kefyr*, 1 *C. lusitaniaee*) olarak tanımlandı. Türlerin dağılımı tablo VIII'de gösterildi.

Tablo VIII: *Candida* türlerinin dağılımı ve yüzdeleri

Tür	Sayı	%
<i>C. albicans</i>	37	52,1
<i>C. parapsilosis</i>	20	28,2
<i>C. glabrata</i>	7	9,9
<i>C. tropicalis</i>	4	5,6
<i>C. kefyr</i>	2	2,8
<i>C. lusitaniaee</i>	1	1,4

Konvansiyonel yöntem ile tanımlanmış tüm suşların Vitek MS ile de tanımlaması yapıldı ve konvansiyonel yöntemlerle uyumlu bulundu (Tablo IX).

Tablo IX: Vitek MS ve konvansiyonel yöntemler ile tanımlamanın karşılaştırılma sonuçları.

	Tür	Vitek MS					
		<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. lusitaniaee</i>
Konvansiyonel yöntem	<i>C. albicans</i>	37					
	<i>C. parapsilosis</i>		20				
	<i>C. glabrata</i>			7			
	<i>C. tropicalis</i>				4		
	<i>C. kefyr</i>					2	
	<i>C. lusitaniaee</i>						1

C. albicans suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'inde 0.125 µg/ml, 12'sinde 0,25 µg/ml, 24'ünde 0,5 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 19'ünde ≤0.015 µg/ml, 13'ünde 0,03 µg/ml, 3'ünde 0,06 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 32'sinde ≤0.12 µg/ml, 5'inde 0,25 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 35'inde ≤0.03 µg/ml, 2'sinde 0,06 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri 37'sinde ≤0.03 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının Sensititre Yeastone mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 2'sinde 0.12 µg/ml, 30'unda 0,25 µg/ml, 5'inde 0,5 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 1'inde 0,015 µg/ml, 30'unda 0,03 µg/ml, 5'inde 0,06 µg/ml, 1'inde 0,12 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 4'ünde ≤0.12 µg/ml, 30'unda 0,25 µg/ml, 3'ünde 0,5 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 25'inde ≤0.015 µg/ml, 11'inde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri; 36'sında ≤0.008 µg/ml, 1'inde 0,015 µg/ml olarak saptandı. *C. albicans* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri Tablo X'da verildi.

Tablo X: *C. albicans* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri.

SUŞ NO	AMB		KAS		FLU		İTR		VOR	
	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST
1	0,5	0,25	0,06	0,06	≤0,12	0,25	0,06	0,03	≤0,03	≤0,008
2	0,25	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	0,06	0,03	≤0,03	≤0,008
3	0,25	0,5	0,03	0,03	≤0,12	≤0,12	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
4	0,5	0,25	0,03	0,03	0,25	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
5	0,25	0,25	0,03	0,06	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
6	0,25	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
7	0,25	0,5	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,015	≤0,03	0,015
8	0,25	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
9	0,25	0,5	0,03	0,03	≤0,12	0,25	0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
10	0,25	0,5	≤0,015	0,015	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
11	0,12	0,12	≤0,015	0,03	0,25	0,5	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
12	0,5	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
13	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008

Tablo X devam: *C. albicans* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikroplak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri

14	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
15	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
16	0,25	0,25	0,03	0,06	≤0,12	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
17	0,5	0,25	0,06	0,06	0,25	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
18	0,5	0,5	0,06	0,12	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
19	0,5	0,25	0,03	0,06	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
20	0,5	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
21	0,5	0,5	≤0,015	0,03	≤0,12	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
22	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
23	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	≤0,12	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
24	0,5	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
25	0,5	0,5	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,06	≤0,03	≤0,008
26	0,5	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
27	0,5	0,25	≤0,015	0,03	0,25	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
28	0,5	0,12	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
29	0,5	0,25	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
30	0,25	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
31	0,25	0,25	0,03	0,03	0,25	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
32	0,5	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
33	0,25	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
34	0,25	0,5	≤0,015	0,03	≤0,12	≤0,12	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
35	0,25	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
36	0,25	0,5	0,03	0,03	≤0,12	0,25	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
37	0,25	0,25	≤0,015	0,03	≤0,12	≤0,12	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008

KAS: Kaspofungin, FLC: Flukonazol, İTR: İtrakonazol, VOR: Vorikonazol

C. parapsilosis suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 10'unda 0,25 µg/ml, 10'unda 0,5 µg/ml kaspofungin için MİK değerleri; 2'si 0,25 µg/ml, 17'si 0,5 µg/ml, 1'i 1 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 3'ünde 0,25 µg/ml, 9'unda 0,5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, 1'i 2 µg/ml, 5'inde 16 µg/ml,

ittrakonazol için MİK değerleri; 7'sinde ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 8'i 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,5 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol için MİK değerleri; 15'inde ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 5'i 0,12 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. parapsilosis suşlarının Sensititere Yeastone mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 2'sinde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 16'sı 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,5 $\mu\text{g/ml}$, kaspofungin için MİK değerleri; 6'sında 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 11'0,5 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 1 $\mu\text{g/ml}$, flukonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 10'0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 1 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 2 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 4 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 8 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 16 $\mu\text{g/ml}$, ittrakonazol için MİK değerleri; 7'sinde ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 5'inde 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 5'inde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 1 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol için MİK değerleri; 7'sinde ≤ 0.008 $\mu\text{g/ml}$, 6'sında 0,015 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 5'inde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,12 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı. *C. parapsilosis* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri tablo XI'de verildi.

C. glabrata suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'inde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 6'sında 0,5 $\mu\text{g/ml}$, kaspofungin için MİK değerleri; 3'ünde 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, flukonazol için MİK değerleri; 3'ünde 2 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 4 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 8 $\mu\text{g/ml}$, ittrakonazol için değerleri; 1'inde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 0,5 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol için MİK değerleri; 2'sinde ≤ 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,25 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının Sensititere yeastone mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 2'sinde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 5'inde 0,5 $\mu\text{g/ml}$, kaspofungin için MİK değerleri; 1'inde 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 5'inde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, flukonazol için MİK değerleri; 1'inde 2 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 4 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 8 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 16 $\mu\text{g/ml}$, ittrakonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 3'ünde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,5 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0,06 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,12 $\mu\text{g/ml}$, 2'sinde 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 1'inde 0,5 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı. *C. glabrata* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre Yeastone mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri Tablo'XII'de verildi.

Tablo XI: *C. parapsilosis* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre Yeastone mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri

SUŞ NO	AMB		KAS		FLU		İTR		VOR	
	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST
38	0,25	0,25	1	1	2	2	0,06	0,06	≤0,03	0,03
39	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	0,06	0,06	≤0,03	0,03
40	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
41	0,5	0,12	0,5	0,5	0,5	1	0,06	0,06	≤0,03	0,015
42	0,25	0,25	0,25	2,5	0,5	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	0,015
43	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,06	≤0,015	≤0,03	0,015
44	0,25	0,25	0,5	0,5	16	4	0,12	0,12	0,12	0,06
45	0,25	0,25	0,5	1	16	4	0,5	1	0,12	0,06
46	0,5	0,25	0,5	0,25	1	0,5	0,06	≤0,015	≤0,03	≤0,008
47	0,5	0,12	0,5	0,25	0,25	0,25	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
48	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	≤0,03	0,03	≤0,03	≤0,008
49	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,06	0,03	≤0,03	≤0,008
50	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	0,015
51	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
52	0,25	0,25	0,25	0,5	16	8	0,12	0,06	0,12	0,06
53	0,25	0,25	0,5	0,25	16	16	0,25	0,12	0,12	0,12
54	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,06	0,03	≤0,03	0,015
55	0,25	0,25	0,5	1	16	8	0,25	0,06	0,12	0,06
56	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,06	0,006	≤0,03	0,015
57	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008

Tablo XII: *C. glabrata* suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre Yeastone mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri

SUŞ NO	AMB		KAS		FLU		İTR		VOR	
	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST
58	0,5	0,5	0,03	0,06	4	8	0,5	0,5	0,12	0,25
59	0,25	0,25	0,03	0,06	2	2	0,12	0,25	0,03	0,12
60	0,25	0,5	0,06	0,06	4	8	0,5	0,12	0,12	0,06
61	0,5	0,25	0,25	0,25	8	8	0,25	0,25	0,25	0,5
62	0,5	0,5	0,06	0,06	4	16	0,5	0,5	0,06	0,25
63	0,5	0,5	0,03	0,06	2	4	0,25	0,12	≤0,03	0,06
64	0,5	0,5	0,06	0,03	2	4	0,25	0,25	0,06	0,12

C. tropicalis suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'inde 0,25 µg/ml, 2''sinde 0,5 µg/ml, 1'inde 1 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 1'inde ≤0.015 µg/ml, 2'sinde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 3'ünde 0,5 µg/ml, 1'inde 1 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 1'inde 0.06 µg/ml, 3'ünde 0,12 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri, 3'ünde ≤0.03 µg/ml, 1'inde 0,5 µg/ml olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının Sensitire Yeastone mikroplak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'inde 0,25 µg/ml, 3'ünde 0,5 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 2'sinde 0,03 µg/ml, 2'sinde 0,06 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 1'inde 0,5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, 1'inde 2 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0.06 µg/ml, 1'inde 0,12 µg/ml, 1'inde 0,25 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri; 3'ünde 0.06 µg/ml, 1'inde 0,25 µg/ml olarak saptandı.

C. kefir suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'inde 0,5 µg/ml, 1'inde 1 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 2'sinde ≤0.015 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0,25 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 2'sinde ≤0.03 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri, 2'sinde ≤0.03 µg/ml, olarak saptandı.

