

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**CANDIDA TÜRLERİNİN TİPLENDİRİLMESİNDE VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIĞIN BELİRLENMESİNDE ÇEŞİTLİ
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

86798

UZMANLIK TEZİ

T 86798

DR. ASUMAN BİRİNCİ

**TEZ YÖNETİCİSİ
DOÇ. DR. AHMET SANIÇ**

SAMSUN-1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON KURUMU

Tez çalışmamı yöneten, bilgi ve teşvikleri ile öğrenimime katkıda bulunan Doç. Dr. Ahmet Saniç'e, öğrenimim süresince bilgi ve yakın desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Belma Durupınar'a, bilgi ve teşvikleri ile öğrenimimde emekleri geçen Doç. Dr. Murat Günaydın, Doç. Dr. Hakan Leblebicioğlu, Yrd. Doç. Dr. Murat Hökelek, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sümbül ve Yrd. Doç. Dr. Cafer Eroğlu'na, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum doktor ve biyolog arkadaşlarıma, tez çalışmalarımda bana yardımcı olan biyolog Duygu Zari, ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Asuman BİRİNCİ
SAMSUN-1999

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1-2
GENEL BİLGİLER	3-30
MANTAR SINIFLAMASINDA KANDİDALARIN	3-5
YERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ	
KANDİDALARIN KLİNİK ÖNEMİ	5-6
KANDİDA İNFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ	7-8
LABORATUVAR TANISI	9-16
İzolasyon	
İdentifikasyon	
Biyokimyasal testler	
Hızlı idantifikasyon kitleri	
Kromojenik besiyerleri	
Serolojik testler	
Moleküler yöntemler	
ANTİFUNGAL AJANLAR	17-26
Polyen Antifungal Ajanlar	
Pirimidin Sentez İnhibitörleri	
Azol Grubu Antifungal Ajanlar	
Yeni Antifungal Ajanlar	
ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	26-30
Buyyon Makrodilüsyon	
Buyyon Mikrodilüsyon	
Disk Diffüzyon	
E Testi	

GEREÇ VE YÖNTEM	31-41
İZOLASYON VE İDANTİFİKASYON	31-35
Germ Tüp Testi	
Hif ve klamidospor üretimi	
Api 20C AUX Maya İdantifikasyon Sistemi	
Kromojenik Besiyeri	
ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	35-39
Makrodilüsyon Yöntemi	
E Testi Yöntemi	
ŞEKİLLER	40-41
BULGULAR	42-53
TARTIŞMA	54-60
SONUÇLAR	61-62
KAYNAKLAR	63-73

TABLO LİSTESİ

<u>No</u>	<u>Tablo Adı</u>	<u>Sayfa</u>
I.	Tıbbi önemi olan funguslar.	4
II.	Sık rastlanan Candida türlerinden bazılarının karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri.	12
III.	Klinikte sık kullanılan antifungaller ve etki mekanizmaları.	18
IV.	Hücre duvarına etkili antifungaller	26
V.	NCCLS M27A standart makrodilüsyon testi yönteminin temel prensipleri	28
VI.	Candida türlerinin SDA, Pirinç ekstresi-Tween 80 agar ve Mast ID-CHROMagar Candida'daki görünümleri.	33
VII.	Klasik yöntemlerle saptanan Candida türlerinin dağılımı.	42
VIII.	API 20C AUX ve Mast ID-CHROMagar Candida'nın klasik yöntemlerle karşılaştırılması.	43
IX.	C. albicans ve diğer kökenlerin makrodilüsyon ve E test yöntemleriyle saptanan antifungal duyarlılıklarının MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri ($\mu\text{g/ml}$).	44
X.	Candida kökenlerinin flukonazol ve ketokonazol duyarlılığının E test ile üç farklı ortamda saptanan ortalama MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$).	51
XI.	Candida kökenlerinin in vitro antifungal duyarlılığının saptanmasında kullanılan E test yönteminin standart makrodilüsyon yöntemi ile uyumu.	53

ŞEKİL LİSTESİ

<u>No</u>	<u>Şekil Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
1.	Germ tüp oluşumu	40
2a.	C.albicans, PiriŐ ekstre-si-Tween 80 agarda pseudohif ve klamidosporlar.	40
2b.	C. albicans, Mast ID-CHROMagar Candida'da yeşil renkli koloniler.	40
3a.	C. krusei, PiriŐ ekstre-si-Tween 80 agarda pseudohif ve uzun blastosporlar.	40
3b.	C. krusei, Mast ID-CHROMagar Candida'da pembe renkli koloniler.	40
4a.	C. tropicalis, PiriŐ ekstre-si-Tween 80 agarda pseudohif ve blastosporlar.	40
4b.	C. tropicalis, Mast ID-CHROMagar Candida'da mavi renkli koloniler.	40
5a.	C. glabrata, PiriŐ ekstre-si-Tween 80 agarda k�Őuk oval blastosporlar.	41
5b.	DiŐer kökenler, Mast ID-CHROMagar Candida'da mor renkli koloniler.	41
6.	Karbonhidrat asimilasyon testi.	41
7a.	E test yönteminde ketokonazol MİK=0.5µg/ml, flukonazol MİK=256µg/ml.	41
7b.	E test yönteminde ketokonazol MİK=0.023µg/ml, flukonazol MİK=1µg/ml.	41
8.	C. albicans ve diŐer kökenlerde makrodilüsyon yöntemiyle amfoterisin B'nin MİK daŐılımı	45
9.	C. albicans ve diŐer kökenlerde E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle amfoterisin B'nin MİK daŐılımı	45

10. C. albicans ve diğer kökenlerde makrodilüsyon yöntemiyle flukonazol'un MİK dağılımı	46
11. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle flukonazol'un MİK dağılımı	46
12. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (Fosfat-RPMI 1640) yöntemiyle flukonazol'un MİK dağılımı	47
13. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (Casitone) yöntemiyle flukonazol'un MİK dağılımı	47
14. C. albicans ve diğer kökenlerde makrodilüsyon yöntemiyle ketokonazol'un MİK dağılımı	48
15. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle ketokonazol'un MİK dağılımı	48
16. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (Fosfat-RPMI 1640) yöntemiyle MİK dağılımı	49
17. C. albicans ve diğer kökenlerde E test (Casitone) yöntemiyle ketokonazol'un MİK dağılımı	49
18. Candida kökenlerinde üç farklı ortamda E test yöntemiyle flukokonazol'un MİK dağılımının karşılaştırılması	50
19. Candida kökenlerinde üç farklı ortamda E test yöntemiyle ketokonazol'un MİK dağılımının karşılaştırılması	50
20. Candida kökenlerinde makrodilüsyon ve E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle amfoterisin B'nin MİK dağılımı	51
21. Candida kökenlerinde makrodilüsyon ve E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle flukokonazol'un MİK dağılımı	52
22. Candida kökenlerinde makrodilüsyon ve E test (MOPS-RPMI 1640) yöntemiyle ketokonazol'un MİK dağılımı	52

ÖZET

CANDIDA TÜRLERİNİN TİPLENDİRİLMESİNDE VE ANTİFUNGAL DUYARLILIĞIN BELİRLENMESİNDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bu çalışmanın amacı yeni selektif kromojenik besiyerlerinden MAST ID-CHROMagar Candida ve ticari kitlerden API 20C AUX'un kandidaları idantifiye edebilme derecelerinin, klasik mikolojik tanı yöntemleri referans alınarak araştırılmasıdır. Ayrıca basit bir agar difüzyon methodu olan E test yönteminin, Candida türlerinin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol'e karşı antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından önerilen standart makrodilüsyon yöntemine alternatif olup olamayacağını araştırılmasıdır. Çalışmada vajinal örneklerden izole edilen 50 Candida kökeni kullanılmıştır.

Çalışmaya alınan 50 Candida kökeninin standart klasik yöntemler (pirinç ekstresi Tween 80 agar, karbonhidrat asimilasyon, germ tüp) ile idantifiye edilmesi sonucu, 34 (%68)'ü *C. albicans*, 9 (%18)'u *C. krusei*, 5 (%10)'i *C. tropicalis*, 2 (%4)'si *C. glabrata* olarak değerlendirildi. Germ tüp testi 34 *C. albicans* kökeninin 31 (%91,2)'inde olumlu bulundu.

API 20C AUX ile çalışmaya alınan suşların %98'i klasik mikolojik yöntemlerle uyumlu olarak değerlendirildi. *C. krusei* kökenlerinden 1'i *C. zeylanoides* olarak tanımlandı. Diğer kökenlerin hepsi doğru olarak tanımlandı.

Mast ID-CHROMagar Candida'nın 48 saat inkübasyondan sonra idantifikasyon derecesi %92 olarak değerlendirildi. 34 *C. albicans* kökeninin 33'ü doğru olarak saptanırken, 1'i *C. tropicalis* olarak saptandı (duyarlılık=%97.0, özgüllük=%93.7). 5 *C. tropicalis* kökeninin ise 4'ü doğru olarak saptanırken, 1'i *C. albicans* olarak saptandı (duyarlılık=%80.0, özgüllük=%97.8). *C. krusei* ve *C. glabrata* kökenlerinin ise hepsi doğru olarak saptandı.

50 Candida kökeninin standart makrodilüsyon yöntemi ile MİK aralığı, MİK90 değerleri sırasıyla amfoterisin B için C. albicans kökenlerinde 0.03-0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml, diğer kökenlerde 0.125-1µg/ml, 1 µg/ml; flukonazol için C. albicans kökenlerinde 0.125-2 µg/ml, 1 µg/ml, diğer kökenlerde 1-64 µg/ml, 64 µg/ml; ketokonazol için C. albicans kökenlerinde 0.03-0.125 µg/ml, 0.125 µg/ml, diğer kökenlerde 0.03-0.5µg/ml, 0.5 µg/ml, olarak belirlendi. C. albicans kökenlerinde MİK değerleri diğer kökenlerdeki MİK değerlerinden daha düşük olarak saptandı.

E test yöntemi ile Candida kökenlerinin antifungal duyarlılığının belirlenmesinde azoller için üç farklı ortam (MOPS tamponlu RPMI 1640, Fosfat tamponlu RPMI 1640, Casitone agar) kullanıldı. İstatistiksel olarak bu ortamlarda elde edilen ortalama MİK değerlerinin karşılaştırılmasında fark bulunamadı (p>0.05).

E test yönteminin standart makrodilüsyon yöntemi ile uyumu ± 1 dilüsyonlar aynı kabul edilerek, amfoterisin B için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %84; flukonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %97, Fosfat tamponlu RPMI 1640 ve Casitone agarda %90; ketokonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %78, Fosfat tamponlu RPMI1640'da %79, Casitone agarda %60 olarak saptanmıştır.

Sonuçlarımız Candida türlerinin idantifikasyonunda API 20C AUX ve Mast ID-CHROMagar Candida'nın kullanılabilceğini gösterdi. Ayrıca E test yönteminin Candida türlerinin antifungal duyarlılığının rutinde saptanmasında amfoterisin B ve flukonazol için standart makrodilüsyon yöntemine değerli bir alternatif olduğu, ketokonazol için ise olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Candida, İdentifikasyon, Antifungal duyarlılık, Makrodilüsyon, E test.

SUMMARY

THE COMPARISON OF DIFFERENT METHODS IN IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF CANDIDA SPECIES

The aim of this study to evaluate the performance with respect to identification of *Candida* species of new selective chromogenic media MAST ID-CHROMagar *Candida*, commercial kit API 20C AUX, and classical mycological methods as reference and also to evaluate E test a simple agar diffusion method as a alternative to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) reference standard macrodilution method for determining the MICs of amphotericin B, fluconazole, ketoconazole by testing 50 vaginal candida isolates.

By using classical mycological methods (Rice extrate-Tween 80 agar, carbon hydrate assimilation and germ tube) 50 *Candida* strains were identified as follows: 34 (68%) *C. albicans*, 9 (18%) *C. krusei*, 5 (10%) *C. tropicalis*, 2 (4%) *C. glabrata*. The germ tube test was positive in 31 (91,2%) of 34 *C. albicans* strains.

By using API 20C AUX, 49 of 50 studied strains were correctly identified with an overall concordance of 98% this method and standard one. One of the *C. krusei* strains was identified as *C. zeylanoides*. All other strains were showed 100% concordance with classical mycological methods.

The identification performance of Mast ID-CHROMagar *Candida*, was 92%. As 33 of 34 *C. albicans* strains were correctly identified, one of them was identified as *C. tropicalis* (sensitivity=97.0%, specificity=93.7%). 4 of 5 *C. tropicalis* strains were correctly and one was identified as *C. albicans* (sensitivity=80%, specificity=97.8%). All of *C. krusei* strains were correctly identified but none of *C. glabrata* strains could be identified.

MIC ranges and MIC 90 values for amphotericin B 0.03-0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml in *C. albicans* strains 0.125-1µg/ml, 1 µg/ml in non albicans strains; for fluconazole 0.125-2 µg/ml, 1 µg/ml in *C. albicans* strains, 1-64 µg/ml, 64 µg/ml; in non albicans strains; for ketoconazole 0.03-0.125 µg/ml, 0.125 µg/ml, in *C. albicans* strains,

0.03-0.5 μ g/ml, 0.5 μ g/ml in non albicans strains. MIC values were lower in C. albicans strains than non albicans strains.

Three different mediums (MOPS buffered RPMI 1640, Phosphate buffered RPMI 1640 and Casitone agar) were used for azoles in determining the antifungal susceptibility of Candida strains with E test. There was no statistically significant difference between MIC values obtained in these medium ($p>0.05$).