C. kefir suşlarının Sensitire yeastone mikroplak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 2'sinde 0,5 µg/ml, kaspofungin için MİK değerleri; 2'sinde 0,03 µg/ml, flukonazol için MİK değerleri; 2'sinde ≤0,12 µg/ml, itrakonazol için MİK değerleri; 2'sinde ≤0.015 µg/ml, vorikonazol için MİK değerleri; 2'sinde ≤0.008 µg/ml olarak saptandı. Tablo

C. lusitaniae suşunun referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B, kaspofungin, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için MİK değerleri sırasıyla; 0,12 µg/ml, 0,12 µg/ml, 1 µg/ml, 0,06 µg/ml , ≤0,03 µg/ml olarak bulundu.

C. lusitaniae suşunun Sensitire Yeastone mikroplak yönteminde amfoterisin B, kaspofungin, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için MİK değerleri sırasıyla 0,5 µg/ml, 0,12 µg/ml, 1 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,015 µg/ml olarak bulundu. *C. tropicalis*, *C. kefir* ve *C. lusitaniae*, suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensitire mikroplak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri Tablo XIII'de verildi.

Tablo XIII: *C. tropicalis*, *C. kefyr* ve *C. lusitaniae*, suşlarının referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemleriyle saptanan MİK değerleri

SUŞ NO	AMB		KAS		FLU		İTR		VOR	
	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST	RM	ST
65	1	0,5	0,03	0,03	0,5	1	0,12	0,12	≤0,03	0,06
66	0,25	0,25	≤0,015	0,03	0,25	0,5	0,06	0,06	≤0,03	0,06
67	0,5	0,5	0,06	0,06	1	1	0,12	0,06	≤0,03	0,06
68	0,5	0,5	0,03	0,06	0,5	0,5	0,12	0,25	0,06	0,12
69	0,5	0,5	≤0,015	0,03	0,25	≤0,12	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
70	1	0,5	≤0,015	0,03	0,25	≤0,12	≤0,03	≤0,015	≤0,03	≤0,008
71	0,12	0,5	0,12	0,12	1	1	0,06	0,06	≤0,03	0,015

65-68: *C. tropicalis*, 69-70: *C. kefyr*, 71: *C. lusitaniae*

Test edilen suşların %50'sini inhibe eden konsantrasyon MİK 50, %90'ını inhibe eden konsantrasyon MİK 90 olarak ifade edildi. *Candida* türlerinde antifungal ilaçların referans mikrodilüsyon ve Sensititre mikropalak yöntemi ile elde edilen MİK aralıkları, MİK 50 ve MİK 90 değerleri toplu olarak Tablo XIV'de sunuldu.

Tablo XIV: *Candida* türlerinin antifungaller için her iki yöntemde MİK 50 ve MİK 90 değerleri.

TÜR		Referans mikrodilüsyon					Sensititre				
		AMB	KAS	FLU	İTR	VOR	AMB	KAS	FLU	İTR	VOR
<i>C. albicans</i>	MİK Aralık($\mu\text{g/ml}$)	0,12-0,5	$\leq 0,015-0,06$	$\leq 0,12-0,25$	$\leq 0,03-0,06$	$\leq 0,03$	0,12-0,5	0,015-0,06	$\leq 0,12-0,5$	$\leq 0,015-0,06$	$\leq 0,008-0,015$
	MİK 50 ($\mu\text{g/ml}$)	0,5	$\leq 0,015$	$\leq 0,12$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,25	0,03	0,25	$\leq 0,015$	$\leq 0,008$
	MİK 90($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,03	0,25	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5	0,06	0,25	0,03	$\leq 0,008$
<i>C. parapsilosis</i>	MİK Aralık($\mu\text{g/ml}$)	0,25-0,5	0,25-1	0,25-16	$\leq 0,03-0,5$	$\leq 0,03-0,12$	0,12-0,5	0,25-1	0,25-16	$\leq 0,015-1$	$\leq 0,008-0,12$
	MİK 50($\mu\text{g/ml}$)	0,25	0,5	0,5	0,06	$\leq 0,03$	0,25	0,5	0,5	0,03	$\leq 0,008$
	MİK 90($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,5	16	0,25	0,12	0,25	1	8	0,12	0,06
<i>C. galabrata</i>	MİK Aralık($\mu\text{g/ml}$)	0,25-0,5	0,03-0,25	2-8	0,12-0,5	$\leq 0,03-0,25$	0,25-0,5	0,03-0,25	2-16	0,12-0,5	0,06-0,5
	MİK 50($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,06	4	0,25	0,25	0,5	0,06	8	0,25	0,12
Diğer türler	MİK Aralık($\mu\text{g/ml}$)	0,12-1	$\leq 0,015-0,12$	0,25-1	$\leq 0,03-0,12$	$\leq 0,03-0,5$	0,25-0,5	0,03-0,12	$\leq 0,12-2$	$\leq 0,015-0,25$	0,03-0,12
	MİK 50($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,03	0,5	0,06	$\leq 0,03$	0,5	0,03	1	0,06	0,06
Toplam	MİK Aralık($\mu\text{g/ml}$)	0,12-1	$\leq 0,015-1$	$\leq 0,12-16$	$\leq 0,03-0,5$	$\leq 0,03-0,5$	0,12-0,5	0,015-1	$\leq 0,12-16$	$\leq 0,015-1$	$\leq 0,008-0,5$
	MİK 50($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,03	0,25	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,25	0,03	0,25	0,03	$\leq 0,008$
	MİK 90($\mu\text{g/ml}$)	0,5	0,5	4	0,25	0,12	0,5	0,5	4	0,12	0,06

CLSI M27-S4 kriterlerine göre *Candida* türlerinin antifungallere karşı duyarlılık durumları oluşturulmuştur. Buna göre *C. albicans* suşları her iki yöntem ile amfoterisin B, kaspofungin, flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlı bulundu. *C. parapsilosis* suşları her iki yöntem ile kaspofungin ve vorikonazole karşı duyarlı bulunmuş olup flukonazole karşı referans mikrodilüsyon ile üç suş dirençli; Sensititre YeastOne ile bir suş dirençli, iki suş ise doza bağlı duyarlı bulundu. *C. glabrata* suşları her iki yöntem ile flukonazole karşı doza bağlı duyarlı bulundu. Kaspofungine karşı altı suş her iki yöntemde de duyarlı bulunurken bir suş her iki yöntemde de dirençli bulundu. *C. tropicalis* suşları kaspofungin, flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlı bulunmuştur. *Candida*'ların direnç durumları Tablo XV' verilmiştir.

Türlere göre antifungallerin Hata, EU ve KU oranları Tablo XVI'da verilmiştir.

Tablo XV: *Candida* türlerinde referans mikrodilüsyon ile Sensititre YeastOne arasındaki direnç durumları

TÜR	Antifungal	Referans mikrodilüsyon				Sensititre			
		D	DBD	OD	Dİ	D	DBD	OD	Dİ
<i>C. albicans</i>	KAS	37				37			
	FLU	37				37			
	VOR	37				37			
<i>C. parapsilosis</i>	KAS	20				20			
	FLU	17			3	17	2		1
	VOR	20				20			
<i>C. glabrata</i>	KAS	6		1		6		1	
	FLU		7				7		
<i>C. tropicalis</i>	KAS	4				4			
	FLU	4				4			
	VOR	4				4			

D: Duyarlı, DBD: Doza bağlı duyarlı, OD: Orta duyarlı, Dİ: Dirençli

Tablo XVI: Türlerle göre antifungallerin Hata, EU ve KU oranları

Tür	Antifungal	Hata Oranı (%)			Uyum Oranı (%)	
		KH	BH	ÇBH	KU	EU
<i>C. albicans</i>	Amfoterisin B	-	-	-	-	97,3
	Kaspofungin	0	0	0	100	100
	Flukonazol	0	0	0	100	94,6
	İtrakonazol	0	0	0	100	100
	Vorikonazol	0	0	0	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	Amfoterisin B	-	-	-	-	90
	Kaspofungin	0	0	0	100	100
	Flukonazol	10	0	0	90	90
	İtrakonazol	-	-	-	-	85
	Vorikonazol	0	0	0	100	100
<i>C. glabrata</i>	Amfoterisin B	-	-	-	-	100
	Kaspofungin	0	0	0	100	100
	Flukonazol	0	0	0	100	85,7
	İtrakonazol	-	-	-	-	85,7
	Vorikonazol	-	-	-	-	85,7
<i>C. tropicalis</i>	Amfoterisin B	-	-	-	-	100
	Kaspofungin	0	0	0	100	100
	Flukonazol	0	0	0	100	100
	İtrakonazol	-	-	-	-	100
	Vorikonazol	0	0	0	100	100
Diğer türler	Amfoterisin B	-	-	-	-	100
	Kaspofungin	-	-	-	-	100
	Flukonazol	-	-	-	-	100
	İtrakonazol	-	-	-	-	100
	Vorikonazol	-	-	-	-	100
Toplam	Amfoterisin B	-	-	-	-	94,4
	Kaspofungin	0	0	0	100	100
	Flukonazol	2,9	0	0	97,1	93
	İtrakonazol	-	-	-	-	94,4
	Vorikonazol	0	0	0	100	98,6

Hata ve KU oranları direnç durumu belirlenebilen suşlar arasında değerlendirilmiştir.

5 TARTIŞMA

Candida türleri, immün sistemi baskılanmış veya uzun süre hastanede yatan hastalar arasında son yirmi yılda önemli enfeksiyon nedenleri arasındadır (Michael A Pfaller ve Diekema, 2010). *Candida* enfeksiyonu için; kemik iliği ve organ transplantasyonu olan, büyük cerrahi girişim geçiren, neoplastik hastalığı olan, immünsupresif tedavi alan, ileri yaştaki kişiler ve prematür bebekler yüksek riskli hasta gruplarıdır. Ayrıca geniş spektrumlu antibakteriyel ajanların, kortikosteroidlerin, sitotoksik, kemoterapötik ajanların ve intravasküler kateter kullanımı *Candida* enfeksiyonları için önemli risk faktörleridir (Michael A Pfaller ve Diekema, 2010).

Candida'ların sebep olduğu sepsislerin sıklığı giderek artmaktadır (Giri ve Kindo, 2012). ABD'de 1979 ve 2000 yılları arasındaki verileri kapsayan bir epidemiyolojik çalışmada mantarların neden olduğu sepsis yıllık olgu sayısı %207 oranında arttığı bulunmuştur (Martin, Mannino, EatonMoss, 2003). Wisplinghoff ve arkadaşlarının yapmış oldukları 49 merkezli bir çalışmada, 24179 nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonunun % 9,5'inin sebebi mantarlar olup bunların da %95'ini *Candida* türleri oluşturmaktadır (Wisplinghoff ve ark., 2004).

Kandidemiye bağlı mortalite diğer mikrobiyal etkenlerin sebep olduğu mortaliteden çok daha yüksektir (E. Tümbay, 2010). Bu hastalarda mortalite oranları %5 ile %71 arasında değişebilmektedir. Ancak çoğu çalışmada mortalite oranlarının %30'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Dignanive ark., 2009; Sofair ve ark., 2006; Zaoutis ve ark., 2005). Ayrıca kandidemi, hastaların hastanede kalış sürelerini uzatarak hasta maliyetlerini arttırmakta ve böylelikle ciddi ekonomik kayıplara da neden olmaktadır (Morgan ve ark., 2005; Pittet, Li, WoolsonWenzel, 1997; Zaoutisve ark., 2005).

C. albicans, kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen *Candida*'lar arasında en yaygın tür olmakla birlikte non-*albicans Candida* sıklığı giderek artmaktadır (Giri ve Kindo, 2012; Yamamura, Rotstein, NicolleIoannou, 1999). ARTEMIS surveyans programının sonuçlarına göre; *C. albican*'sın sıklığı azalmakla birlikte kandan izole edilen maya türleri arasında hala birinci sırada yer almaktadır. Bu çalışmaya göre *C.*

tropicalis'in, *C. parapsilosis*'in, *C. glabrata*'nın prevalansı yükselirken; *C. albicans*'ın prevalansı düşmüştür. Ayrıca *C. guilliermondii*, *C. kefyr* ve *C. rugosa* gibi nadir türlerin izolasyon oranları ise iki ile on kat artış gösterilmiştir (MA Pfaller ve ark., 2005). Non-*albicans Candida* türlerinin artışında tedavi amaçlı veya profilaktik olarak (kemik iliği alıcılarında olduğu gibi) yoğun antifungallerin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Antifungal kullanımına bağlı olarak hastaların florasında bulunan duyarlı *C. albicans* suşları ortadan kalkmakta ve daha az virülan olan ancak antifungallere iyi yanıt vermeyen *C. albicans* dışı türlerin seleksiyonu olmaktadır (Ener, 1999; E. Tümbay, 2010). Ayrıca enfeksiyon önlemlerine yeterince uyulmaması sonucunda *C. parapsilosis* enfeksiyonları artabilmektedir (E. Tümbay, 2010).

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda *Candida* türleri arasında kandideminin en sık sebebebi *C. albicans*' tır. İkinci en yaygın tür ülkeden ülkeye hastaneden hastaneye değişkenlik gösteren *C. glabrata* ve *C. prapsilosis* olabilmektedir (Guinea, 2014). İtalya ve İspanya'yı kapsayan kandidemi etkenlerinin surveyans çalışmasında; *C. albicans* %58,4 ile birinci sırada iken *C. parapsilosis* %19,5 ile ikinci sırada yer almıştır. Sırasıyla diğer türler *C. tropicalis* (%9,3) ve *C. glabrata* (%8,3) olarak tespit edilmiştir. (Bassetti ve ark., 2013). ABD' de yapılan ve benzer sonuçların elde edildiği bir çalışmada da üçüncü sırada *C. glabrata* ve dördüncü sırada *C. tropicalis* tespit edilmiştir (Wisplinghoff ve ark., 2014). İsviçrede yapılan 6 yıllık dönemi kapsayan kandidemi etkenlerinin surveyans çalışmasında türlerin oranları sırasıyla *C. albicans* (%61,9), *C. glabrata* (%17,5), *C. tropicalis* (%5,9), *C. parapsilosis* (%5,4) olarak bulunmuştur (Orasch ve ark., 2014).

C. albicans, ülkemizde yapılan benzer çalışmalarda da ilk sırada izole edilen tür olmuştur. Gültekin ve ark. kandidemi etkenleri olarak sırasıyla *C. albicans* (% 49), *C. parapsilosis* (% 23), *C. tropicalis* (% 14), *C. glabrata* (% 12) olarak tespit etmişlerdir (Gültekin, Eyigör, Telli, AksoyAydın, 2010). Atalay ve ark. yapmış olduğu çalışmada kandidemi etkenlerini sırası ile *C. albicans* (%68), *C. parapsilosis* (%14.5), *C. glabrata* (%9.3), *C. krusei* (%4.1), *C. tropicalis* (%3.1) olarak tespit etmişlerdir (Atalay, Sav, DemirKoç, 2012).

Çalışmamızda kandidemi etkenlerini sırası ile *C. albicans* (%52,1), *C. parapsilosis* (%28,2), *C. glabrata* (%9,9), *C. tropicalis* (%5,6), *C. kefyr* (%2,8), *C.*

lusitaniae (%1,4) olarak tespit ettik ve *C. parapsilosis* izolasyon oranları çoğu çalışmaya göre yüksek saptadık. Hastanemizde 2007-2009 yılları arasında yapılan çalışmada da *C. parapsilosis* (%25) ikinci sırada tespit edilmiştir (Birinci ve ark., 2011). *C. Parapsilosis* deri florasında yaygın olarak bulunur ve biyofilm oluşturabilme özelliği nedeniyle kateterli hastalarda yüksek oranda enfeksiyona sebep olur. Bulaşta hastane personelinin elleri önemli bir etkidir, buna bağlı olarak hastane personelinden kaynaklanan *C. parapsilosis* salgınları olabilmektedir (Ener, 1999; Michael A Pfaller ve Diekema, 2010).

Kandidemi etkenleri arasında antifungallere dirençli veya duyarlılığı azalmış olabilen *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *C. lusitaniae* gibi türlerin sıklığının artması; *Candida*'ların tanımlanmasını ve antifungal duyarlılığının çalışılmasını önemli hale getirmiştir (MA Pfaller ve Diekema, 2012). Ayrıca kandideminin tanısının ve tedavisinin erken yapılması başarılı tedavi için kritik öneme sahiptir. Kandidemiye neden olan türlerin tanımlanmasındaki gecikme veya etkin olmayan antifungalın başlanması sonucunda hasta mortalitesi artmaktadır (Gareyve ark., 2006; Ostrosky-Zeichner, 2012). Aynı zamanda tanımlama ve antifungal duyarlılığının çalışılması, *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojik verilerin elde edilmesi ve ampirik tedaviye yön vermesi açısından önemlidir (Eddouze ark., 2013). Ayrıca tedavi sırasında yeni gelişebilecek olan direnci tespit etmek için antifungal duyarlılığı çalışılmalıdır (MA Pfaller ve Diekema, 2012).

Rutin olarak laboratuvarlarda *Candida*'ların tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler (germ tüp testi, kromojenik besiyeri, *Candida*'ların mikroskopik ve morfolojik özellikleri, biyokimyasal ve enzimatik testler) kullanılmaktadır (Fatania, Fraser, Savage, HartAbdolrasouli, 2015; Nerurkar, Khan, KattungalBhatia, 2014). Bu yöntemlerin tanımlama kısıtlılığı, uygulama ve değerlendirme zorluğu, deneyim gerektirmesi ve uzun sürmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Eddouze ark., 2013; Sendid ve ark., 2013). Bu nedenle yeni tanımlama yöntemi arayışları devam etmektedir. Bu yöntemler arasında son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanıma giren, koloniden hızlı ve doğru tanımlama yapabilen MALDI-TOF MS sistemi yer almaktadır (Eddouze ark., 2013).

Fatania ve ark. maya tanımlanmada konvansiyonel yöntemler ile MALDI-TOF

MS arasındaki uyumu karşılaştırdıkları çalışmada uyumu %91 olarak bulmuşlardır. Klinikte sıklıkla karşılaşılan ve tanımlanmasında problem yaşanmayan; *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii* gibi suşları arasındaki uyum ise %100 olarak tespit edilmiştir. (Fataniave ark., 2015).

İrirart ve ark. yapmış oldukları çalışmada benzer sonuçlar bulmuşlar ve *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C parapsilosis* suşlarını her iki yöntem ile tam uyumlu olarak tanımlamışlardır. (Iriart ve ark., 2012)

Lohmann ve ark. yapmış oldukları çalışmada konvansiyonel yöntemler ile MALDI-TOF MS arasındaki uyumu %87,2 olarak bulmuşlardır. *Candida* türleri dışındaki mayaların fazla olması uyum oranını düşürmüştür. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefy*, *C. guilliermondii* *C. lusitaniae* türlerinde uyum %100 olarak tespit edilmiştir (Lohmann ve ark., 2013).

Yaman ve ark. 281 kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında MALDI-TOF MS'i kullanmışlar ve tüm türleri doğru olarak tanımlayabilmişlerdir (Yaman, AkyarCan, 2012). Bu çalışmada *Candida* türlerinin dağılımına baktığımızda klinik olarak sık izole edilen türlerdir.