Agreement (± 1 twofold dilutions) between E test and macrodilution tests were 84% in MOPS buffered RPMI 1640 for amphotericin B, 97%, 90%, 90% in MOPS buffered RPMI 1640, Phosphate buffered RPMI 1640, Casitone agar respectively for fluconazole and 78%, 79% and 60% in MOPS buffered RPMI 1640, Phosphate buffered RPMI 1640, Casitone agar respectively for ketoconazole.

In conclusion, it is thought that MAST ID-CHROMagar Candida and API 20C AUX can be used in identification of Candida species. In the other hand we conclude that E test is valuable alternative to the standard macrodilution method for routine susceptibility testing of Candida species with amphotericin B and fluconazole but not with ketoconazole.

Key Words: Candida, Identification, Antifungal susceptibility, Macrodilution, E test.

GİRİŞ

Kandidalar doğada geniş dağılım gösteren ve insan vücudunun; barsak lümeni, deri, ağız ve vajen mukozasında normal flora üyesi olarak bulunan mikroorganizmalardır. Herhangi bir nedenle buldukları ortamda koşullar değişerek miktarları artarsa veya florasız bir bölgeye geçerlerse, fırsatçı kandida infeksiyonlarına yol açabilirler (114).

Son yıllarda fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığında artış gözlenmektedir. AIDS vakalarının artması, geniş spektrumlu ajanların kullanımının yaygınlaşması, immünsupresse hasta sayısının artmasına neden olmaktadır. AIDS'li, transplantasyonlu ve kanserli hastaların yaşam süreleri tedavi ile uzatılabilmekte, ancak bu kişiler yaşamı tehdit eden boyutlara varan fırsatçı mantar infeksiyonlarına açık hale gelmektedirler. Bu infeksiyonların insidansındaki artışa paralel olarak mayalara karşı klinik ve bilimsel ilginin arttığı görülmektedir (35,114).

Vajinal kandida infeksiyonları sık rastlanan klinik tablolardan biridir. Erişkin kadınların %75'i yaşamları boyunca en az bir kez vajinal kandida infeksiyonu geçirmektedir (89). Kandidaların normal vajen florasında da bulunmaları nedeniyle patojen, nonpatojen ayırımının yapılabilmesi iyi bir klinik laboratuvar işbirliğini gerektirmektedir. Kültürden izole edilen kandidanın klinik olarak anlam ifade edebilmesi için, hastada klinik bulguların olması veya aynı örnekten birden fazla aynı kandida türünün izole edilmesi gerekir. Bu nedenle vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen kandidaların tür düzeyinde idantifiye edilmesi gerekmektedir. Tür düzeyindeki idantifikasyon tedaviye yanıtın izlenmesinde ve klinik relapsların değerlendirilmesinde de yararlı olmaktadır (7,63,114).

Kandidaların laboratuvar tanısında klasik tanı yöntemleri güvenilir ancak, zaman alıcıdır. Serodiagnostik ve moleküler tekniklerin kullanım alanı sınırlıdır (63,114). Son yıllarda hızlı tanı için, Candida türlerinin koloni rengine göre idantifikasyonunu sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Ayrıca biyokimyasal özelliklerine göre idantifikasyonunu sağlayan ticari kitler de kullanıma girmeye başlamıştır (42,63,96,114).

Kandida infeksiyonlarının tedavisinde sınırlı sayıda antifungal ajan kullanılmaktadır. Son yıllarda tiazol grubu antifungallerin profilaksi ve tedavide sık kullanımları sonucu, daha az patojen ama dirençli olan *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* gibi Candida türleri ile kolonizasyon ve sistemik infeksiyonlarda artış bildirilmiştir (32,66,122). Bütün bunlar antifungal tedavi seçiminde in vitro duyarlılığı ölçen testlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından 1992'de mayalar için standart makrodilüsyon yönteminin önerilmesi ile birlikte bu konuda önemli bir gelişme kaydedilmiştir. Ancak standart makrodilüsyon testinin uygulanması zor ve zaman alıcı olması nedeniyle alternatif yöntem arayışları devam etmiştir. Bu araştırmaların sonucunda, daha pratik olan bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yoğun çalışmalara rağmen antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu halen sağlanamamıştır (66). Son yıllarda, bakterilerin antibakteriyel ajanlara duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan E test antifungal duyarlılık testleri için de önerilmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar gözlenmektedir (85,110).

Tüm bu klinik gözlemlerin sonucunda, çalışmamızda, vajinal örneklerden izole edilen kandidaların, standart klasik yöntemler, hızlı tanıyı sağlayan kromojenik besiyerlerinden MAST ID-CHROMagar Candida ve ticari kitlerden API 20C AUX ile idantifiye edilerek, bulunan sonuçların birbirleri ile uyumu; ayrıca in vitro antifungal duyarlılık profilleri E test ve standart makrodilüsyon yöntemi ile belirlenerek sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

MANTAR SINIFLAMASINDA KANDİDALARIN YERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Mantarlar ökaryotik, klorofilsiz absorpsiyonla beslenen canlılardır. Tek hücreli ya da çok hücreli olabilirler ve birden fazla nükleuslu olmaya eğilimlidirler. Kitin ve selüloz içeren sert hücre duvarına sahiptirler. Mayozlu çekirdek bölünmesi vardır. Morfolojik yapılarına göre maya ve küf görünümündedirler (35,63).

Mayalar ile ilgili bilgiler Hippocrates'e kadar uzanır. Hippocrates debil kimselerde aft ve pamukçuğu tanımlamıştır. Langebeck 1839'da afttan mantar izole etmiştir. Wilkonson 1849'da vajinal kandidozu bulmuştur. Hausmann da 1875'de vajinal kandida infeksiyonu ile pamukçuğun ilişkisini ortaya koymuştur. Bunu izleyen yıllarda bir çok araştırmacı tarafından çeşitli hastalık etkenleri olan maya türleri izole edilmiştir (35).

Mayalar, ökaryotik, tek hücreli, tomurcuklanarak üreyen genellikle yuvarlak veya oval şekilde mikroorganizmalardır. Germ tüp, blastospor, klamidospor, artrospor ve kapsül gibi yapılar oluştururlar. Bunlar idantifikasyonda önemlidir. Düşük oksijen basıncında ya da dokuda bazı mayalar hif, pseudohif veya her ikisini birden oluşturabilirler (63) .

Mayalar kültürlerinde krema kıvamında, yuvarlak, sınırları düzenli koloniler meydana getirirler. Kapsülü olanlarda mukoid koloniler görülür. Mayalar makroskobik ve mikroskobik morfolojik karakterleri ve biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde idantifiye edilirler. Genel olarak seksüel üreme özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Gerçek veya tam mayalar seksüel olarak ürer ve askospor veya basidiospor geliştirirler. Kusurlu veya maya benzeri mantarlar ise sadece aseksüel olarak ürerler (35,63).

1987'de Berlin'de 14. Ulusal Botanik Kongresinde, Dixon ve Fromling tarafından yapılan fungusların sınıflandırması esas alınarak, tıbbi önemi olan fungusları bu sınıflama içindeki yeri şu şekilde şematize edilebilir (63).

Tablo I: Tıbbi önemi olan funguslar

Sınıf: Zygomycetes

Takım: Mucorales

Cins: Rhizopus, Mucor, Rhizomucor, Absidia, Cunninghamella, Saksenaea

Takım: Endomophthrales

Cins: Basidiobolus, Conidiobolus

Sınıf: Ascomycetes

Takım: Endomycetales

Cins: Saccharomyces, Pichia

Takım: Onygenales

Cins: Arthroderma, Ajelomyces, Bazı Aspergillus ve Penicillium türleri

Sınıf: Deuteromycetes

Takım: Cryptococcales

Cins: Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Pitryosporum

Takım: Moniliales

Aile: Moniliaceae

Cins: Epidermophyton, Coccidioides, Paracoccidioides, Sporothrix, Aspergillus

Aile: Dematiaceae

Cins: Phialophora, Fonsecaea, Exophiala, Wangiella, Xylohypha, Bipolaris,

Alternaria

Takım: Sphaeropsidales

Cins: Phoma

Sınıf: Oomycetes

Cins: Pythium

Kandidalar, Deuteromyces sınıfında yer alırlar. Kandidalar oval biçiminde, gram pozitif, 80S ribozomları olan ökaryotik hücre yapısında olup fakültatif anaerop üreyen mikroorganizmalardır. Glikoz, mannoz ve az miktarda protein, lipid ve kitinden oluşmuş hücre duvarına sahiptirler (35,63,114). Multilateral tomurcuklanma ile aseksüel olarak ürerler. Yavru hücrenin ana hücreden ayrılmaması sonucu pseudohif oluştururlar. Son yıllarda bazı Candida türlerinin seksüel fazları bildirilmiştir. Bu türlere ait mayalar Deuteromyces sınıfından çıkartılarak Ascomycetes sınıfına dahil edilmişlerdir (35,63). Ayrıca önceleri kandidalardan pseudohif yapmaması ile ayırt edilen *Torulopsis glabrata*'nın (*T.glabrata*), son zamanlarda kandidalar ile aynı cinste değerlendirilip *C. glabrata* isminin kullanılması yaygın kabul görmektedir (43,63).

Kandida cinsi içinde yaklaşık 200 tür olmasına rağmen tıbbi önemi olan kandida türlerinin sayısı azdır. Bunlar: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* (*C.kefyr*), *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. ciferrrii*, *C. zeylanoides*, *C. pulcherrima* ve *C. stellatoidea*'dır. Bu listeki üyelerin sayıları artma eğilimindedir (1,29,35,114, 64).

KANDİDALARIN KLİNİK ÖNEMİ

Kandidalar doğada ve insan vücudu florasında yaygın olarak bulunurlar. Kandidaların insan florasındaki yerleşim ve dağılımı değişik özellikler gösterir. Deri florasında daha çok nemli kat yerlerinde olmak üzere *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve daha az sıklıkta *C. tropicalis* ve *C. krusei*' ye ve ender olarak *C. albicans*'a rastlanır. Sıkı giyim ve lokal antibiyotik kullanımı kolonizasyonunu arttırır (29,35,114).

Kandidalar sindirim sistemi florasında da bulunur. Sindirim sistemindeki kandida kolonizasyonu üzerinde diyet, sindirim sistemi bakteri florası ve laktik asitin denetleyici etkisi vardır. Sağlıklı bireylerde ağızda %30, jejunum ve ileumda %55 ve gaitada %65 oranında kandidalara rastlanmıştır (105). Ağız florasında en çok bulunan tür *C. albicans* (%75) olup bunu *C. tropicalis* (%8), *C. krusei* (%6),

C. glabrata (%2-6) izler. Ağız hijyeninin bozulması, diş protezi uygulanması, sigara içilmesi durumlarında ve diabetik hastalarda sayıları artar. Anorektal ve dışkı florasındaki kandidaların %50'sini C. albicans, %20'sini de C. tropicalis ve C. glabrata oluşturur. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanılması, kandidaların gastrointestinal kolonizasyonunu artırır (29,35,105).

Mikrobiyolojik ve biyokimyasal yönden kompleks bir yapıya sahip olan vajen florasında pek çok mikroorganizma yer almaktadır. Bu mikroorganizmaların içinde kandidalar da önemli bir yer tutmaktadır. Sağlıklı kadınların vajeninde %5-30 oranında kandidalara rastlanır ve bu oran gebelik, oral kontraseptif kullanımı gibi faktörlere bağlı değişmektedir (2,7,16,35,49,56).

Kandidalar fırsatçı patojenlerdir. Tüm diğer fırsatçı patojenler gibi çevresel ve bireysel koşulların organizma aleyhine geliştiği durumlarda hafif yüzeysel infeksiyonlardan, ağır sistemik infeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler. Floral bölgelelerde fizyolojik koşulların değişmesi (deride aşırı terleme, vajende pH değişiklikleri vb.), hormonal denge bozukluğu, kortikosteroidler gibi immun sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı, kanser veya AIDS gibi immün yetmezliğe yol açan hastalıklar kandida infeksiyonlarının gelişimini kolaylaştırır (29,35,64,114).

Vajinal kandida infeksiyonları sık rastlanan klinik tablolardan biridir. Tüm vajinitli kadınların üçte birinde etkenin kandidalar olduğu ve erişkin kadınların %75'inin yaşamları boyunca en az bir kez vajinal kandida infeksiyonu geçirdiği bilinmektedir (2,89). Vajinal kandida infeksiyonlarını predispoze eden konak faktörleri olarak: Gebelik, Diabetes mellitus, sıkı naylon giysilerin giyilmesi, immünite bozuklukları, geniş spektrumlu antibiyotikler, kortikosteroidler ve oral kontraseptiflerin kullanımı ileri sürülmektedir. Vajinal kandida infeksiyonu kadında yarattığı rahatsızlık duygusuyla sosyo-psikolojik yaşantıyı, evlilik ilişkilerini etkileyebilmekte ve bakteriyel infeksiyonların gelişmesine zemin hazırlayabilmektedir (49,89). Ayrıca vajendeki kandidaların fetusa ulaşarak düşüğe yol açtığı da bildirilmektedir (49). Çeşitli çalışmalarda vajinal kandida infeksiyonlarında en sık rastlanan etkenin C. albicans olduğu; C. krusei, C. pseudotropicalis, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata'nın da sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (2,7,8,16,42,58,103).

KANDİDA İNFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ

Konak savunma mekanizmaları ve mikroorganizmanın virulansı kandida infeksiyonlarının gelişiminde rol oynar. Sağlam deri ve mukozaların kandida infeksiyonlarının gelişimini önlemede rolü büyüktür. Deri maserasyonuna neden olan her türlü olay, sağlıklı kişilerde de duyarlı bölgelerde kandida invazyonuna izin verir. Kandidalar dermise veya kan dolaşımına geçtiğinde polimorfonükleer lökositler savunmaya katılır. Nötrofillerden başka monosit ve eozinofiller fagositozda yer alır. Doku makrofajlarının ve yerleşik retiküloendotelyal hücrelerin de kandidaları öldürme kapasiteleri vardır (29).

Myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon sistemi fagositlerin kandidaları öldürmelerindeki başlıca mekanizmalardır. Ayrıca fagositler kimotripsin benzeri katyonik proteinler üretilip membran geçirgenliği arttırarak etki ederler. Isıya duyarlı ve dirençli opsoninler, nötrofillerin kandidal fagositozunu kolaylaştırır (29,64).

Yerleşik floradaki bakteriler, besin maddelerini hızla tüketerek, çevre koşullarını kandidalar için uygun olmayacak şekilde değiştirir veya toksik maddeler üreterek kandidaların çoğalmasını engeller (35).

Hipoparatiroidizm, adrenal yetmezlik, kronik lenfositik troidit, diabet, over hipofonksiyonu ve adrenokortikotropik hormon eksikliği gibi endokrin bozukluklar kronik mukokutenöz kandida infeksiyonları ile ilişkilidir (35,61,105).

Kandidalara karşı humoral ve hücrel bağışıklık gelişmekle beraber hücrel bağışıklığın rolü daha büyüktür. Genel olarak yüzeysel deri infeksiyonlarında hücrel bağışıklığın, sistemik infeksiyonlarda ise doğal direncin yanında humoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (29,61).

Kandida hücre duvarında bulunan mannan, T lenfositlerin duyarlanmasında başta gelen antijendir. Duyarlılaşan T lenfositleri lenfokin salgırlar ve makrofajları aktive ederler (20,29,61). Mannan antijenik yapı olmasının yanısıra virulansta da rol oynar. Kronik mukokutenöz kandidiyaziste hücrel bağışıklığı inhibe eder. Geç tip aşırı duyarlılığı baskılar ve kronik kandidiyaziste mannoprotein ve mannan metabolitleri IL-1, IL-2 ve TNF aktivitesini etkiler (20). Hidrolitik enzimlerinden

fosfolipazlar membran fosfolipidlerini, asit proteinazlar salgısal IgA'yı parçalayarak epitel hücrelerine yapışmada rol oynarlar (20,64,67).

Kompleman opsonizasyon için gereklidir. Kandidalar tarafından daha çok alternatif yol olmak üzere her iki yoldan da aktive edilirler. C3b komponentinin blastosporlara bağlandığı gösterilmiştir. Kronik mukokutenöz kandida infeksiyonlarında deri bazal membranında kompleman komponentlerinin biriktiği gösterilmiştir. Ayrıca insan kompleman reseptörleri CR2 ve CR3'e benzer kandida yüzey molekülleri tespit edilmiştir, ancak klinik önemi tartışmalıdır (29).

Kandidalar infekte dokuda maya ve hif formu şeklinde bulunurlar. Aktif semptomatik infeksiyon hif formu ile ilişkilidir. Hif formu maya formuna göre, dokuya 50 kat daha fazla yapışır. Normalde insanda kommensal olarak bulunan kandidaların patojen hale geçmeleri için savunma mekanizmalarının baskılanması gerekir. Bu doğal veya iyatrojenik olarak gelişebilir (82).

Diabetes mellitus'ta glikoz düzeyinin yükselmesi doku invazyonu olmaksızın fungal üremeyi artırır. Ciddi yanık lezyonlarına kandidalar kolonize olduğunda, deri bütünlüğü bozulmuş olduğundan doku invazyonu gelişebilir. Gebelikte östrojen ve vajinal glikojen miktarının artması, vajinal kolonizasyona sebep olabilir (29,57). Kandidaların glikoprotein yapısındaki toksinleri patojenitede rol oynayan virulans faktörlerindedir. Bakteri toksinleri gibi pirojen olup hayvanlarda anaflaktik şoka neden olabilir, ancak bakteri toksinleri kadar etkin değildir (20,64).

Kemoterapi ve radyoterapi sonrası maserasyona bağlı doku invazyonu gelişebilir. Hiperalimentasyon sıvıları intravasküler hiperglisemik ortam sağlayarak kandida infeksiyonlarını kolaylaştırır. İntravasküler kateterler, basınç izleme aletleri, prostetik kalp kapakları ve pacemaker yerleştirilmesi dissemine kandidiyazise yol açar. Geniş spektrumlu antibiyotiklerle flora bakterilerinin baskılanması kandida infeksiyonlarına yol açabilir (29,35).

KANDİDALARIN LABORATUVAR TANISI

Kandidalar normal florada da bulduklarından, laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üreyen kandidaların klinik bir öneminin olup olmadığını tahmin etmek ve rapor edip edilmemesine karar vermektir. Bu nedenle, laboratuvar verilerin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik- laboratuvar işbirliğinin kurulması gerekir (33,57).

Kandidaların tanımlanmasında klinik örneğin uygun bir şekilde alınıp ekilmesi ve diğer laboratuvar işlemlerinin yapılması gerekir (73). Örnekler asepsi kurallarına uygun olarak alınıp hızla laboratuvara iletilmelidir (91). Klinik materyalden kandidaların izolasyonu ve idantifikasyonu için bir dizi işlem yapılır (114).

Primer izolasyon:

Primer izolasyon için klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan besiyeri Sabauroud's Dekstroz Agar (SDA)'dır (91).

Primer izolasyon besiyerlerinin bileşimine bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılayarak seçicilik sağlamak üzere antibiyotikler eklenebilir (Sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol gibi). Ayrıca ticari olarak hazırlanmış, antibiyotik içeren Mycosel (BBI), Mycobiotic Agar (Difco) gibi seçici besiyerleri kullanılabilir (63,91). Sikloheksimid'in, bazı türlerin üremesini kısmen veya tamamen inhibe etmesi nedeniyle, aynı zamanda sikloheksimid içermeyen besiyerine de ekim yapılmalıdır (91).

Kültür için alınan örnekler uygun besiyerine ekildikten sonra 26 ve 37 °C'de ayrı ayrı inkübe edilirler. Patojen kandidaların çoğu 26 ve 37 °C'de birkaç günde ürerler. 37 °C'de üreyememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir (15). Kültür tüplerinin kapakları havalanmayı sağlamak üzere hafifçe gevşetilmelidir. İnkübatör nemi %30-40'a ayarlanmalıdır. Nem yeterince yüksek değilse inkübatöre ağzı açık genişçe bir kap içerisinde su yerleştirilir (35,106).

birisine test edilen maya kolonisinden bir parça alınıp iğne öze ile birbirine paralel çizgiler şeklinde ekim yapılır. Üzerine steril bir lamel yerleştirilip 27 °C'de üç gün inkübe edilir. Besiyerinin derinliğine ekim, kapatılan lamelin ortamın oksijenini azaltması ve Tween 80'in yüzey gerilimini düşürmesi klamidospore ve pseudohif üretimini artırır (15,63,114).

Biyokimyasal testler:

Karbonhidrat asimilasyon testi:

Mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Wickerham yöntemi, oksanografik yöntem ve ticari idantifikasyon kitleri kullanılarak yapılabilir (15,114).

Nitrat asimilasyon testi:

Karbonhidrat asimilasyon testine benzer ve mayaların nitrojen kaynağı olarak nitratı kullanma yeteneklerini ortaya koyar (63,90,114).

Karbonhidrat fermantasyon testi:

Fermantasyon, karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımıdır. Modifiye Wickerham tekniği ile yapılabilir. Fermantasyon tüplerindeki pH değişikliği fermantasyonu göstermez. Durham tüpünde gaz kabarcığının gözlenmesi ile ortaya konur. Candida türleri ile Cryptococ ve Rhodotorula gibi nonfermantatifleri ayırmada yararlıdır. Karbonhidrat asimilasyon testlerine göre kaba, zor ve daha az güvenilir olduğundan rutin idantifikasyonda pek önerilmez (15,114).

Üreaz Testi:

Christensen's üre agarda üre hidrolizi üreaz aktivitesini gösterir. C. krusei, ve C. lipolytica üreyi hidroliz edebilir (114).

Sık rastlanan Candida türlerinden bazılarının karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri tablo II' de sunulmuştur (35,63).

Tablo II: Sık rastlanan Candida türlerinden bazılarının karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri

Türler	Fermentleme				Asimile etme					
	Gl	M	S	L	Gl	Gal	L	M	R	S
C. albicans	+	+	±	-	+	+	-	+	-	+
C. stelloidea	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
C. krusei	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
C. kefyri	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
C. parapsilosis	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+

Gl:Glikoz, M:Maltoz, S:Sukroz, L:Laktoz, Gal:Galoktoz, R:Raffinoz

Hızlı identifikasyon Kitleri:

Günümüz mikoloji laboratuvarlarında 4-72 saat gibi kısa sürelerde sonuç veren ve daha kolay uygulanabilen maya identifikasyon kitleri tercih edilmektedir (7,15,40,54,63,70,75,91,96,99). Bunlar, maya identifikasyon yönteminde standardizasyon sağlar. Hem sık bulunan hem de az rastlanan türleri identifiye etmede yeterlidir. API 20C AUX (bioMerieux), API Yeast Identification System (Analytab product), Uni Yeast Tek (Flow laboratories), Abott Yeast Identification System (Abott Diagnostic), Auto Microbic System (Vitek System), Micro Scan Yeast Identification Panel (Baxter Microscan), Candifast (International Mycoplasma), Mycotube (Roche Diagnostica), Auxocolor (Diagnostics Pasteur), AutobacI (Organon Teknik) ve Pasteur Yeast System (Pasteur Production) gibi pek çok ticari kit vardır (7,15,40,50, 54,70,75,96,99).

Kromojenik besiyerinde koloni rengi ve görünümünün değerlendirilmesi:

Candida türlerinin çoğunun SDA'daki kolonileri krem kıvamında ve ovaldir (C. albicans, C. stelloidea, C. tropicalis gibi). Koloni rengi geleneksel olarak kullanılan besiyerlerinde ayırt edilemez. Farklı Candida türlerinin farklı renklerde ürettiği besiyerleri vardır. Pagono-Levin Agar (Difco), tetrazolium hidrokloridin redüksiyonu ile farklı renkte koloniler oluşturarak tek bir klinik örnekten birden fazla Candida türünün izolasyonuna izin verir (120). Yine koloni rengine göre hızlı tanıyı sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri vardır; Albicans ID (Bio Merieux, Marcy Etoile, France), Candichrom albicans (International Mycoplasma, Toulon Cedex-France), Candiselect (Sanofi Diagnostics Pasteur), Chromoagar Candida (BBL), MAST ID-CHROMagar Candida (Mast Diagnostics, United Kingdom) (10,42,121). Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (10,13,42,84).

Serolojik testler:

Mikolojik hastalıkların tanısında mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemeler yanında serolojik testlerden de yararlanılabilir (114). Serolojik testler tanısal önemleri yanında hastalığın seyrinin izlenmesinde de yararlıdırlar. Ancak serolojik testler, teknik uzmanlara gereksinim olması, reagenlerin zor hazırlanması ve maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle rutinde kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda sistemik mantar hastalıklarında belirli bir artışın olması, yeni mantar antijenlerinin elde edilmesine, özelliklerini belirlemeye ve yeni teknolojik gelişmelere yönelik çalışmaları yoğunlaştırmış ve serolojik testler kullanıma girmeye başlamıştır. Bu testlerin çoğu antikor ölçmeyi amaçlayan testlerdir (63,65). Aspergilloz, blastomikoz, hitoplazmoz, kandidoz gibi hastalıkların tanısında yardımcı olmaktadır. Ancak çapraz reaksiyonların çok fazla meydana gelmesi, geçirilmiş infeksiyon ile aktif infeksiyonu ve kolonizasyon ile yaygın hastalığı ayırmada başarısız olmaları bu testlerin değerini azaltmaktadır (65).

Mantar antijenlerini göstermeye yönelik testlerin geliştirilmesine çalışılması daha uygun görülmektedir. Özgül antijenleri göstererek tanıyı sağlamak yüksek

derecede özgül ama duyarlılık açısından klasik yöntemleri tamamlayıcı özellikte görülmektedir. Kriptokokkoz ve histoplazmoz tanısında antijenleri saptama yöntemleri başarılı olurken, aspergillus ve kandida gibi fırsatçı mantarlarda bu yöntemlerin duyarlılığı düşük bulunmaktadır. Bu problemi çözebilmek için çok saf antijenleri kullanmak, monoklonal veya adsorbe poliklonal antikorları ve çok duyarlı yöntemleri geliştirmek gerekmektedir (63,65).

Mantarların polisakkarit antijeni galaktomannan (GM) çalışmaların en önemli odağıdır. Çeşitli yöntemlere duyarlılığı %95'in üzerinde, özgülüğü %29-90 arasında bildirilmektedir (65,82). Kriptokokkun kapsüler polisakkariti, histoplazmanın polisakkarit antijeni, blastomiçeslerin yüzey proteini (W1-I), A ve AWSE antijenleri, kandidaların asit proteaz, 48kDa enolaz enzimi, 47 k Da, 29 k Da sitoplasmik antijenleri ve glikoproteinleri gibi mantar antijenleri hastaların vücut sıvılarında ve serumlarında gösterilmektedir. Bu mantar antijenleri; Lateks partiküler aglütinasyon (LPA), Liposome İmmünoassay (ICON-test), İmmünoelektroforez (CIE), Radioimmünoassay (RIA), İmmüno blotting-Western blotting (WB), Dot-İmmünoassay, Dot- Enzim İmmünoassay, Enzim İmmünoassay (ELISA, Çift Antikor Sandviç EIA, Avidin-Biotin ile Güçlendirilmiş EIA) gibi yöntemlerle gösterilmektedir (63,65).