Çalışmamızda MALDI-TOF MS ile konvansiyonel yöntemlerin uyumu %100 olarak bulunmuştur. Uyumun yüksek olması benzer çalışmalarda olduğu gibi klinikte nadir görülen türlerin suşlarımız arasında olmamasıdır. Sonuçlarımız MALDI-TOF MS'in güvenilir tanımlama metodu olduğunu düşündürmektedir. Maya tanımlaması için kullanılan konvansiyonel yöntemler ile güvenilir sonuç alabilmek için 2-3 güne ihtiyaç vardır. MALDI-TOF MS'in en önemli avantajı kültür üremesi sonrasında tanımlamayı dakikalar içinde yapabilmesi ve aynı gün içerisinde güvenilir sonuç vermesidir. Böylelikle tedavide daha erken yol gösterici olabilir. Ayrıca konvansiyonel yöntemlere göre çalışılmasının ve değerlendirmenin kolay olması önemli bir avantajdır. Ancak MALDI-TOF MS cihazının kendisinin pahalı olmasından dolayı günlük mikroorganizma tanımlama sayısının düşük olan laboratuvarlar için uygun olmadığı kanaatindeyiz.

Tanımlanan suşlara yapılan duyarlılık testleri için dünyada yaygın olarak CLSI ve EUCAST klavuzları kullanılmaktadır. Ancak antifungal duyarlılık testlerinin zaman

içerindeki gelişimi antibakteriyel duyarlılık testlerinin gelişiminden geri kalmıştır. Son 30 yıl öncesine kadar invaziv *Candida* enfeksiyonlarının sıklığının ve antifungal tedavi seçeneklerinin az olması antifungal duyarlılık testlerinin gelişimini geciktirmiştir. İlk yöntem 1992 CLSI tarafından geliştirilmesine rağmen ilk antifungallerin direnç sınır değerleri 1997 de sunulmuştur (Hospenthal, MurrayRinaldi, 2004). Şu an referans yöntem olan CLSI mikrodilüsyon yönteminin 2012’de güncellenmiş dördüncü baskısı bulunmaktadır.

CLSI tarafından AMB için yorumlu direnç sınır değerleri oluşturulamamıştır (CLSI, 2008). Ancak çalışmalar AMB MİK değerinin 1µg/ml’nin üzerinde saptanması durumunda tedavide direnç gözlenebileceği bildirilmektedir (Diekema ve ark., 2009). EUCAST kriterlerine göre AMB MİK’i 1µg/ml üzeri dirençli kabul edilmektedir (EUCAST, 2015). AMB direnci genel olarak *C. albicans* türleri AMB’e duyarlı olmaları ile birlikte bazı çalışmalarda non-*albicans Candida* türlerinin dirençli olabileceği rapor edilmiştir (Diekemave ark., 2009; Michael A Pfaller ve Diekema, 2010). Dünyada ve Türkiye’de kandidemi etkenlerine yönelik yapılan birçok çalışmada, tüm *Candida* türlerinde AMB MİK’leri duyarlılık sınırları içerisinde bulunmuştur (Kuzucu, YetkinÇalışkan, 2007; Özbek, TekayPirinçioğlu, 2012; Tortorano ve ark., 2013; Wisplinghoffve ark., 2014). Bizim çalışmamızda AMB MİK aralığımız tüm suşlarda 0,12 -1 µg/ml olup tüm suşlar AMB’ye karşı duyarlı olarak kabul edilebilir.

Kandidemi etkenlerinde dünya genelinde yapılan çalışmalarda amfoterisin B için MİK 50 ve MİK 90 değeri 0,5-1 µg/ml olarak bildirilmiştir (Nucci ve ark., 2013; Taj-Aldeen ve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Türkiye’de yapılan bir çalışmada MİK 50 ve MİK 90’ı 0,12-0,25 µg/ml bildirmişlerdir (Kuzucuve ark., 2007). Çalışmamızda tüm izolatlar için MİK 50 ve MİK 90 değerini 0,5-0,5 µg/ml olarak tespit ettik. Amfoterisin B için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini incelediğimizde literatürle uyumlu görülmektedir. Ancak yüksek veya düşük MİK değerleri bildirilebilmektedir.

Candida türlerini ayrı ayrı incelediğimizde *C. albicans* suşlarında amfoterisin B için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Santos ve ark. 0,12-0,5 µg/ml ve Taj-Aldeen ve ark. 0,5- 1 µg/ml olarak bildirmişlerdir. (Santos ve ark., 2014; Taj-Aldeenve ark., 2014). Wisplinghoff ve ark. *C. albicans* türlerinde MİK 50 ve MİK 90 değerlerini her ikisini de 0,5 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Wisplinghoffve ark., 2014). Türkiye’de yapılan

çalışmalarda ise Kuzucu ve ark. 0,12-0,25 µg/ml, Etiz ve ark. 1-1 µg/ml olarak bildirilmiştir (Etiz, F., EkenoğluYaman, 2015; Kuzucu ve ark., 2007). Çalışmamızda MİK-50 ve MİK 90 değerleri 0,5-0,5 µg/ml tespit ettik.

C. parapsilosis suşlarında amfoterisin B için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Santos ve ark. 0,12-0,25 µg/ml; Wisplinghoff ve ark. 0,5-1 µg/ml, Taj-Aldeen ve ark. 1-1 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Wisplinghoffve ark., 2014) (Santosve ark., 2014; Taj-Aldeenve ark., 2014). Çalışmamızda *C. parapsilosis* için MİK 50 ve MİK 90'ı 0,25-0,5 µg/ml olarak tespit ettik.

Tablo XVII: Amfoterisin B için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 (µg/ml) değerleri:

Araştırmacı	Tüm suşlar		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
Kuzucu ve ark.			0,12	0,25						
Nucci ve ark.	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Wisplinghoff ve ark.	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	1
Taj-Aldeen ve ark.	0,5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1
Santos ve ark.			0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	1	0,12	0,5
Etiz ve ark.*			1	1	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5
Çalışmamız	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5		0,5	

*Antifungal duyarlılık Vitek 2 AST-YS01 kartları ile yapılmıştır.

Kaspofungin oğu *Candida* türlerine karşı yüksek etkinlik gösteren yeni bir antifungal ajandır. Non-*albicans Candida* türlerinden *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'ye karşı yüksek MİK değerlerine sahip olabilmektedir (Michael A Pfaller ve Diekema, 2010).

Kandidemi etkenlerinde tüm izolatlara karşı kaspofungin MİK 50 ve MİK 90 değerleri, farklı çalışmalarda Wisplinghoff ve ark. 0,125-0,5 µg/ml; Taj-Aldeen ve ark. 0,5-1 µg/ml; Lockhart ve ark. 0,06-0,25 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012; Taj-Aldeenve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Çalışmamızda kaspofungin için MİK 50 ve MİK 90'değerleri 0,03-0,5 µg/ml'dir.

C. albicans suşlarında kaspofunginin MİK 50 MİK 90 değerleri Taj-Aldeen ve ark. 0,5-0,5 µg/ml; Wisplinghoff ve ark.0,06-0,12 µg/ml; Lockhart ve ark. bizim

çalışmamızın değerine en yakın olan 0,03-0,06 µg/ml bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012; Taj-Aldeen ve ark., 2014; Wisplinghoff ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise ≤0,015-0,03 µg/ml olarak tespit ettik.

C. parapsilosis suşlarında kaspofungin için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Lockhart ve ark. 0,25-0,5 µg/ml; Wisplinghoff ve ark. 0,5-1 µg/ml; Taj-Aldeen ve ark. 1-2 µg/ml; Santos ve ark. 0,5-2 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012; Santos ve ark., 2014; Taj-Aldeen ve ark., 2014; Wisplinghoff ve ark., 2014). Çalışmamızda *C. parapsilosis* için MİK 50 ve MİK 90 değerleri 0,5- 0,5 µg/ml'dir. Çalışmamızın sonuçları diğer bazı çalışmaların sonuçları ile benzer olmakla birlikte bizim sonuçlarımız daha düşük olarak görülmüştür.

MİK sonuçları CLSI kriterlerine göre yorumlandığında kaspofungin direnç oranları değişkenlik göstermektedir. Wisplinghoff ve ark. direnç oranlarını sırası ile *C. albicans* %0,4, *C. glabrata* %61,9, *C. parapsilosis* %2,6 ve *C. tropicalis* için %4,1 olarak bildirmişlerdir (Wisplinghoff ve ark., 2014). Lockhart ve ark. *C. albicans* %0,5, *C. glabrata* %2,4, *C. tropicalis* suşlarının %0,8'i dirençli, *C. parapsilosis* suşlarının tamamını duyarlı bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012). Santos ve ark. sadece *C. glabrata* türleri arasında % 20 oranında direnç tespit etmişlerdir (Santos ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da sadece *C. glabrata* (%14,2) suşları arasında direnç tespit edilmiştir.

Tablo XVIII: Kaspofungin için diğer çalışmalarda MİK 50 ve MİK 90 (µg/ml) değerleri:

Araştırmacı	Tüm suşlar		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
Lockhart ve ark.	0,06	0,25	0,03	0,06	0,25	0,5	0,06	0,12	0,03	0,12
Wisplinghoff ve ark.	0,12	0,5	0,06	0,12	0,5	1	0,25	0,25	0,12	0,25
Taj-Aldeen ve ark.	0,5	1	0,5	0,5	1	2	0,5	1	0,5	1
Santos ve ark.			0,12	0,25	0,5	2	0,12	0,25	0,06	0,25
Etiz ve ark.*			≤0,25	2	≤0,25	1	≤0,25	1	≤0,25	1
Çalışmamız	0,03	0,5	≤0,015	0,03	0,5	0,5	0,06		0,03	

* Antifungal duyarlılık Vitek 2 AST-YS01 kartları ile yapılmıştır.