Mannan veya sitoplasmik proteinler gibi antijenik komponentler veya D-arabinitol gibi karakteristik metabolik ürünlerine karşı antikor aranması serolojik tanıda kullanılır (82). Kandidalar gibi normal florada bulunan mantarlara karşı sağlıklı kişilerde de antikor gelişmesi test sonuçlarını değerlendirmekte güçlükler neden olmaktadır (65). Antikor testi için 1/32 veya üzerindeki titre ya da üç hafta arayla titrede dört kat ve üzerindeki artış hastalığın tanısında değerli kabul edilmektedir. Daha düşük titreler ve aralıklı uygulanan testlerde dört katın altındaki artış, erken enfeksiyonu veya nonspesifik çapraz reaksiyonu işaret eder (63).

Ig M sınıfı antikorlar akut enfeksiyonu gösterir. İnfeksiyonun ikinci haftasında titresi yükselir, altı aydan sonra düşer. Ig G antikorları, Ig M antikorlarından kısa bir süre sonra ortaya çıkar, yaklaşık 6-12 haftada pik yapar ve enfeksiyondan aylar sonra pozitif kalır. Bu nedenle tek bir defa yüksek bulunmuş Ig G titresi yeni veya geçirilmiş enfeksiyonun ayırımında kullanılamaz (63,87). Mantar antijenlerine karşı oluşan

antikorları göstermekte son yıllarda ; Radioimmünoassay (RIA), İmmünoblotting-Western blotting (WB), İndirekt İmmün Floresans (IIFA),Enzim İmmünoassay (ELISA, Çift Antikor Sandviç EIA, Avidin-Biotin ile Güçlendirilmiş EIA) gibi yöntemler kullanılmaktadır (63,65).

Moleküler biyolojik yöntemler:

Klinik mikoloji laboratuvarında moleküler biyolojik yöntemlerin rolünü ortaya koymak için büyük prospektif çalışmalara gereksinim vardır. Yeni çalışmalar, mantar türlerine özgü DNA dizilerini klinik örneklerden saptama yöntemlerinin mantarların tanısında uygun ve etkin olduğunu ancak yeterli olmadığını göstermektedir. Mikolojide, moleküler yöntemlerin alışılmış mikroskopik bakı ve kültürün yerini tamamen alması henüz erken görünmektedir (36).

İnfeksiyon etkeni aranmasında, moleküler yöntemlerin kullanılmasında örnek seçimi ve işlemi önemlidir. Histoplasma capsulatum gibi bir mantar aranacaksa, her klinik örnek çalışılabilir. Buna karşın, ağız salgılarında *C. albicans* DNA'sının bulunması anlamlı olmayabilir. Serum, ince aspirasyon materyeli gibi, steril bölge örneklerinden kandidal DNA saptanması ise tanı yönünden anlamlıdır. Örneklerden nükleik asit izolasyonu için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ile 1 pg'den az fungal genomik DNA veya 1-15 fungal hücre varlığında çok büyük bir duyarlılıkla tanı konulabilmektedir. PCR'da amplifiye edilecek gen parçasının büyüklüğü belirlenmelidir. Tüm mantarlarda bulunan rDNA parçası seçilebileceği gibi, tek türe, hatta türlere özgü DNA saptanacak şekilde test geliştirilebilir. Amplifikasyon ürünlerinin küçük olması testin duyarlılığını artırır (36,74).

Çoğaltılan ürün saptanmasında hız ve kolaylık açısından en uygun yöntem ethidium bromid ile jel analizidir. Ancak duyarlılık artırılmak istenirse, radyoaktif dot blot veya Southern blot analizleri kullanılır. Kemilüminesans ve enzim kullanan non-radyoaktif sistemler de geliştirilmiştir (36).

Mantar epidemiyolojisini araştırmak için de moleküler yöntemler başarıyla uygulanmaktadır. Aspergillus, Candida türleri ve Histoplasma capsulatum bu yönden

en çok ilgilenilen mantarlardır. Genetik değişiklikler de bu yöntemlerle ortaya konulabilir. Bu amaçla küçük miktarlarda nükleik asitlerin yeterli olduğu PCR, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), QB sistemi ve nükleik asit dizisi temelli amplifikasyon yöntemi (3SR) gibi gen amplifikasyonuna dayalı mikolojik parmak izi çıkarma yöntemleri kullanılabilir (111).



ANTİFUNGAL AJANLAR

Antifungal ajanlar deri, mukoza ve organların lokal veya sistemik infeksiyonlarına karşı etkili, topik, oral ve parenteral yoldan uygulanabilen bileşiklerdir (11). Antifungal ilaç tedavisi toksik etkilerinden dolayı 1950’li yıllara kadar potasyum iyodür ve metilen mavisi ile sınırlı kalmıştır. Daha sonra amfoterisin B keşfedilmiş ve 1950’lerde kullanıma girmesinden bu yana sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde standart antifungal ilaç olmuştur (11,45,108). Mantar infeksiyonlarındaki artışa paralel olarak, ilaç endüstrisinde de hızla çalışmalar artırılmış, bir çok yeni antifungal ajan geliştirilmiştir (34).

Amfoterisin B’ye alternatif seçenek olan 5-florositozin 1964 yılında kullanıma girmiştir. 1960’ların sonlarında sentetik yolla elde edilen azollerin ilk grubunu oluşturan imidazol grubu antifungal ajanlar; klotrimazol, mikonazol, ekonazol, izokonazol, ketokonazol, tiyokonazol, sulkonazol, bifonazol, oksikonazol, butokonazol ve fentikonazolden oluşur. Son olarak, 1980’lerden sonra ikinci azol türevi olan triazollerden terkonazol, itrakonazol ve flukonazol klinik kullanıma dahil edilmiştir. Standart antifungal ilaç amfoterisin B’nin yerini azol grubu ilaçların alabileceği gösterilmiştir (11,19,34,38).

Günümüzde kullanılan antifungal ajanlara 10 yıl öncesine kadar çok seyrek direnç görülmekte iken, 1990’larda özellikle immunsupresse hastalarda, direnç önemli bir problem haline gelmeye başlamıştır. Örneğin, AIDS’li hastalardaki orofaringial kandida infeksiyonlarında sıklıkla antifungal ajanlara direnç bildirilmektedir (117).

Fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılacak antifungalın seçimi, dozu ve kullanım süresiyle ilgili veriler yetersizdir. Ayrıca antifungal ajanların in vitro ve in vivo duyarlılık sonuçları da standart değildir. Antifungal ajan kullanımında bir diğer sorun, konak hücre ile ökaryotik fungus hücrelerinin arasındaki benzerliktir (11,34,38). Tedavinin başarılı olması için geniş spektrumlu, konakçıdan daha fazla fungal özgüllüğü olan, vücut doku ve sıvılarına iyi dağılım gösteren ajanlara gereksinim duyulmakta ve bu konudaki çalışmalar hızlandırılmaktadır (34). Tablo III’de klinikte sık kullanılan antifungaller ve etki mekanizmaları özetlenmiştir (34,38).

Tablo III: Klinikte sık kullanılan antifungaller ve etki mekanizmaları

Antifungal ajan	Etki Mekanizması
Poliyenler:	Mantar hücre duvarı ergosteroline bağlanarak hücre duvarı geçirgenliğini artırır. Özellikle hücre içi K ⁺ kaybı hücre canlılığının yitirilmesine neden olurlar.
Amfoterisin B deoxycholate (ABD)	
Liposomal amfoterisin B (Ambisome)	
AmfoterisinB colloidal Dispersion (ABCD:Amphocil)	
AmfoterisinB lipid complex (ABLC)	
Pirimidin Sentez İnhibitörleri:	RNA ve DNA sentez inhibisyonu yaparlar.
5-florositozin	
İmidazoller:	Sitokrom P450'nin hem kısmına bağlanarak lanosterolün α -demetilasyonunu inhibe ederek ergosterol sentezini inhibe ederler.
Mikonazol	
Ketokonazol	
Triazoller:	İmidazollerle aynı
Itrakonazol	
Flukonazol	

KLİNİKTE SIK KULLANILAN ANTİFUNGALLER

Poliyen Antifungaller:

Hücre membranındaki ergosterolü hedef alan antifungal ajanlardır. Bu ajanların hidrofobik ve hidrofilik kısımları vardır (117).

Amfoterisin B:

Fungusların çoğu amfoterisin B'ye duyarlıdır (11,108). Hücre membranındaki ergosterole bağlanarak etki gösterir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (117). Hücre membran permeabilitesini bozarak hücreye ait makromoleküller ve iyonların kaybına ve oksidatif yıkıma neden olup, fungusit etki göstermektedir. Çok azda olsa kolesterol ile bağlanabilir ve yan etkiler ortaya çıkar (11,117).

Amfoterisin B oral yoldan verildiğinde gastrointestinal yoldan emilmez. İntramüsküler verildiğinde de emilimi çok azdır. Bu nedenle intravenöz uygulanır (80). Üriner infeksiyonlarda keseye irrigasyon şeklinde lokal olarak da verilebilir (52). BOS'a geçişi zayıf olmasına rağmen kandida ve kriptokok menenjitinin tedavisinde tek başına veya 5-florositozin ile birlikte kullanılmaktadır. Serum proteinlerine %90 oranında bağlanır. Karaciğer, dalak ve böbreklerde yüksek konsantrasyonlara erişir (11,80,108).

Yan etkiler fazladır. Terapötik ve toksik dozları birbirine çok yakındır (31). Nefrotoksik etki, en ciddi yan etkisidir. İlacı kullananların hemen tümünde böbrek hasarına ait bazı bulgular ortaya çıkmaktayken kalıcı böbrek hasarı total doza bağlı olarak %17-44 arasındadır (102,108). Bilinen en güçlü antifungal ajandır, ancak toksik etkileri kullanımda önemli sınırlamalar getirir (71,102,108).

Son yıllarda özellikle azol grubu antifungal ajanların profilaktik ve ampirik amaçla daha çok kullanılması ve immunsuprese hastaların yaşam sürelerinin uzaması tür dağılımının değişmesine yol açmış ve eskiden non patojen olan *C. albicans* dışı *Candida* türleri hastalık etkeni olarak görülmeye başlamıştır. Amfoterisin B'nin bunlara etkisi kuşkuludur (31). Amfoterisin B'ye karşı *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* gibi bazı kandidalarda direnç görülmektedir. Bu direnç genellikle tedavi sırasında ortaya çıkar (31,113,117). Kemoterapi alan kanser

hastalarında, azol grubu ajanlarla tedavi edilmeye çalışılan AIDS'lilerde ve immun yetmezlikli sistemik kandida infeksiyonu olanlarda direnç bildirilmektedir (79). Direnç sebebi olarak, sterol sentezini bloke eden azol grubu antifungal ajanların, sitotoksik kemoterapi veya radyoterapinin, amfoterisin B'nin hedef yapısını ortadan kaldırdıkları ileri sürülmektedir (28,31,79,117,119).

Son yıllarda ilacın toksisitesini azaltmak üzere amfoterisin B'nin lipozomlarla kaplanması ya da çeşitli lipid taşıyıcılarla kompleks oluşturması denenmiş ve toksik etkilerin azaldığı kesinlikle saptanmıştır (11,34). Lipid taşıyıcıların, amfoterisin B'nin doza bağımlı olarak etkisini artırdığı deneysel hayvan çalışmaları ile gösterilmişse de klinik veriler yeterli değildir (34,51,53,116). Hali hazırda amfoterisin B'nin üç lipid formülasyonu (lipozomal amfoterisin B -Ambisome, amfoterisin B lipid kompleksi- ABCL veya Abelcet, amfoterisin B koloidal dispersiyon- Amphocil) mevcuttur (34,51). Bunların yapıları ve farmakokinetikleri oldukça farklıdır. Ancak bu farklılığın tolerans ve etkinlikte nasıl rol oynadığı kesin olarak bilinmemektedir (51,117). Şu an için en fazla klinik veri lipozomal amfoterisin B ile alınmıştır. Derin yerleşimli kandida infeksiyonlarının tedavisinde denenmektedir Genel durumu kötü bir çok nefrotoksik ilaç alan ve amfoterisin B'nin toksitesinin olduğu durumlarda kullanımı uygun bulunmaktadır (51,116).

Pirimidin Sentez İnhibitörleri:

5-Florositozin:

5-florositozin RNA sentezini inhibe ederek etki gösterir. Fungus hücre membranındaki sitosin permeaz tarafından hücre içine alınır ve sitosin deaminazla deamine edilerek 5-florourasile dönüşüp RNA yapısına girer ve RNA yapısını bozar. Diğer bir metaboliti olan florodeoksiüridin monofosfat DNA sentezini bloke eder. Memeli hücrelerinde sitosin deaminaz bulunmadığı veya çok az bulunduğu için, konağa etki etmez (70,71,117).

Amfoterisin B'ye göre etki spektrumu daha dar, toksisitesi daha düşüktür (59,70,71,102). Kriptokokal menenjitin tedavisinde amfoterisin B ile beraber kullanılır (39,102).