Candida türlerinde flukonazol direncinde farklılıklar söz konusudur. Profilaksi ve tedavide yoğun olarak kullanılması sonucunda *C. albicans* türlerinde dahi direnç gelişebilmektedir. Tüm suşlarda flukonazol için MİK 50 ve MİK 90 değerini Taj-

Aldeen ve arkadaşları 0,5-4 µg/ml; Wisplinghoff ve ark. 0,5-16 µg/ml; Lockhart ve ark. 1-16 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Lockhartve ark., 2012; Taj-Aldeenve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Çalışmamızın MİK 50 ve MİK 90 sonuçları 0,25-4 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

C. albicans suşlarında flukonazol için MİK 50 MİK 90 değerleri Taj-Aldeen ve arkadaşları; 0,25-0,25 µg/ml; Wisplinghoff ve ark 0,25-0,5 µg/ml olarak bildirmişlerdir(Taj-Aldeenve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Türkiyeden yapılan çalışmalarda ise Karakoç ve ark. 0,5-16 µg/ml, Kuzucu ve ark. 1-4 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Karakoç, Yazgı, AktaşUyanık; Kuzucuve ark., 2007) . Çalışmamızda *C. albicans* suşlarında MİK 50 ve MİK 90 değerleri 0,12-0,25 µg/ml olarak tespit ettik. Sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde çoğu çalışmadan daha düşük olduğu görülmektedir.

C. parapsilosis suşlarında flukonazol için MİK 50 ve MİK 90 değeri farklı ülkelerde yapılmış olan iki çalışmada 1-2 µg/ml olarak bildirilmiştir (Taj-Aldeenve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Türkiye’de yapılmış olan çalışmalarda Karakoç ve ark. 0,5-1 µg/ml; Etiz ve ark. 2-8 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Etizve ark., 2015; Karakoçve ark., 2007). Çalışmamızın *C. parapsilosis* suşlarının MİK 50 ve MİK 90 sonuçları 0,5-16 µg/ml tespit etmiş olup diğer çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur.

Flukonazol için direnç oranları incelendiğinde Lockhart ve ark. *C. albicans* %2,3, *C. parapsilosis* %4,1, *C. tropicalis* %6,2 *C. glabrata* suşlarının %11,9’u dirençli ve *C. glabrata* suşlarının geri kalanı doza bağlı duyarlı bildirmişlerdir (Lockhartve ark., 2012). Taj-Aldeen ve ark. sadece *C. glabrata* suşlarını doza bağlı duyarlı, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. albicans* suşlarının tamamını duyarlı olarak bildirmişlerdir (Taj-Aldeenve ark., 2014).Çalışmamızda *C. albicans*, *C. tropicalis* suşlarının tamamı duyarlı; *C. parapsilosis* suşlarının %15’i dirençli; *C. glabrata* suşlarının tamamı doza bağlı duyarlı bulunmuştur. *C. parapsilosis* suşlarımızın direnç oranı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri literatürden daha yüksek tespit edilmiştir. Dirençli olan üç *C. parapsilosis* suşu 15 gün içerisinde aynı servisten izole edilmiş olması olası bir salgını akla getirmektedir.

Tablo XIX: Flukonazol için diğer çlışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 (µg/ml) değerleri:

Araştırmacı	Tüm suşlar		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
Kuzuc ve ark.			1	4						
Karakoç ve ark.			0,5	16	0,5	1	0,5	16	0,5	16
Lockhart ve ark.	1	16	0,5	1	1	2	8	64	0,5	2
Nucci ve ark.			0,12	0,5	0,25	1	4	16	0,25	0,5
Wisplinghoff ve ark.	0,5	16	0,25	0,5	1	2	8	64	0,5	1
Taj-Aldeen ve ark.	0,5	4	0,25	0,25	1	2	4	8	0,5	1
Santos ve ark.			0,25	4	1	4	8	32	2	8
Etiz ve ark.*			≤1	≤1	2	8	2	4	≤1	≤1
Çalışmamız	0,25	4	≤0,12	0,25	0,5	16	4		0,5	

* Antifungal duyarlılık Vitek 2 AST-YS01 kartları ile yapılmıştır.

Vorikonazol, yeni bir azol grubu antifungal olup bu grup içerisinde *Candida*'lara karşı en iyi aktivite gösteren antifungaldir (Michael A Pfaller ve Diekema, 2010). Vorikonazol için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Taj-Aldeen ve ark. ≤0,016-0,12 µg/ml; Lockhart ve ark. 0,06-0,25 µg/ml; Wisplinghoff ve ark. 0,03-0,5 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012; Taj-Aldeen ve ark., 2014; Wisplinghoff ve ark., 2014). Çalışmamızda vorikonazol için MİK 50 ve MİK 90 değerleri ≤0,03-0,12 µg/ml ile diğer çalışmalarda olduğu gibi en etkili antifungal olmuştur.

C. albicans suşlarında vorikonazolün için MİK 50 MİK 90 değerleri Wisplinghoff ve ark. 0,03-0,03 µg/ml, Taj-Aldeen ve ark. ≤0,016-≤0,016 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda *C. parapsilosis* suşlarında MİK 50 ve MİK 90 değerleri ≤0,03-≤0,03 µg/ml'dir.

Vorikonazolün *C. parapsilosis* suşları için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Wisplinghoff ve ark. 0,06-0,12 µg/ml, Taj-Aldeen ve ark. ≤0,016-0,12 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Taj-Aldeen ve ark., 2014; Wisplinghoff ve ark., 2014). Çalışmamızda vorikonazolün *C. parapsilosis* suşları için MİK 50 ve MİK 90 değerleri 0,03-0,12 µg/ml'dir.

Diğer türlerde vorikonazolün MİK 50 MİK 90 değerlerini Wisplinghoff ve ark. *C. glabrata* için 0,5-4 µg/ml, *C. tropicalis* için 0,06-0,12 µg/ml; Taj-Aldeen ve ark. *C. glabrata* için 0,12-0,25 µg/ml, *C. tropicalis* için 0,03 -0,12 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (Taj-Aldeenve ark., 2014; Wisplinghoffve ark., 2014). Çalışmamızda *C. glabrata*'da için MİK 50 değerimiz 0,25 µg/ml ve *C. tropicalis* türlerinde 0,03 µg/ml'dir.

Wisplinghoff ve ark. duyarlılık oranlarını *C. albicans* %99,4, *C. parapsilosis* %92,5, *C. tropicalis* 90,2 olarak tespit etmişlerdir (Wisplinghoffve ark., 2014). Taj-Aldeen ve ark. *C. tropicalis* te direnç oranı %5,2 olup diğer türler duyarlı bildirilmiştir (Taj-Aldeenve ark., 2014). Çalışmamızda . *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. albicans* türlerinin tamamı duyarlı olarak saptanmıştır. Genel olarak vorikonazol için MİK 50 MİK 90 değerlerimiz literatür ile uyumlu olup direnç oranlarımız daha düşük bulunmuştur.

Tablo XX: Vorikonazol için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 (µg/ml) değerleri:

Araştırmacı	Tüm suşlar		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
Lockhart ve ark.	0,06	0,25	0,03	0,12	0,03	0,06	0,25	2	0,06	0,12
Nuccive ark.			0,03	0,03	0,03	0,25	0,12	0,5	0,03	0,03
Wisplinghoff ve ark.	0,03	0,5	0,03	0,03	0,06	0,12	0,5	4	0,06	12
Taj-Aldeen ve ark.	≤0,016	0,12	≤0,016	≤0,016	≤0,016	0,12	0,12	0,25	0,03	0,12
Santos ve ark.			0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	2	0,25	0,5
Etiz ve ark.*			≤0,12	≤0,12	≤0,12	0,25	2	4	≤0,12	≤0,12
Çalışmamız	≤0,03	0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,12	0,06		≤0,03	

* Antifungal duyarlılık Vitek 2 AST-YS01 kartları ile yapılmıştır.

İtrakonazol için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Taj-Aldeen ve ark ≤0,03-1 µg/ml, Lockhart ve ark. 0,25-1 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Lockhartve ark., 2012; Taj-Aldeenve ark., 2014). Çalışmamızda itrakonazol için MİK 50 ve MİK 90 değerleri ≤0,03-0,25 µg/ml olarak tespit ettik.

C. albicans suşlarında itrakonazolün MİK 50 ve MİK 90 değerleri Lockhart ve ark.0,12-0,5 µg/ml, Santos ve ark. 0,25-0,5 µg/ml, Taj-Aldeen ve ark. ≤0,016-≤0,016 µg/ml, Castanheira ve ark. 0,03-0,06 µg/ml olarak bildirmişlerdir (Castanheira ve ark., 2014; Lockhartve ark., 2012; Santosve ark., 2014; Taj-Aldeenve ark., 2014).

Çalışmamızda *C. albicans* suşlarında itrakonazolün MİK 50 ve MİK 90 değerleri $\leq 0,03-0,03$ $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit ettik.

C. parapsilosis suşlarında itrakonazolün MİK 50 ve MİK 90 değerleri Lockhart ve ark. 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$, Taj-Aldeen ve ark. 0,06-0,25 $\mu\text{g/ml}$, Castanheira ve ark. 0,12-0,25 $\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmişlerdir (Castanheira ve ark., 2014; Lockhart ve ark., 2012; Taj-Aldeen ve ark., 2014). Çalışmamızda 0,06-0,25 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit ettik.

Diğer türlerde itrakonazolün MİK 50 ve MİK 90 değerlerini Lockhart ve ark. *C. glabrata* için 1-4 $\mu\text{g/ml}$, *C. tropicalis* için 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$; Taj-Aldeen ve ark. *C. glabrata* için 1-1 $\mu\text{g/ml}$, *C. tropicalis* için 0,06-0,12 $\mu\text{g/ml}$ olarak bildirmişlerdir (Lockhart ve ark., 2012; Taj-Aldeen ve ark., 2014). *C. glabrata* için MİK 50 değerimiz 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ve *C. tropicalis* için MİK 50 değerimiz 0,06 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit ettik. CLSI M27 S4 klavuzunda direnç sınır değerleri bildirilmediğinden duyarlılık oranları verilmemiştir.