Direnç önemli bir problemdir. Primer direncin en yoğun olarak görüldüğü ilaçtır. *C. albicans* ve *C. glabrata*'da yaklaşık %7-10, diğer *Candida* türlerinde %21 oranında primer dirence rastlanmaktadır (31). Bazı suşlarda çok yavaş bir şekilde parsiyel direnç gelişir ve bu direnç 100 mg/l ilaç konsantrasyonu ile ortadan kaldırılır. Bazı suşlarda ise çok çabuk bir şekilde yüksek seviyede direnç gelişir. Duyarlı mikroorganizmalar permeabilite değişikliği, enzim modifikasyonu ve purin ve pirimidin gibi yarışmacı metabolitlerin varlığı ile tedavi sırasında direnç geliştirebilirler (117). BOS'da serum konsantrasyonunun %85-95'ine erişir, bu nedenle menenjit tedavisinde kullanılabilir. En önemli direnç gelişim nedeni tek başına kullanılmasıdır (71,117).

Azol Grubu Antifungaller:

Klasik antifungal ajanlar sayılan 5-florositozin ve amfoterisin B'den sonra azol türevlerinin geliştirilmesi antifungal tedavide önemli bir adım olmuştur. Bu grup antifungaller ergosterol biyosentezini çeşitli basamaklarda inhibe ederek etki gösterirler. Azol türevleri imidazol ve triazol olmak üzere iki gruba ayrılır. İlk olarak genellikle topikal etkili olan imidazol türevleri geliştirilmiş ve kullanıma girmiştir. İnsanlarda kullanıma uygun olduğu bildirilen ilk üç azol bileşiği, klotrimazol (1969), ekonazol (1969) ve mikonazol (1970)'dur. 1977'de oral olarak iyi absorbe edilen ketokonazol geliştirilmiştir (11,34,117). Daha sonra triazol geliştirilmiştir. Triazol, imidazollere göre daha geniş etkili, daha az toksik olup, bu grupta itrakonazol ve flukonazol yer alır (11).

1.İmidazoller:

Ketokonazol:

Ketokonazol suda çözünmeyen, sentetik imidazol türevi antifungal ajan olup, amfoterisin B ile tedavi edilen bir çok mantar infeksiyonlarına karşı etkili, oral kullanılan, geniş spektrumlu ilk antimikotik ilaçtır (11,19,21,46).

Ketokonazol sitokrom P-450 enzimi olan lanosterol 14- demetilaz enzimini inhibe ederek, lanosterolün primer sterolü olan ergosterole dönüşümünü engeller.

Membranın geçirgenliği, akıcılığı ve sentezi bozulur. Membranla ilişkili diğer enzimlerin aktiviteleri değişir. Oksidatif ve peroksidatif enzim sistemleri baskılanır ve intrasellüler toksik reaktif peroksitler birikir. Ketokonazol primer olarak fungostatiktir (11,19,71,46).

Oral alındığında emilimi normal mide pH'ında iyi olup, asit fazlalığında emilimi artmaktadır. Plasma proteinlerine %99 oranında bağlanır. Plasma serum konsantrasyonuna 2 ile 4 saat arasında erişmekte ve 3-4 gün içinde sabit plasma seviyesine ulaşmaktadır (19,46). İlaç tükürük, infekte eklem sıvısı, vajina, deri ve yumuşak dokulara kolayca geçer ancak, mide, idrar, seminal sıvı ve BOS'a geçişi sınırlıdır (21,46) Santral sinir sistemi infeksiyonlarında BOS'a geçişi sınırlı olduğundan tercih edilmez (39). İlaç başlıca karaciğerde metabolize olmakta ve metabolitleri antifungal etki göstermektedir. Alınan dozun %70'i 4 gün içerisinde vücuttan atılır. %57'si feçesle, %13'ü idrarla atılır (19,46). Yarılanma süresi uzun olduğundan günde tek doz kullanılabilir. Dozun artmasıyla yarılanma süresi artmaktadır (19,21,46).

İlaç etkileşimleri çoktur. Antiasitler, omeprazol, antikolinerjikler, antispasmodikler, rifampin, izoniazid, fenitoin, terfenatin, asetamizol, kordiazepoksid, antikoagülanlar, siklosporin, insulin, amfoterisin B, kortikosteroidler ve alkol ile birlikte alındığında, doz ayarlaması yapıp, hastalar yakından izlenmelidir (19,21,46).

Ketokonazol fungal sitokrom P-450 enzimini inhibe ettiği gibi, memelilerin adrenal gland, testis, over, böbrek ve karaciğerdeki sitokrom P-450 enzimi sistemleri ile de reaksiyona girebilmekte ve bunun sonucunda doza bağlı, reversibl etkiler görülebilmektedir (46). Ayrıca GH, PRL, ACTH, TSH, T3-T4 üzerine etkisi olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (19). İlacın en sık görülen yan etkileri; iştahsızlık, bulantı, kusma, karın ağrısı, döküntüsüz kaşıntı ve ishaldir. Karaciğer toksisitesi % 1-5 oranında görülür. Yurdumuzda ketokonazol'e bağlı bir toksik hepatit olgusu bildirilmiştir (107).

İn vitro etki spektrumu geniştir. Pek çok mantar türüne etkiliyken, mukorlara etkisizdir. C. krusei ve Aspergillus fumigatus'da direnç görülmektedir (117). Yüzeysel dermatofit infeksiyonlarında tırnakların onişomikozisinde, tinea kapitiste, tinea versikolorda, pitrosporomun sebep olduğu follikülit, seboreik dermatit ve Reiter

sendromunun cilt lezyonlarında, kronik mukokutenoz ve vajinal kandida infeksiyonlarında kullanılmaktadır. Sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde de amfoterisin B'ye iyi bir alternatiftir ancak özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda etkinliği sınırlıdır. Fungostatik etkili olması, ilaç etkileşiminin, fazla olması ve intravenöz uygulanamaması sistemik kullanımını sınırlar (11,19).

2.Triazololler:

Bu grupta sık kullanılanlar itrakonazol ve flukonazol dur.

Itrakonazol:

Oral absorpsiyonu ve dokulara dağılımı iyi, serum yarı ömrü uzun, BOS'a geçişi zayıf lipofilik bir ilaçtır. Mikonazol ve ketokonazole göre fungal hücre sitokromlarına daha spesifik bağlandığından toksisitesi düşüktür. Lokalize ve sistemik infeksiyonlar, dermatomikozis, oral ve vajinal kandida infeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (11).

Itrakonazol, invitro ve hayvan deneylerinde *Aspergillus* türlerine etkilidir. Klinik çalışma sonuçları da bu verileri desteklemektedir (108). Itrakonazolün en önemli dezavantajı biyoyararlanımının iyi olmayışı ve intravenöz bir preparatının bulunmayışıdır (109).

Flukonazol:

Flukonazol 1982 yılında bulunan, diflorafenil bistriazol türevidir. Flukonazol düşük konsantrasyonlarda 14 α demetilaz enzimini ve ergosterol sentezini inhibe edip lanosterol ergosterol oranını yükseltir. Yüksek konsantrasyonlarda lanosterol ergosterol oranına bağlı olmayarak fungal hücre membranında hızlı bir şekilde hasar oluşturarak fungusid etki gösterir. Azoller oksidatif ve peroksidatif enzim sistemlerini inhibe ederek intrasellüler toksik reaktif peroksitlerin artışına neden olur (11,19,71). Ayrıca, lökositler ve makrofajlar için toksik olan mantarların maya formundan yalancı hif oluşumunu inhibe edebilirler. Flukonazol, fungal 14 α demetilaz enzimini memeli enziminden 10000 kat daha güçlü bir şekilde inhibe eder. Yan etkileri azdır. En sık

gastrointestinal sistem bulguları, başağrısı, döküntü görülür. Yan etkilerin görülme insidansı %16 olarak bildirilmiştir (19).

Flukonazol ağız ve damardan kullanılabilir. Ağız ve damardan alınmasında farmakodinamik özellikleri benzerlik gösterir. Ağızdan alındığında %90'ndan fazlası emilir. Biyoyararlanımı diğer azol türevlerine göre yüksek olup, %96.7'dir. Yine ketokonazol ve itrakonazolün aksine plazma proteinlerine bağlanma oranı % 11-12 gibi düşüktür (19,25). Serum yarılanma ömrü uzundur ve günlük tek dozla yüksek plazma seviyelerine ulaşılır. Plazma yarı ömrü 30 saattir (93). Amfoterisin B tedavisi başarısız olmuş kemoterapi alan kanserli hastalardaki kandida sepsisinde flukonazol ile başarılı sonuçlar alınmıştır (3). BOS' a geçişi iyi olan tek azol türevidir. Amfoterisin B tedavisi başarısız olmuş AIDS'li hastaların kandida infeksiyonlarında kullanılır (19,39). İlacın balgam, peritoneal sıvı ve vajinal dokudaki seviyeleri plazma seviyelerine benzerdir. Vajinal kandida infeksiyonlarında sık kullanılır ve tek doz etkilidir (11,117). Deri ve tırnaklarda yüksek seviyelere erişir. Yüzeyel mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanımına dair hayli tecrübeler vardır. İdrarda plazmanın on katı kadardır. Böbreklerden %80'i değişmeden atılır . Bu nedenlerle idrar yolu kandida infeksiyonlarında etkilidir. Flukonazolün ketokonazole oranla diğer ilaçlarla etkileşimi daha azdır. Fenitoin, diüretikler, rifampisin, warfarin ve tolbutamid ile birlikte kullanıldığında doz ayarlaması gerekir (11,19,71).

Son yıllarda yukarıda bahsedilen özellikleriyle cazip bir ilaç olarak yaygın olarak kullanılan flukonazol'e karşı artan oranda direnç bildirilmektedir. Sistemik antifungal ajan olarak profilaktik ve ampirik amaçlı yaygın flukonazol kullanımı sonucu hastalık etkeni olan dirençli suşların sıklığı artmıştır. Bu suşlardan *C. krusei* in vitro ve hayvan deneylerinde flukonazol'e daima dirençli itrakonazol'e bazen dirençli, amfoterisin B'ye az duyarlıdır. *C. glabrata* sıklıkla flukonazol ve ketokonazol'e dirençli, itrakonazol'e duyarlıdır. *C. tropicalis* artan oranda flukonazol'e karşı dirençli (>%50) ketokonazol ve itrakonazole ise çapraz direnç görülebilir. *C. parapsilosis* sıklığı da giderek artmaktadır ama, çok az sayıda azol direnci bildirilmiştir (26). Bu dirençler uygulamalara da yansımaktadır. Özellikle AIDS'li hastaların orofaringeal kandida infeksiyonlarında *C. albicans* suşlarında klinik olarak direnç görülmüş ve bu in vitro olarak da gösterilmiştir (31). Ayrıca bu

C.albicans suşları flukonazol'e karşı dirençli olmasına rağmen itrakonazol ve ketokonazol'e karşı duyarlı bulunmuştur. AIDS'li hastalarda C. tropicalis suşlarında da flukonazol'e karşı direnç bildirilmiştir (31,56,117). Vajinal kandida infeksiyonlarında %10 oranında azollere direnç bildirilmekte ve bu direnç son yıllarda görülme sıklığı artan C. albicans dışı Candida türlerine bağlanmaktadır (26). Tekrarlayan vajinal kandida infeksiyonu olan kadınlardan izole edilen C. glabrata suşlarında flukonazol tedavisine direnç saptanmıştır (56). Seyrek de olsa vajinal kandida infeksiyonlarında C. albicans suşlarında da direnç bildirilmeye başlanmıştır (26,101).

Primer ya da sekonder azol direncini açıklayan çeşitli mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar membran permeabilitesinin azalması, sitokrom P-450 bağımlı 14-sterol demetilazda mutasyon, sitokrom P-450'nin hücre içi miktarının artması, azalmış sterol C5-6 saturoz aktivitesi olarak sıralanabilir (31,117).

Yeni antifungal ajanlar :

Bugün kullanımda olan antifungal ajanların esas etkileri mantar hücre membranında bulunan ergosterol üzerinden olmaktadır. Ergosterol ile konak hücreesindeki kolesterol arasındaki benzerlik tedavide sorunlara yol açmaktadır. Etkin bir antifungal ajan konak hücrelerde bulunmayan sadece mantar hücrelerinde bulunan yapıları hedef almalıdır. Mantar hücre duvarı selektif olabilecek yapıdadır, bu nedenle, son yıllarda antifungal ajan çalışmaları mantar hücre duvarına etkili olabilecek antifungaller üzerinde yoğunlaşmıştır. Tablo IV'de hücre duvarına etkili, henüz araştırma aşamasında olan antifungaller özetlenmiştir (34).

Tablo IV: Hücre duvarına etkili antifungaller

Antifungal Ajan	Etki mekanizması
Lipopeptitler	glukan sentez inhibitörleri
Ekinokadin (Silofungi, LY303366, WF1189 A,B,C)	
Papulakadin	
Pnömakadin	kitin sentez inhibitörleri
Polioksinler	
Pradimisinler	mannan sentez inhibitörleri

Tablo IV'de belirtilen antifungal ajanlar içerisinde en fazla çalışılan bir ekinokadin lipopeptit olan silofungidir. Toksikitesi çok düşük olup, klinik olarak test edilme aşamasına gelmiş, fungisidal bir ajandır (24). LY303366 ve Pnömakadin hayvan deneylerinde maya ve *Pneumocystis carinii* infeksiyonlarında etkili bulunarak klinik için ümit vermektedir. Kitin inhibitörlerinin farmakokinetikleri kötüdür. Pradimisinlerin mannana bağlanabildikleri bulunmuş ama, kesin etki mekanizması anlaşılammıştır. İlaç endüstrisindeki gelişmeler bu ilaçların etki mekanizmasının anlaşılacağı ve yeni antifungallerin bulunacağı konusunda umut vermektedir (34).

ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Son on yıldır fungal infeksiyonların insidansında artış olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle bu konudaki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Pek çok yeni antifungal ajan kullanıma girmiş ve bunların profilaksi ve tedavide kullanımları giderek artmıştır. Özellikle triazol grubu antifungal ajanların sık kullanılması sonucu, infeksiyonlarda sıklıkla rastlanan *C. albicans* yanında daha az virulan ama dirençli olan *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* gibi türlerle de kolonizasyon ve infeksiyon sıklığının arttığı bildirilmektedir. Bu gözlemler sonucunda antifungal ajanların in vitro

duyarlılıklarını ölçen testlerin önemi artmış ve buna yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (32,66,122).

İdeal bir in vitro duyarlılık testi ;

- 1- İki ya da daha fazla antifungal ajanın aktivitesinin güvenilir olarak ölçülmesini sağlayabilmeli,
- 2- İn vivo aktivite ile uyum göstermelidir ve tedavi sonucunu tahmin edebilmeli,
- 3-Normal olarak duyarlı organizma topluluğu içindeki direncin gelişiminin takibini sağlayabilmeli,
- 4- Yeni geliştirilen antifungal ajanların in vitro aktivitelerini saptayabilmelidir (86,122).

İn vitro antifungal duyarlılık testlerinin sonuçları testte kullanılan teknik, fungus ve antifungal ajanın özellikleri ile ilişkilidir. Testte kullanılan tekniğin inokulum miktarı, inkübasyon ısısı ve süresi, besiyeri, pH'ı, test sonuçlarına etki eder. Ayrıca fungusun üreme hızı, üreme koşulları; antifungal ajanın kimyasal instabilitesi, sıvı ortamlarda çözünübilirlik durumu gibi değişkenler de test sonuçları ile ilgilidir (66,122).

Buyyon makrodilüsyon:

Antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi ve standardizasyonu için 1982 yılında NCCLS tarafından bir alt komite kurularak çalışmalara başlanmış ve antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyon çalışmalarını ortak bir görüş olarak M27-P, M27-T, M27-A belgeleri ile yayınlamıştır (76,77,78). NCCLS tarafından 1992' de M27-P isimli belge ile *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için makrodilüsyon yöntemini kullanan referans bir yöntem önerilmiştir (77). 1995 yılında NCCLS M27-T geçici standardı (tentative standart) hazırlanmış ve alternatif mikrodilüsyon yöntemi bildirilmiştir (79). NCCLS standart makrodilüsyon yönteminin ayrıntıları çeşitli yayınlarda açıklanmıştır (Tablo V) (37,38,44,72,75,76).

Bir referans yöntem geliştirilmesi laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanması için gerekli olmasına karşın bu yöntem tüm fungal izolatların test

edilmesine uygun olmayabilir. Nitekim, NCCLS standart makrodilüsyon yöntemi ile ilgili teknik güçlükler ve görsel değerlendirmenin sübjektif olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda daha kolay uygulanabilecek alternatif yöntem arayışları devam etmektedir (48).

Tablo V: NCCLS M27A standart makrodilüsyon yönteminin temel prensipleri

Özellik	Standart
Yöntem*	Makrodilüsyon (son hacim 1ml)
İnokulum hazırlanması	0.5 Mcfarland bulanıklık standartına göre spektrofotometrik ölçüm ile
İnokulum konsantrasyonu	0.5-2.5X10 ³ maya hücresi/ml
Besiyeri	RPMI 1640
Tampon	Morfolinpropansülfonik asit (MOPS) 0.165M
PH	7
İnkübasyon ısısı	35°C
İnkübasyon süresi	48 saat (C. neoformans için 72 saat)
MİK duyarlılık/ dirençlilik sınırı saptanması	Amfoterisin B: Bulanıklığın görülmediği konsantrasyon Azoller ve flusitozin: Bulanıklığın %80 azaldığı konsantrasyon

Yöntem*: NCCLS M27-A(76)

Buyyon mikrodilüsyon testleri:

Çeşitli çalışmalarda makrodilüsyon yöntemine alternatif olarak, uygulaması daha kolay olan mikrodilüsyon testleri kullanılmaktadır (37,48,68,75,83).

Mikrodilüsyon testleri;

- a) Alamar mavisi yöntemi : Bir oksido- redüksiyon indikatörü olan alamar mavisi normalde mavi olup, mantarın üremesi olduğunda pembe renge dönüşür. Mavi olan son kuyucuk MİK değerini verir (83).
- b) MTT yöntemi: MTT boyası canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar tarafından indirgenerek sarı renkten mor renkli formazana dönüşür. Bu yöntemin mayaların antifungal ajanlara duyarlılığında kullanılabileceği saptanmıştır (47,68).
- c) Spektrofotometrik yöntemler: Bu yöntemde bulanıklığın kontrole göre, Amfoterisin B için %90, flukonazol için %50-70 oranında azaldığı çukurlar MİK olarak kabul edilir (69).

Mikrodilüsyon testleri ile yapılmış çalışmalarda standart yöntem ile uyumu %80-100 arasında bulunmuştur (37,47, 68, 83).

Disk Difüzyon Testi:

Antifungal ajanlarda doyurulmuş disklerin kullanıldığı bu yöntem için 106 maya/ml inokulum, kazeinli veya asparaginli yeast nitrojen glukoz agar, 37°C'de 24-48 saat inkübasyon önerilmektedir. Tam inhibisyon zonları ölçülür ve duyarlı, az duyarlı ve dirençli olarak bildirilir. Kısmi inhibisyon görülmesi nedeniyle azol grubu antifungaller için önerilmez (66). Disk diffüzyon yöntemiyle yapılmış çalışmalarda standart yöntem ile uyumu % 80 civarında bulunmuştur (9,70,95).

E test:

E test (AB Biodisk, Solna, Sweden), plastik stripler emdirilmiş antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği bir difüzyon testidir (72). Pahalı olmasına karşın, disk diffüzyon testinin kolaylıklarına sahip olması ve MİK değerlerinin belirlenmesini sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir. E test için çalışma ortamı olarak; Fosfat tamponlu RPMI 1640 agar, Morfolinopropan sulfonik asit (MOPS) tamponlu RPMI 1640 agar, Casitone agar (sadece azoler için), Antibiotic Medium 3 (sadece

Amfoterisin B için), Yeast Nitrogen Base agar , High Resolution Antifungal Assay Agar gibi farklı besiyerleri önerilmektedir. Antibiotic Medium 3 ve Casitone agar'da dirençli suşların daha iyi belirlendiği ve değerlendirilmesinin daha kolay yapıldığı saptanmıştır (5,22,90). Son yıllarda uygulaması kolay olduğu için E test çok fazla sayıda çalışmada tercih edilmekte ve standart yöntem ile uyumu %70-100 arasında olduğu bildirilmektedir (17,18,97,110,112).

Ayrıca flovitometrik analiz ve agar dilüsyon yöntemleri ve ticari kitler (Candifast, ATP fungus, Mycototal) de antifungal duyarlılığı saptamada kullanılmaktadır (26,99,60,115).



GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji A.B.D. Mikoloji Laboratuvarına vajinal kandida infeksiyonu klinik tanısıyla başvuran hastaların, vajen sürüntülerinden izole edilen 50 kandida suşu çalışma kapsamına alındı. Ayrıca standart suş olarak *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 26555, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 çalışma kapsamına alındı.

İZOLASYON ve İDANTİFİKASYON

Primer İzolasyon:

Primer izolasyon amacıyla örnekler Sabouraud's Dekstroz Agar (SDA)'a ekildi. 26°C ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Üremeler günlük olarak kontrol edildi ve 72 saat sonunda maya üremesi olmayan koloniler çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca bakteriyel vajinozdan uzaklaşmak için, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nın bulguları da değerlendirildi (63,91,106).

SDA'da genellikle 2-3 günde üreyen, hamur kıvamında, 0.5-1 mm çapında beyaz veya krem renkli, genellikle düzgün sınırlı ve kendine özgü maya kokusu olan kolonilerden gram boyama yapıldı. Saf olduğu anlaşılan kültürlerden, idantifikasyonun ileri aşamasında kullanılmak üzere yatık SDA tüplerine pasaj yapıldı (15,114). Ayrıca %15 gliserollü brain heart infusion agar'a pasaj yapıldı ve +4 °C'de saklandı.

Germ Tüp Testi:

0.5 ml insan serumu içerisine test edilecek koloniden küçük bir parça eklenip karıştırıldı. 37 °C'de 2.5-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra lamamel arası preparat hazırlanıp ışık mikroskopunda x400 büyütmede incelendi. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık olmayan filament şeklindeki yapılar germ tüpü olarak

değerlendirildi (Şekil 1). Germ tüp üreten maya kökenleri *C. albicans* olarak tanımlandı (50,63,114).

Pirinç Eksteresi- Tween 80 Agar:

% 1 Tween 80 eklenmiş pirinç ekstresi agar hazırlandı;

50 g pirinç 300 ml distile su içinde kaynatılıp bir kaç kat gazlı bezden süzüldü. 20 g agar, 20 g glukoz, 10 ml Tween 80 eklendi. Distile su ile 1 litreye tamamlandı. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanıp steril petri kutularına döküldü.

SDA'daki saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze yardımıyla bir parça alınıp birbirine paralel üç çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekimlerin, besiyerini yırtmadan ve özeyi dibe kadar batırmadan yapılmasına dikkat edildi. Her bir mayaya ait ekim işlemleri tamamlandıktan sonra ekim çizgileri üzerine steril lamel kapatıldı. 26 °C'de 72 saat inkübe edildi (15,91). İnkübasyon sonunda tüm klinik suşlar ve daha önce sözü edilen standart suşlar ışık mikroskopunda x400 büyütme ile klamidospor, blastospor, artrospor, pseudohif ve hif oluşturma özellikleri yönünden incelendi. Değerlendirmeler mayaların bu besiyerindeki mikroskopik görünümüne göre yapıldı. Pseudohiflerin uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidosporlar ile hif birleşme yerlerindeki blastospor kümeleri *C. albicans* (Şekil 2a); ağaca benzer şekilde dizilmiş uzun blastosporlar ve pseudohif *C. krusei* (Şekil 3a); pseudohif ve hif boyunca tek tek veya ufak kümeler yapacak biçimde dizilim gösteren blastosporlar *C. tropicalis* (Şekil 4a); pseudohif yapısı olmadan, ucunda tomurcuklanmalar görülen küçük oval blastosporlar *C. glabrata* (Şekil 5a) lehine değerlendirildi (30,35,63,114). Tablo VI'da, izole edilen *Candida* türlerinin SDA, Pirinç ekstresi-Tween 80 agar ve Mast ID CHROMagar *Candida*'da saptanan özellikleri özetlenmiştir (35,42,106,114).

Tablo VI: İzole edilen Candida türlerinin SDA, Pirinç ekstresi-Tween 80 agar ve Mast ID CHROMagar Candida'daki görünüşleri

Organizma	SDA'daki koloniler	Klamidospor	Blastospor ve hif	CHROMagar Candida
C. albicans	krem gibi	+	Pseudohifler boyunca düzenli aralıklarda, küremsi blastosporlar	yeşil
C. glabrata	krem gibi	—	Küçük, küremsi, birbirine sıkıca bağlanmış blastosporlar	—
C. krusei	kuru ve pürtüklü	—	Ağaca benzer şekilde dallanmış pseudohifler ve uzun blastosporlar	pembe
C. tropicalis	krem gibi	—	Pseudohif veya hif boyunca rastgele dizilmiş blastosporlar	mavi

Karbonhidrat asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi:

Mayaların karbon kaynağı olarak karbonhidratları aerobik kullanmaları oksanografik yöntem ile test edildi (15). Bunun için glukoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, rafinoz, selobiyoz, ksiloz, galaktoz, inozitol ve dulsitol ve melibiyoz emdirilmiş kağıt diskler Difco ve BBL'den hazır olarak temin edildi. Yeast Nitrogen Base Agar hazırlandı;

Yeast Nitrogen Base (Difco) 0.67 g

Agar 2 g

Distile su 100 ml

121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra petri kutularına döküldü. 5 ml'lik steril distile su içerisinde Mc Farland 1 nolu standardına eşdeğer maya suspansiyonu hazırlandı ve steril bir eküvyon yardımıyla agar yüzeyine homojen olarak sürüldü. İnokülasyondan hemen sonra karbonhidrat diskleri, aralarında 4 cm kalacak şekilde yerleştirildi. 30 °C'de 48 saat inkübe edildi ve disk çevresinde üreme olup olmadığı kontrol edildi. Üreme zonu varlığı karbonhidratın asimilasyonunu gösterirken, üremenin olmaması şekerin asimile edilemediğini ortaya koydu (Şekil 6) (15,114).

API 20C AUX Maya İdentifikasyon Sistemi:

Hızlı identifikasyon için ticari kitlerden API 20C AUX (bioMerieux, France) kullanıldı. API 20C AUX 19 karbonhidrat asimilasyon testinin hazırlandığı 20 mikrokuyucuk içerir. Test edilen karbonhidratlar: glukoz, gliserol, 2-keto-D-Glukonat, L-Arabinoz, D-ksiloz, ADOnitol, ksilitol, galaktoz, inozitol, sorbitol, α -Metil-D-Glukosid, asetil-D-Glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur. Mayalar inoküle edildikleri mikro kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorlarsa, o kuyucukta üreme olur. API 20C AUX'la mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri, 24., 48. ve 72. saatte değerlendirilerek sonuç verilir.