Tablo XXI: İtrakonazol için diğer çalışmalardaki MİK 50 ve MİK 90 ($\mu\text{g/ml}$) değerleri:

Araştırmacı	Tüm suşlar		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90	MİK50	MİK90
Lockhart ve ark.	0,25	1	0,12	0,5	0,25	0,5	1	4	0,5	1
Taj-Aldeen ve ark.	$\leq 0,03$	1	$\leq 0,016$	$\leq 0,016$	0,06	0,25	1	1	0,06	0,12
Santos ve ark.			0,25	0,5	0,12	0,5	0,5	1	0,12	0,5
Castanheira ve ark.			0,03	0,06	0,12	0,25	1	2	0,06	0,12
Çalışmamız	$\leq 0,03$	0,25	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,06	0,25	0,25		0,12	

Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungallere karşı MİK 50, MİK 90 değerleri ve direnç oranlarında farklılıklar olup bizim çalışmamızda genel olarak literatüre göre daha düşük bulunmuştur. Bunda hastanelerdeki antifungal kullanım protokollerinin farklı olması, aynı hastadan aynı etkenin izolasyon sıklığı ve çalışmadaki örnek sayısı etkili olabileceği kanaatindeyiz.

Referans mikrodilüsyon yöntemi ile görsel olarak antifungallerin MİK sonuçlarının belirlenmesi zordur. Mikrodilüsyon yöntemi ile antifungal ajanların MİK sonuçları 24-48 saat sonra okunabilmektedir. Ayrıca antifungallerin MİK sonuçlarının yorumlanmasında zorluklar bulunduğu gibi azol antifungallere karşı gözlenen traillin etkisi MİK değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu sebeplerden dolayı rutin

laboratuarlarda uygulaması kolay, ucuz ve hızlı olabilecek yeni alternatif yöntemlerin arayışı devam etmektedir. Sensititre YeastOne bu yöntemlerden biridir.

Bu iki yöntemin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda EU ve KU oranları çalışılan *Candida* türüne ve antifungale göre değişmektedir. Çalışmalarda EU oranları %71,4-100 olarak değişim göstermektedir. Alexander ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, amfoterisin B, kaspofungin, itrakonazol için EA uyum oranlarını %92'den daha yüksek, flukonazol ve vorikonazol için bu oranları sırası ile %82 ve %85 olarak bulmuşlardır (Alexander ve ark., 2007). Bertout ve ark. EU oranlarını flukonazol %70,6, amfoterisin B %92,2, vorikonazol %80,4, itrakonazol %83,3, kaspofungin %88,2 olarak bulmuşlardır (Bertout, Dunyach, Drakulovski, ReynesMallié, 2011) Cuenca-Estrella ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada EU oranları; amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için sırası ile %97,9, %97,2, %95,5 olarak tespit edilmiştir (Manuel Cuenca-Estrella ve ark., 2010). Pfaller ve ark. kaspofungin için EU oranını %100 bulmuşlardır (MA Pfaller ve ark., 2008).

Çalışmamızda AMB, kaspofungin, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol için EU oranları sırasıyla %94,4, %100, %93, %94,4, %98,6 olarak tespit ettik. Çalışmamızda tüm antifungaller için yüksek uyum oranları tespit edilmiş olup en yüksek EU oranı kaspofungine aittir.

Çalışmamızda amfoterisin B ve kaspofungin için EU oranları diğer çalışmalarda olduğu gibi yüksek olarak saptanmıştır. Flukonazol için EU oranlarımız Cuenca-Estrella ark. ile uyumlu bulunmuş olup diğer çalışmalardan daha yüksek saptanmıştır. Ancak Bertout ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada bu oran biraz düşük bulunmuştur. İtrakonal EU oranı diğer çalışmalar ile değişkenlik göstermekle birlikte EU oranları %83 ün üzerindedir. Vorikonazol EU oranlarına baktığımızda çoğu çalışmada EU oranları %80'den fazla olmakla birlikte bazı çalışmalarda da bizim bulduğumuz gibi %90' dan fazla bulunmuştur (Alexander ve ark., 2007; Bertout ve ark., 2011; Manuel Cuenca-Estrella ve ark., 2010).

Bertout ve ark. flukonazole karşı KU oranını %87,3, Cuenca-Estrella ve ark. %83,2 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda flukonazole karşı saptadığımız %97 KU oranı çoğu çalışmaya göre daha yüksektir (Manuel Cuenca-Estrella ve ark., 2010)

(Bertout ve ark., 2011).

Kaspo fungin için KU oranlarını Pfaller ve ark. %93,6 Bertout ve ark %97,1 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kaspo fungin için KU oranını %100 olarak tespit edilmiştir. Diğer çalışmalardaki uyum oranları ile olan farklılık göz ardı edilebilir düzeydedir. (Bertout ve ark., 2011; MA Pfaller ve ark., 2012).

Vorikonazol için KU oranları Bertout ve ark. %86,3, Alexendar ve ark. %97, Cuenca-Estrella ve ark. %95,9 olarak bildirmişlerdir (Manuel Cuenca-Estrella ve ark., 2010); (Bertout ve ark., 2011); (Alexender ve ark., 2007). Çalışmamızda vorikonazol için KU oranımız %100 olarak tespit ettik.

AMB ve itrakonazol için CLSI direnç sınır değeri belirlemediğinden dolayı kategorik uyuma bakılmamıştır.

Sensititre YeastOne mikroplak yönteminin çalışılması ve MİK değerlendirilmesinin kolay olması EU ve KU oranlarının yüksek olması nedeni ile laboratuvarlar arasında rutin olarak kullanılacak bir yöntemdir. İnvaziv Candida enfeksiyonlarında en az iki antifungalın çalışılması önerilmektedir (Espinell Ingroff ve Pfaller, 2007). Sensititre YeastOne'ın dokuz antifungale karşı MİK sonucunu vermesi tedaviyi planlama açısından önemli olabileceği kanaatindeyiz.

6 SONUÇLAR

Özellikle immün sistemi baskılanmış ve uzun süre hastanede yatan hastalarda sık görülen fırsatçı *Candida* enfeksiyonlarının etkin tedavisinde etkenin erken tanımlanması ve uygun antifungal seçimi önem arz etmektedir. Çalışmamızda *Candida*'ların tanımlanmasında kullanılan uzun süren konvansiyonel yöntemlerle, kısa sürede sonuç veren MALDI-TOF MS sisteminin uyumu ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde referans yöntem olan CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile daha pratik, hızlı bir yöntem olan Sensititre YeastOne yöntemikarşılaştırılmıştır.

Kan kültüründen izole edilen 71 *Candida* suşunun tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerle MALD TOF MS arasındaki uyum %100 bulunmuştur.

Konvansiyonel yöntemlerle 3-4 gün süren tanımlama işlemi MALDI-TOF MS ile dakikalarla ifade edilebilen bir süre içinde sonuç verebilmektedir.

Sonuçlarımız maya tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in değerlendirilmesi kolay, çok hızlı ve güvenilir sonuç vermesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak MALDI-TOF MS cihazının kendisinin pahalı olmasından dolayı günlük mikroorganizma tanımlama sayısının düşük olan laboratuvarlar için uygun olmadığı kanaatindeyiz.

Antifungal duyarlılık belirlenmesinde Sensititre YeastOne mikropalak yöntemi *Candida*'larda yüksek oranda standart yöntemle uyumlu bulunmuştur. Bu iki yöntem arasındaki esansiyel uyum tüm *Candida* türleri arasında amfoterisin B'de %94,4, flukonazol %92,9, kaspofungin %100, itrakonazol %94,4 vorikonazol'de %98,6 olarak saptanmıştır. Ayrıca bu iki yöntem arasındaki kategorik uyumu tespit edilebilen türler arasında kaspofungin için %100, flukonazol için %97,1 vorikonazol için %100 olarak tespit edilmiştir.

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında en az iki antifungalajan için duyarlılık testi çalışılması önerilmektedir. Sensititre YeastOne yöntemi ile aynı anda dokuz antifungal ajanın MİK sonuçlarının belirlenebilmesi tedavi planlanmasında klinisyene farklı alternatifler sunmaktadır.

Sensititre YeastOne mikroplak yönteminin çalışılması ve MİK değerlendirilmesinin kolay olması EU ve KU oranlarının yüksek olması nedeni ile laboratuvarlar arasında rutin olarak kullanılabilir bir yöntem olduğu kanaatindeyiz.