Testin uygulanması:

1. Stripin hazırlanması: İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu, strip paketi açılarak kabın içine yerleştirildi.
2. İnokülasyon: SDA'daki 24 saatlik kandida kolonilerinden steril bir öze ile alınarak, 2 ml'lik Suspension Medium (%0.85 NaCl) içinde karıştırılarak, yoğunluğu 2 McFarland'a ayarlandı. Bu süspansiyondan kit içeriğinde olan 100 μ l C Medium içine ve 1 damla RAT Medium içine aktarıldı. Steril bir pipet kullanılarak, C Medium'daki süspansiyondan strip içindeki kuyucuklara dolacak, fakat taşmayacak şekilde dağıtıldı. Strip inkübasyon kabının içine yerleştirilip, kapağı kapatıldı. 30 °C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. RAT medium'daki süspansiyon hif oluşumu için, kullanıldı.
3. Stripin okunması: Bulanıklık olan kuyucuklarda üreme pozitif kabul edildi. Negatif kontrolde üremenin olmamasına dikkat edildi. Özellikle glukoz kuyucuğunda belirgin üreme yoksa inkübasyon süresi 24 saatten 72 saate kadar uzatıldı. Üreme olan kuyucuklar not edildi.
4. İdentifikasyon: Bunun için, test prosedürüne göre, pozitif kuyucuklara değerlendirme cetvelinde 1, 2, 4 gibi numaralar verildi. Her bir grup içindeki sayılar toplandı ve sayısal profil elde edildi. Hif oluşumu için de 4 sayı eklendi. Elde edilen sayısal profil, API 20C AUX Analytical Profile Index'e göre değerlendirildi (API 20C AUX, bioMerieux, France kit prosedürü).

Kromojenik Besiyeri:

Kromojenik besiyerlerinden MAST ID- CHROMagar Candida kullanıldı (Mast Diagnostics, United Kingdom) .

MAST ID- CHROMagar Candida'nın içeriği;

Pepton	10 gr/l
Kromojenik substrat	22 gr/l
Kloramfenikol	0.5 gr/l
Agar	15 gr/l

Kit prosedürüne göre içerik üzerine 100 ml distile su eklendi ve Benmaride kaynama derecesinde tamamen çözülünceye kadar karıştırılarak bekletildi. Daha sonra soğumaya bırakıldı (50 °C'nin altına düşürülmeden). Homojenizasyon için tekrar karıştırıldı ve petrilere döküldü (Hazırlanan besiyeri + 4 °C'de 2 hafta veya oda ısısında 1 gün saklanabilir). Besiyerine maya kolonileri ekildikten sonra 24-48 saat 37 °C'de inkübe edildi. Optimum renk 48 saat sonra oluştu. Yeşil renkli koloniler *C. albicans* (Şekil 2b); açık pembe renkte düzensiz kenarları olan basık koloniler *C. krusei* (Şekil 3b); mavi renkli koloniler *C. tropicalis* (Şekil 4b) lehine değerlendirilirken; mor renkli küçük koloniler (Şekil 5b) ise değerlendirilemedi (MAST ID- CHROMagar Candida, kit prosedürü).

ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol'e karşı antifungal duyarlılığı NCCLS tarafından önerilen makrodilüsyon yöntemi ve E test ile araştırıldı (17,18,76,110).

Makrodilüsyon yöntemi:

Yöntem NCCLS önerileri doğrultusunda hazırlandı ve uygulandı (37,47,76) .

Antifungal ajanlar:

Amfoterisin B (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), ketokonazol (Bilim ilaçları AŞ, İstanbul ,Türkiye), flukonazol (Pfizer ilaçları AŞ, İstanbul, Türkiye)'un saf etken maddeleri kullanıldı. Flukonazol'ün 5120 µg/ml'lik stok solüsyonu steril distile su içinde, ketokonazol ve amfoterisin B'nin 1600µg/ml'lik stok solüsyonları dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) içinde çözülerek hazırlandı. Filtre edilerek, küçük porsiyonlara bölündü ve -70 °C'de kullanılıncaya kadar, saklandı. amfoterisin B solüsyonunun ışıktan korunmasına özen gösterildi (76).

Besiyeri hazırlama:

Besiyeri olarak RPMI 1640 (L glutaminli, fenol kırmızısı indikatörü içermeyen) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) kullanıldı. 900 ml distile suda 10.4 gr toz besiyeri eritildi ve tampon madde olarak 34.53 gr MOPS (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) eklendi. Besiyerinin homojenizasyonu sağlandıktan sonra, oda ısısında 1 M NaOH ile besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlandı. Distile su ile son hacim 1lt'ye tamamlandı. Besiyeri filtre ile steril edildi ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı (37,76).

İlaç sulandırımı:

Suda çözünen flukonazol'ün stok solüsyonundan, hazırlanan besiyeri ile dilüe edilerek, son konsantrasyon 64- 0.125µg/ml'nin 10 katı olan 640-1.25 µg/ml dilüsyonlar hazırlandı. DMSO'da çözünen amfoterisin B ve ketokonazol'ün stok solüsyonlarından, DMSO ile dilüe edilerek, son konsantrasyon 16- 0.0313 µg/ml'nin 100 katı olan 1600- 3.13 µg/ml dilüsyonlar hazırlandı. Daha sonra DMSO'daki dilüsyonlar besiyeri ile 1/10 oranında dilüe edilerek son konsantrasyonun 10 katı olan ilaç dilüsyonları elde edildi (76).

Maya süspansiyonlarının hazırlanması:

Test edilecek izolatlarının iki kez SDA'ya pasajları yapıldı. Her izolatın SDA'daki 24 saatlik kültüründen yaklaşık 1mm çaplı kolonilerinden 5-7 tane alınarak, 5ml steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonu hazırlandı. Bu

süspansiyonun bulanıklığı, spektrofotometrik olarak 530 nm'de Mc Farland 0.5 standardının bulanıklığına ayarlandı.. Daha sonra maya süspansiyonu 1:2000 oranında seyreltildi (37,76).

İnokülasyon işlemi:

Son konsantrasyonun 10 katı olacak şekilde hazırlanan ilaç solüsyonundan 0.1ml steril, polistren, kapaklı tüpler içerisine konarak üzerine 0.9ml maya süspansiyonu ilave edildi. İlaç içermeyen mikroorganizma kontrol ve maya süspansiyonu içermeyen besiyeri kontrol tüpleri de hazırlandı (76).

İnkübasyon ve MİK değerlerinin saptanması:

35 °C'de 48 saat inkübe edildi. Mikroorganizma kontrolünde üreme olduğu ve besiyeri kontrolünde üreme olmadığı tespit edildikten sonra, MİK değerleri NCCLS'in önerdiği kriterlere göre saptandı. Amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak tespit edildi (76). Azoller için üremeyi %80 inhibe eden konsantrasyon MİK 80 belirlendi. MİK 80 değerini belirlerken mikroorganizma kontrol tüpünden 0.2 ml alınarak 0.8 ml besiyeri ile (1/5 oranında) karıştırıldı. Test tüplerinin bulanıklığı bu tüple karşılaştırılarak MİK değerleri belirlendi (37,76).

E test:

Antifungal ajanlar:

Bu yöntemde E test antifungal (amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol) şeritleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) kullanıldı. Konsantrasyon aralığı amfoterisin B ve ketokonazol için; 0.002-32 µg/ml, flukonazol için ise; 0.016-256 µg/ml, idi. E test şeritleri kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Besiyeri:

Besiyeri olarak RPMI 1640 (L glutaminli, fenol kırmızısı indikatörü içermeyen) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) ve Casitone agar (Biomedical Diagnostics S.A, France) kullanıldı. RPMI 1640'ın hazırlanmasında ve

kullanılmasında E test şartlarını sağlayan firmanın prosedürlerinden yararlanıldı (E test technical guide 4, E test technical guide 4b; AB Biodisk, Solna, Sweden).

MOPS tamponlu RPMI 1640 hazırlanması:

-34.53 gr MOPS 1lt distile suda çözüldü (0.165M).

-Bacto agar 15g, 0.165M MOPS 450ml ilave edilip, eritildi ve 1M NaOH ile pH 7.0' a getirildi. Hacim buffer ile 500ml'e tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

-RPMI 1640 10.4 g, glukoz 18 g, 0.165 M MOPS 450 ml ilave edilip, eritildi ve 1M NaOH ile pH 7.0'a getirildi. Hacim buffer ile 500 ml'e tamamlandı. 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

-İki solüsyon karıştırılıp, 90 mm'lik petrilere döküldü.

-Bütün antifungal ajanlar için kullanıldı.

Fosfat tamponlu RPMI 1640 hazırlanması:

-0.2M 1litre fosfat buffer hazırlanıp, pH 7.0'a getirildi.

- Bacto agar 15g, 0.2 M fosfat buffer 450 ml ilave edilip, eritildi ve 1M NaOH ile pH 7.0' a getirildi. Hacim buffer ile 500 ml'e tamamlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

-RPMI 1640 10.4 g, glukoz 18 g, 0.2 M fosfat buffer 450 ml ilave edilip, eritildi ve 1M NaOH ile pH 7.0' a getirildi. Hacim buffer ile 500 ml'e tamamlandı. 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

-İki solüsyon karıştırılıp, 90mm'lik petrilere döküldü.

-Sadece azoller için kullanıldı.

Casitone agar hazırlanması:

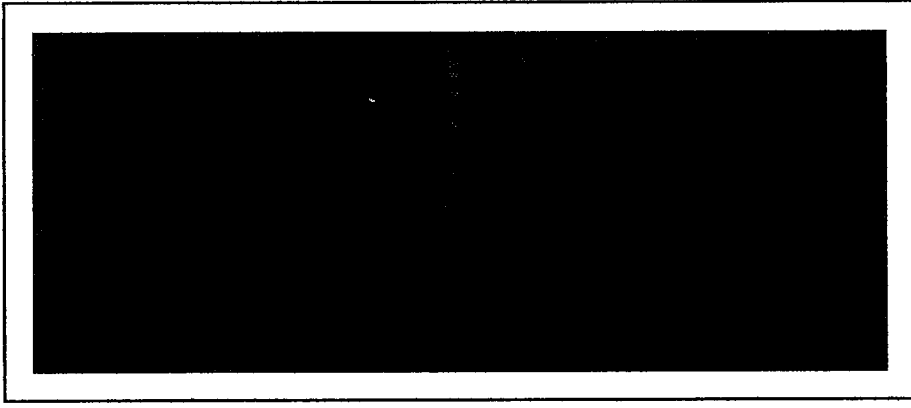
Casitone agar (Biomedical Diagnostics) Benmari'de kaynama derecesinde eriyinceye kadar bekletildi ve 45-50 °C'ye kadar soğutulup, 90mm'lik petrilere döküldü. Sadece azoller için kullanıldı.

Test prosedürü:

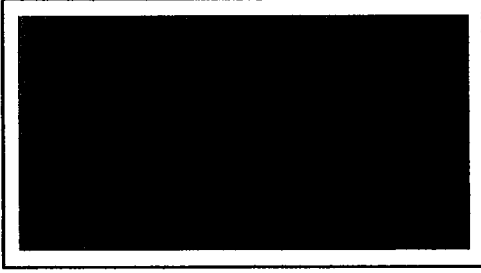
Test edilecek maya izolatlarının iki kez SDA'ya pasajları yapıldı. Her izolatın SDA'daki 24 saatlik kültüründen yaklaşık 1mm çaplı kolonilerinden 5-7 tane alınarak, 5ml steril serum fizyolojik içinde homojen maya süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyonun bulanıklığı, spektrofotometrik olarak 530 nm'de Mc Farland 0.5 standardının bulanıklığına ayarlandı. Steril bir eküvyonla maya süspansiyonundan alınıp, besiyeri üzerine yayıldı. 10-15 dakika içinde E test şeritleri özel aplikatörü yardımıyla her petride iki tane olacak şekilde yerleştirildi. 35 °C'de inkübasyondan sonra, MİK değerleri 24 saat sonunda değerlendirildi. Oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun şerit ile kesiştiği noktada belirtilen konsantrasyon amfoterisin B için MİK değeri olarak kabul edildi (% 95-100 inhibisyon). Azollerde, amfoterisin B kadar net zonlar oluşmadığı için % 80 inhibisyonun olduğu nokta MİK değeri olarak kabul edildi. (E test technical guide 4, E test technical guide 4b). Casitone agarda, azollerde daha net zonlar oluştu (Şekil 7a,7b).