7 KAYNAKLAR

- Aderiye, B. I., Oluwole, O. A. (2015). Antifungal agents that target fungal cell wall components: a review. *Agri Biol Sci*, 1, 206-216.
- Akalm, H. (2008). Nozokomiyal Fungal Enfeksiyonlar. In *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Topçu A. W., Söyletir G., Doğanay M. (Eds.), Nobel Tıp Kitabevleri, pp. 616-624.
- Akyar, I. (2011). Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4), 177-183.
- Alexander, B. D., Byrne, T. C., Smith, K. L., Hanson, K. E., Anstrom, K. J., Perfect, J. R., Reller, L. B. (2007). Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 698-706.
- Arıkan, S. (2007). Antifungal Duyarlılık Testleri: Neredeyiz. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21(ek), 69-70.
- Arıkan, S., Rex, J. H. (2007). Antifungal Agents. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.), 9 ed. ASM Pres, Washington. pp. 1949-1960.
- Atalay, M. A., Sav, H., Demir, G., Koç, A. N. (2012). Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole İn Vitro Duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg*, 28(3), 149-151.
- Bassetti, M., Merelli, M., Righi, E., Diaz-Martin, A., Rosello, E. M., Luzzati, R., Parra, A., Treccarichi, E. M., Sanguinetti, M., Posteraro, B. (2013). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *Journal of clinical microbiology*, 51(12), 4167-4172.
- Bertout, S., Dunyach, C., Drakulovski, P., Reynes, J., Mallié, M. (2011). Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathologie Biologie*, 59(1), 48-51.
- Bilgin, K. (2005). *Çeşitli Candida Türlerinin Amfoterisin B, Flukonazol Ve Vorikonazole Duyarlılıklarının Resazurin Mikroplak Yöntemiyle İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- Birinci, A., Cayci, Y. T., Bilgin, K., Gunaydin, M., Acuner, C., Esen, S. (2011). Comparison of Nosocomial Candidemia of Pediatric and Adult Cases in 2-Years Period at a Turkish University Hospital. *The Eurasian journal of medicine*, 43(2), 87-91.
- Calderone, R. A., Braun, P. C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, 55(1), 1-20.
- Calderone, R. A., Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(7), 327-335.

- Castanheira, M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., Dietrich, R. R., Jones, R. N., Pfaller, M. A. (2014). Isavuconazole and nine comparator antifungal susceptibility profiles for common and uncommon *Candida* species collected in 2012: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Mycopathologia*, 178(1-2), 1-9.
- CLSI. (2008). *Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard-Third Edition*. Wayne, Pennsylvania.: CLSI.
- CLSI. (2012). *Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : Fourth Informational Supplement*. Wayne, Pennsylvania.: CLSI.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 380-407.
- Cuenca-Estrella, M., Bernal-Martinez, L., Buitrago, M. J., Castelli, M. V., Gomez-Lopez, A., Zaragoza, O., Rodriguez-Tudela, J. L. (2008). Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, S143-S147.
- Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martinez, L., Cuesta, I., Buitrago, M. J., Rodriguez-Tudela, J. L. (2010). Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), 1782-1786.
- Cuenca-Estrella, M., Verweij, P. E., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., Bille, J., Donnelly, J. P., Jensen, H. E., Lass-Flörl, C., Richardson, M. D., Akova, M., Bassetti, M., Calandra, T., Castagnola, E., Cornely, O. A., Garbino, J., Groll, A. H., Herbrecht, R., Hope, W. W., Kullberg, B. J., Lortholary, O., Meersseman, W., Petrikos, G., Roilides, E., Viscoli, C., Ullmann, A. J., Group, E. F. I. S. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 9-18. doi:10.1111/1469-0691.12038
- Çerikçioğlu, N. (1999). Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günel M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1081-1086.
- Çerikçioğlu, N. (2008). *Candida* Türleri. In *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Topçu A. W., Söyletir G., Doğanay M. (Eds.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. pp. 2411-2426.
- Çerikçioğlu, N., Sancak, B. (2008). Mantarların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri. In *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Topçu A. W., Söyletir G., Doğanay M. (Eds.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. pp. 2391-2397.
- Çerikçioğlu, N. (2012). Mantarlarda Virülans Faktörleri. *ANKEM Derg*, 26(Ek 2), 261-269.
- Çiçek, A. Ç., Koç, A. N., Ertürk, A., Demir, G., Bahçeci, İ. (2014). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Kromojenik Besiyerinin Değerlendirilmesi. *Abant Medical Journal*, 3(3), 248-252.

- Dalgıç, N., Erdal, İ. (2005). Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar. *Klinik Pediatri*, 4(3), 90-98.
- Deak, E., Charlton, C. L., Bobenchik, A. M., Miller, S. A., Pollett, S., McHardy, I. H., Wu, M. T., Garner, O. B. (2015). Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 81(1), 27-33. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.018
- Dhiman, N., Hall, L., Wohlfel, S. L., Buckwalter, S. P., Wengenack, N. L. (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *Journal of clinical microbiology*, 49(4), 1614-1616.
- Diekema, D. J., Messer, S., Boyken, L., Hollis, R., Kroeger, J., Tendolkar, S., Pfaller, M. (2009). In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *Journal of clinical microbiology*, 47(10), 3170-3177.
- Dignani, M. C., Solomkin, J. S., Anaissie, E. J. (2009). *Candida*. In *Clinical Mycology*. Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaller M. A. (Eds.), Elsevier Health Sciences, pp. 197-229.
- Durán-Valle, M. T., Sanz-Rodríguez, N., Muñoz-Paráiso, C., Almagro-Moltó, M., Gómez-Garcés, J. L. (2014). Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Medical mycology*, myt036.
- Eddouzi, J., Lohberger, A., Vogne, C., Manai, M., Sanglard, D. (2013). Identification and antifungal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals. *Medical mycology*, 51(7), 737-746.
- Edwards, J. E. (2015). *Candida* Species. In *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Bennett J. E., Dolin R., Blaser M. J., Mandell G. L., Douglas R. G. (Eds.), pp. 2879-2894.
- Emel, T. (1999). *Candida* Türleri. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günal M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1081-1086.
- Ener, B. (1999). Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak Mantarlar. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günal M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1123-1128.
- Ener, B. (2008). *Candida* İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji ve Laboratuvar Tanı. *ANKEM Derg*, 22 Ek(2), 263-274.
- EspinellIngroff, A. V., Pfaller, M. A. (2007). Susceptibility Test Methods: Yeast and Filamentous Fungi. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.), 9 ed. ASM Press, Washington. pp. 1972-1986.
- Etiz, P., F., K., Ekenoğlu, Y., Yaman, A. (2015). Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımının Ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*, 29(3), 105-113.
- EUCAST. (2015). *Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs Version 8.0*

Antifungal Agents European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-

Antifungal susceptibility testing.

- Fatania, N., Fraser, M., Savage, M., Hart, J., Abdolrasouli, A. (2015). Comparative evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry and conventional phenotypic-based methods for identification of clinically important yeasts in a UK-based medical microbiology laboratory. *Journal of clinical pathology*, jclinpath-2015-203029.
- FDA. (2009). Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. In US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Washington, DC. pp. 1-42.
- Freydiere, A. M., Guinet, R., Boiron, P. (2001). Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*, 39(1), 9-33.
- Fridkin, S. K. (2005). The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis*, 41(10), 1455-1460. doi:10.1086/497138
- Fridkin, S. K., Jarvis, W. R. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 9(4), 499-511.
- Garey, K. W., Rege, M., Pai, M. P., Mingo, D. E., Suda, K. J., Turpin, R. S., Bearden, D. T. (2006). Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clinical Infectious Diseases*, 43(1), 25-31.
- Gegic, M., Numanovic, F., Delibegovic, Z., Tihic, N., Nurkic, M., Hukic, M. (2013). The importance of serological tests implementation in disseminated candidiasis diagnose. *Coll Antropol*, 37(1), 157-163.
- Giri, S., Kindo, A. (2012). A review of Candida species causing blood stream infection. *Indian journal of medical microbiology*, 30(3), 270.
- Gubbins, P. O. (2011). Fungal Infections. In *Textbook of Critical Care*. Vincent J. L., Abraham E., Kochanek P., Moore F. A., Fink M. P. (Eds.), Elsevier Health Sciences.
- Gubbins, P. O., Anaissie, E. J. (2009). Antifungal therapy. In *Clinical Mycology*. Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaller M. A. (Eds.), Churchill Livingstone.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(s6), 5-10.
- Gültekin, B., Eyigör, M., Telli, M., Aksoy, M., Aydın, N. (2010). Yedi Yıllık Dönemde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Retrospektif Olarak İncelenmesi. *ANKEM Derg*, 24(4), 202-208.
- Hazen, K. C., Howell, S. A. (2007). Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.), 9 ed. ASM Press, Washington. pp. 1762-1788.
- Hilmioğlu-Polat, S. (2007). Sık Görülen Sistemik Mikozlarda Serolojik Tanı. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21(Ek1), 63-67.
- Hospenthal, D. R., Murray, C. K., Rinaldi, M. G. (2004). The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(3), 153-160.
- İnci, R. (1999). Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflandırılması. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günal M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1015-1021.

- Iriart, X., Lavergne, R.-A., Fillaux, J., Valentin, A., Magnaval, J.-F., Berry, A., Cassaing, S. (2012). Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight system with a new time-effective strategy. *Journal of clinical microbiology*, 50(6), 2107-2110.
- Iwen, P. C. (2011). Mycotic Diseases. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. McPherson R. A. Pincus M. R. (Eds.), Elsevier Health Sciences.
- Kantarcıoğlu, A. S., Yücel, A. (2004). Candida Albicans'da Mannan: Çeşitli Özellikleri ve Önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(1), 42-46.
- Karakoç, E., Yazgı, H., Aktaş, A. E., Uyanık, M. H. (2007). Çeşitli Candida Türlerinin İki Farklı Triazole Duyarlılıklarının Mikrodilüsyon Yöntemi İle Araştırılması. *The Eurasian journal of medicine*, 39, 173-177.
- Kauffman, C. A., Marr, K. A., Thorner, A. R. (2015). Clinical manifestations and diagnosis of candidemia and invasive candidiasis in adults.
- Kebud, R. (2007). Yeni Antifungaller. *ANKEM Derg*, 21(Ek2), 210-215.
- Koç, A. N. (2007). Mikozların Laboratuvar Tanısı, Etken Mantarın Tür Tanısı ve Anrifungal Direnç Analizinde Moleküler Yöntemlerin Yeri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21(Ek1), 165-172.
- Koç, A. N. (2012). Antifungal Duyarlılık Testleri ve Klinik Önemi. *ANKEM Derg*, 26(Ek2), 270-276.
- Kutlu, S. (2009). Azol Grubu Antifungaller. *Kandidiyaz BAMÇAG Mantar Simpozyumu-1.Simpozyum Kitabı*, 38-39.
- Kuzucu, Ç., Yetkin, G., Çalışkan, A. (2007). Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen Candida türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Erciyes Tıp Dergisi*, 29(2), 115-119.
- Küçükoğlu, K. (2008). Antifungal Tedavide Son Gelişmeler. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37(1), 63-90.
- Larone, D. H. (2002). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*: ASM Press.
- Lockhart, S. R., Iqbal, N., Cleveland, A. A., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bolden, C. B., Baughman, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B. J. (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of Candida bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two US cities from 2008 to 2011. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3435-3442.
- Lohmann, C., Sabou, M., Moussaoui, W., Prévost, G., Delarbre, J.-M., Candolfi, E., Gravet, A., Letscher-Bru, V. (2013). Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, JCM. 03268-03212.
- Majid, Z., Ali, Z. M. (2009). Invasive candidiasis; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2009(1, Winter), 1-6.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348(16), 1546-1554.
- Maschmeyer, G. (2006). The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Int J Antimicrob Agents*, 27 Suppl 1, 3-6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.03.006
- MCS-Diagnostics. (2012). SENSITITRE YEASTONE For in vitro Diagnostic Use. http://www.mcsdiagnostics.com/site/upload/file/pdf/yo_8_yo10_v1.4_e.pdf.

- Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D., Sofair, A. N., Huie-White, S., Wilcox, S., Harrison, L. H., Seaberg, E. C., Hajjeh, R. A., Teutsch, S. M. (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 26(06), 540-547.
- Munoz, P., Burillo, A., Bouza, E. (2001). Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 38.
- Munoz, P., Guinea, J., Rojas, L., Bouza, E. (2010). New antifungal agents for the treatment of candidaemia. *Int J Antimicrob Agents*, 36 Suppl 2, S63-69. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.11.007
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2009). Antifungal Agents. In *Medical Microbiology*. Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (Eds.), Elsevier, Philadelphia. pp. 679-688.
- Nachimuthu, N., Ostrosky-Zeichner, L. (2015). Antifungal Susceptibility Testing: Evolution, Indications, and Role in Clinical Practice. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 7(3), 155-162.
- Neppelenbroek, K., Seo, R., Urban, V., Silva, S., Dovigo, L., Jorge, J., Campanha, N. (2014). Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases*, 20(4), 329-344.
- Nerurkar, V., Khan, S., Kattungal, S., Bhatia, S. (2014). Identifying Candida and Other Yeast-Like Fungi: Utility of an Identification Algorithm in Resource Limited Setting. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(12), DC01.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J. (2013). Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*, 8(3), e59373.
- Orasch, C., Marchetti, O., Garbino, J., Schrenzel, J., Zimmerli, S., Mühlethaler, K., Pfyffer, G., Ruef, C., Fehr, J., Zbinden, R. (2014). Candida species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7), 698-705.
- Ostrosky-Zeichner, L. (2012). Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*, 125(1 Suppl), S14-24. doi:10.1016/j.amjmed.2011.10.008
- Ostrosky-Zeichner, L., Pappas, P. G. (2006). Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 34(3), 857-863. doi:10.1097/01.CCM.0000201897.78123.44
- Özbek, E., Tekay, F., Pirinçcioğlu, H. Ç. (2012). Yoğun bakım hastalarına ait çeşitli örneklerden izole edilen Candida izolatlarında antifungal direnç. *Dicle Tıp Dergisi*, 39(2).
- Öztürk, A. (2011). Kandida İnfeksiyonlarında Serolojik Tanı. *Mantar Simpozyumu II-Kandida-Bilimsel Programı*, 15.
- Pappas, P. G., Mycoses Study, G. (2011). Candidemia in the intensive care unit: miles to go before we sleep. *Crit Care Med*, 39(4), 884-885. doi:10.1097/CCM.0b013e31820f710b

- Pfaller, M., Chaturvedi, V., Diekema, D., Ghannoum, M., Holliday, N., Killian, S., Knapp, C., Messer, S., Miskou, A., Ramani, R. (2012). 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(4), 365-368.
- Pfaller, M., Chaturvedi, V., Diekema, D., Ghannoum, M., Holliday, N., Killian, S., Knapp, C., Messer, S., Miskov, A., Ramani, R. (2008). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *Journal of clinical microbiology*, 46(7), 2155-2159.
- Pfaller, M., Diekema, D. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2846-2856.
- Pfaller, M., Diekema, D., Rinaldi, M. G., Barnes, R., Hu, B., Veselov, A., Tiraboschi, N., Nagy, E., Gibbs, D., Group, G. A. S. (2005). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), 5848-5859.
- Pfaller, M., Kauffman, C. A., Thomer, A. R. (2014). Antifungal susceptibility testing. www.uptodate.com.
- Pfaller, M. A. (2008). New developments in the antifungal susceptibility testing of *Candida*. *Current Fungal Infection Reports*, 2(3), 125-133.
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, 125(1), S3-S13.
- Pfaller, M. A. (2015). Application of Culture-Independent Rapid Diagnostic Tests in the Management of Invasive Candidiasis and Cryptococcosis. *Journal of Fungi*, 1(2), 217-251.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, 36(1), 1-53.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Meis, J. F., Gould, I. M., Fu, W., Colombo, A. L., Rodriguez-Noriega, E., Global Antifungal Surveillance, S. (2007). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, 45(6), 1735-1745. doi:10.1128/JCM.00409-07
- Pincus, D. H., Orena, S., Chatellier, S. (2007). Yeast identification--past, present, and future methods. *Med Mycol*, 45(2), 97-121. doi:10.1080/13693780601059936
- Pittet, D., Li, N., Woolson, R. F., Wenzel, R. P. (1997). Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. *Clinical Infectious Diseases*, 24(6), 1068-1078.
- Rex, J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J. (2001). Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 643-658.

- Rex, J. H., Stevens, D. A. (2014). Systemic Antifungal Agents. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Bennett J. E., Dolin R., Blaser M. J. (Eds.), Elsevier Health Sciences, Philadelphia. pp. 549-563.
- Roemer, T., Krysan, D. J. (2014). Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(5). doi:10.1101/cshperspect.a019703
- Santos, E. R. d., Forno, C. F. D., Hernandez, M. G., Kubiça, T. F., Venturini, T. P., Chassot, F., Santurio, J. M., Alves, S. H. (2014). Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(6), 477-482.
- Saraçlı, M. A. (2010). Tıbbi mikrobiyoloji. In Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A., Baştustaoglu A. C., Yıldırım Ş. T., Tanyüksel M., Yapar M. (Eds.), Atlas Kitapçılık, pp. 679-688.
- Sendid, B., Ducoroy, P., François, N., Lucchi, G., Spinali, S., Vagner, O., Damiens, S., Bonnin, A., Poulain, D., Dalle, F. (2013). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Medical mycology*, 51(1), 25-32.
- Sofair, A. N., Lyon, G. M., Huie-White, S., Reiss, E., Harrison, L. H., Sanza, L. T., Skaggs, B. A. A., Fridkin, S. K. (2006). Epidemiology of community-onset candidemia in Connecticut and Maryland. *Clinical Infectious Diseases*, 43(1), 32-39.
- Sutton, D. A. (2007). Specimen Collection, Transport, and Processing: Mycology. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.), 9. Baskı ed. ASM Press, Washington. pp. 1728-1736.
- Şahin, E., Ersöz, G., Otağ, F., Kandemir, Ö., Tiftik, N., Kaya, A., Yalçın, A. (2006). Hematolojik maligniteli nötropenik ateşli hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20(2), 121-124.
- Taj-Aldeen, S., Kolecka, A., Boesten, R., Alolaqi, A., Almaslamani, M., Chandra, P., Meis, J., Boekhout, T. (2014). Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. *Infection*, 42(2), 393-404.
- Tortorano, A., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M., Cavinato, S., De Luca, C., Grancini, A., Cascio, G. L., Ossi, C. (2013). A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*, 41(3), 655-662.
- Tümbay, E. (2010). Tıbbi mikrobiyoloji. In Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A., Baştustaoglu A. C., Yıldırım Ş. T., Tanyüksel M., Yapar M. (Eds.), Atlas Kitapçılık, pp. 751-774.
- Tümbay, T. (1999). *Candida* Türleri. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günal M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1081-1086.
- Ural, O. (2004). Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi ve Korunma. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 8, 159-167.

- Vijgen, S., Nys, S., Naesens, R., Magerman, K., Boel, A., Cartuyvels, R. (2011). Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Medical mycology*, 49(1), 107-110.
- Warnock, D. W. (2007). Taxonomy and Classification of Fungi. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.), 9 ed. ASM Press, Washington. pp. 1721-1727.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 309-317.
- Wisplinghoff, H., Ebbers, J., Geurtz, L., Stefanik, D., Major, Y., Edmond, M. B., Wenzel, R. P., Seifert, H. (2014). Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(1), 78-81.
- Yamamura, D. L., Rotstein, C., Nicolle, L. E., Ioannou, S. (1999). Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. *Canadian Medical Association Journal*, 160(4), 493-499.
- Yaman, G., Akyar, I., Can, S. (2012). Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(1), 65-67.
- Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*, 36(4), 223-228.
- Yeğenoğlu, Y. (2012). Antifungal Direnci Gösteren Mantarlar. *ANKEM Derg*, 26(Ek2), 254-260.
- Yiğit, N., Benli, M. (2005). Maya hücre duvar yapısının dinamikleri. *Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(3), 11-17.
- Yıldırım, Ş. T. (1999). Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş., Günal M., İmir T., Cengiz T., Tümbay E., Mete Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. pp. 1127-1144.
- Zaoutis, T. E., Argon, J., Chu, J., Berlin, J. A., Walsh, T. J., Feudtner, C. (2005). The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 41(9), 1232-1239.