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

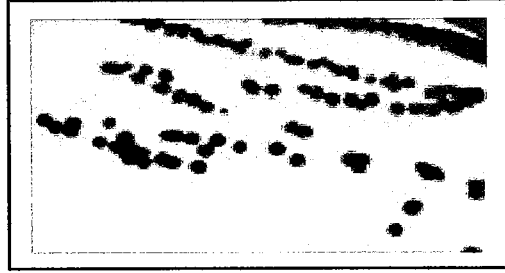
Tiplendirme için kullanılan, MAST ID- CHROMagar Candida'nın ve API 20C AUX' un duyarlılığı ve özgüllüğü hesaplandı. E test yöntemi ile antifungal duyarlılığın saptanmasında kullanılan farklı ortamların karşılaştırılmasının istatistiksel değerlendirilmesinde varyans analizi yöntemi kullanıldı. E test ve makrodilüsyon yöntemlerinin uyumunu değerlendirmek için; E test ile belirlenen MİK değeri, makrodilüsyon yönteminde çift kat sulandırım ile elde edilen MİK değerlerinden farklı bir ara değer olduğunda, şerit üzerindeki skaladaki bir üst çift kat sulandırım değerine yuvarlandı. İki kattan farklı olmayan (± 1 dilüsyon) MİK değerleri eşit kabul edildi. Ayrıca amfoterisin B ve ketokonazol için E test ile belirlenen 0,03 $\mu\text{g/ml}$ 'den küçük MİK değerleri 0,03 $\mu\text{g/ml}$, 16'tan büyük MİK değerleri ise 16 $\mu\text{g/ml}$; flukonazol için E test ile belirlenen 0,125 $\mu\text{g/ml}$ 'den küçük MİK değerleri 0,125 $\mu\text{g/ml}$, 64'ten büyük MİK değerleri ise 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak kabul edildi (5,18). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde regresyon analizi yöntemi kullanıldı (37).



Şekil 1.Germ tüp oluşumu.



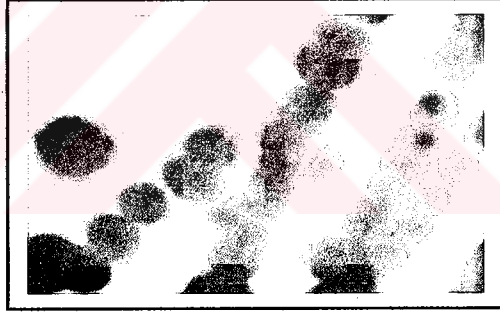
Şekil 2a.C. albicans,Pirinç ekstresi-Tween 80 agarda pseudohif ve klamidosporlar.



Şekil 2b.C.albicans,Mast ID CHROMagar Candida'da yeşil renkli koloniler.



Şekil 3a.C.krusei, Pirinç ekstresi-Tween 80 agarda pseudohif ve uzun blastosporlar.



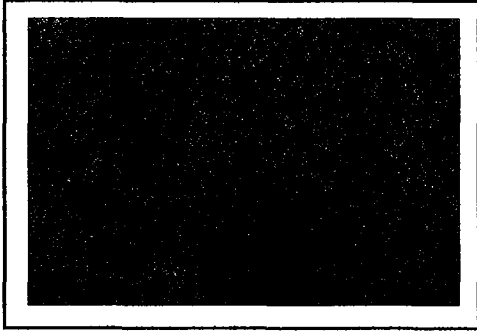
Şekil 3b.C.krusei, Mast ID CHROMagar Candida'da pembe renkli koloniler.



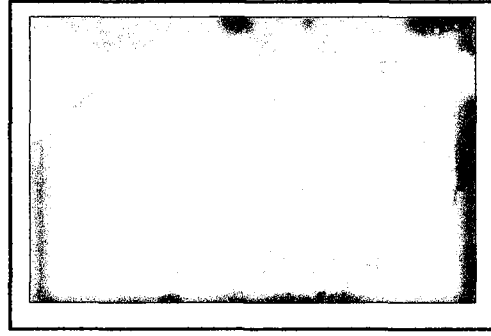
Şekil 4a.C. tropicalis, Pirinç ekstresi Tween 80 agarda pseudohif ve blastosporlar.



Şekil 4b.C. tropicalis, Mast ID CHROMagar Candida'da mavi renkli koloniler.



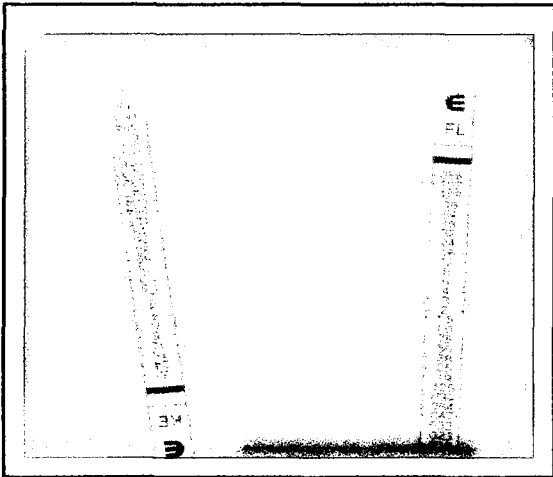
Şekil 5a.C.glabrata, Piriç ekstresi-Tween 80 agarda küçük oval blastosporlar.



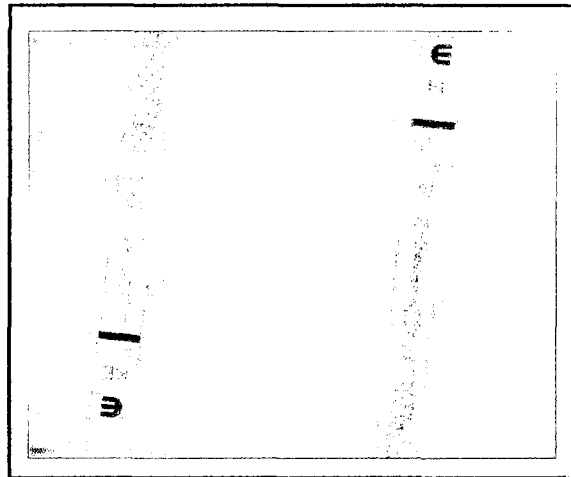
Şekil 5b.Diğer kökenler, Mast ID CHROMagar Candida'da mor renkli koloniler.



Şekil 6.Karbonhidrat asimilasyon testi.



Şekil 7a. Etest yönteminde ketokonazol MİK=0.5µg/l flukonazol MİK=256µg/l



Şekil 7b.E test yönteminde ketokonazol MİK=0.023 µg/l, flukonazol MİK=1µg/l

BULGULAR

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin identifikasyon sonuçları:

Vajinal sürüntülerden izole edilen 50 *Candida* kökeninin klasik yöntemlerle (Pirinç ekstrelü -Tween 80 agar, germ tüp, karbonhidrat asimilasyon) identifiye edilmesi sonucu, bunlardan 34'ü *C. albicans* (%68), 9'u *C. krusei* (%18), 5'i *C. tropicalis* (%10), 2'si *C. glabrata* (%4) olarak değerlendirildi. 34 *C. albicans* suşunun 31'inin (%91.2) germ tüp oluşturduğu saptandı. Yalancı pozitiflik saptanmadı.

Klasik yöntemler ile saptanan *Candida* türlerinin dağılımı tablo VII'de sunuldu.

Tablo VII: Klasik yöntemler ile saptanan *Candida* türlerinin dağılımı

Candida türü	sayı	%
<i>C. albicans</i>	34	68
<i>C. krusei</i>	9	18
<i>C. tropicalis</i>	5	10
<i>C. glabrata</i>	2	4
TOPLAM	50	100

Ticari kitlerden API 20C AUX ile çalışmaya alınan 50 *Candida* kökeninin 49 (% 98)'u doğru olarak identifiye edildi. API 20C AUX ile 9 *C. krusei* kökeninin 8'i doğru olarak saptanırken, 1'i *C. zeylanoides* olarak saptandı (duyarlılık=88,9; özgüllük=100,0). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* kökenlerinin hepsi klasik yöntemlerle % 100 uyumlu olarak saptandı. MAST ID- CHROMagar *Candida* da ise 50 *Candida* kökeninin 48 (% 96)'i doğru olarak identifiye edildi. 34 *C. albicans* kökeninin 33'ü doğru olarak saptanırken, 1'i *C. tropicalis* olarak saptandı. 1 de yalancı pozitiflik bulundu (duyarlılık=97,0; özgüllük=93,7). 5 *C. tropicalis* kökeninin ise 4'ü doğru olarak saptanırken, 1'i *C. albicans* olarak saptandı. 1 de yalancı pozitiflik bulundu (duyarlılık=80,0; özgüllük=97,8). *C. krusei* kökenlerinin ise hepsi klasik yöntemlerle %100 uyumlu olarak saptandı. *C. glabrata* kökenleri ise identifiye edilemedi. Sonuçlar toplu halde tablo VIII'de sunuldu.

Tablo VIII: API 20C AUX ve MAST ID- CHROMagar Candidanın klasik yöntemler ile karşılaştırılması

Candida türü	Klasik	Api 20C AUX		MAST ID- CHROM agar			
	n	n	d (%)	ö (%)	n	d (%)	ö (%)
C. albicans	34	34	100	100	34	97	93,7
C. krusei	9	8	88,9	100	9	100	100
C. tropicalis	5	5	100	100	5	80	97,8
C. glabrata	2	2	100	100	-	-	-

d: duyarlılık, ö: özgüllük

Çalışmaya alınan Candida kökenlerinin antifungal duyarlılık sonuçları:

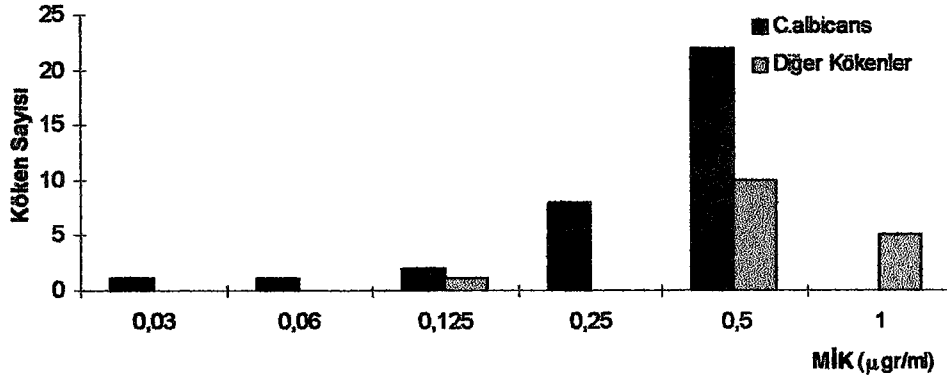
Çalışmaya alınan Candida kökenlerinin makrodilüsyon ve farklı ortamlarda E test ile saptanan amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol duyarlılıklarının MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri tablo IX' da sunuldu.

Tablo IX: C. albicans ve diğer kökenlerin makrodilüsyon ve E test yöntemleriyle saptanan antifungal duyarlılıklarının MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri (µg/ml).

Antifungal	Yöntem	C. albicans			Diğer kökenler			Tüm kökenler			
		Besiyeri	MİK aralığı	MİK50	MİK 90	MİK aralığı	MİK 50	MİK 90	MİK aralığı	MİK 50	MİK 90
AmfoterisinB	S	MOPS/RPMMII640	0,03-0,5	0,5	0,5	0,125-1	0,5	1	0,03-1	0,5	0,5
	E test	MOPS/RPMMII640	0,03-0,5	0,5	0,5	0,09-1	0,5	1	0,03-1	0,5	0,5
Flukonazol	S	MOPS/RPMMII640	0,125-2	0,5	1	1-64	64	64	0,125-64	0,5	64
	E test	MOPS/RPMMII640	0,125-2	0,5	2	1-256	64	256	0,125-256	1	64
Ketokonazol	S	Fostat/ RPMMII640	0,125-2	0,25	1	0,125-64	16	64	0,125-64	0,25	64
	E test	Casitone	0,125-8	0,5	1	0,125-256	32	256	0,125-256	0,75	64
Ketokonazol	S	MOPS/RPMMII640	0,03-0,125	0,03	0,125	0,03-0,5	0,125	0,5	0,03-0,5	0,03	0,125
	E test	MOPS/RPMMII640	≤0,03-0,5	0,03	0,125	≤0,03-0,5	0,125	0,5	≤0,03-0,5	0,03	0,125
Ketokonazol	S	Fostat/ RPMMII640	≤0,03-0,125	0,02	0,03	≤0,03-0,25	0,125	0,125	≤0,03-0,25	0,03	0,125
	E test	Casitone	≤0,03-0,5	0,02	0,125	≤0,03-0,5	0,25	0,5	≤0,03-0,5	0,03	0,5

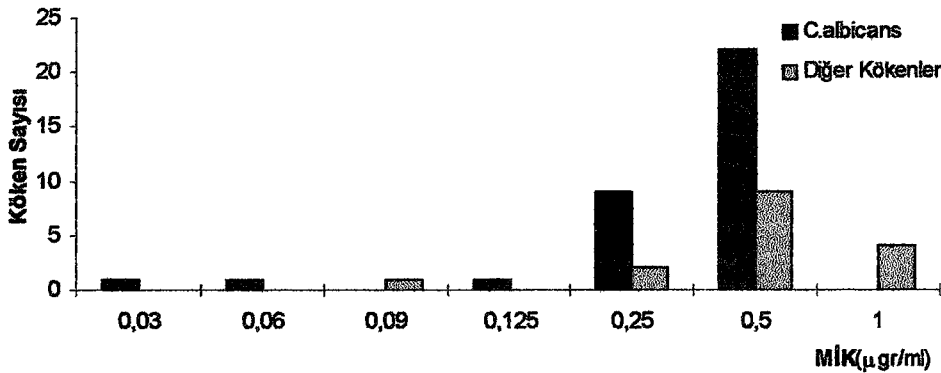
S=Standart Makrodilüsyon Yöntemi

Amfoterisin B' ye karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında makrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 1'inde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 2'sinde 0,125 µg/ml, 8'inde 0,25 µg/ml, 22' sinde 0,5µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,125µg/ml, 10'unda 0,5µg/ml, 5'inde 1µg/ml saptandı (Şekil 8).



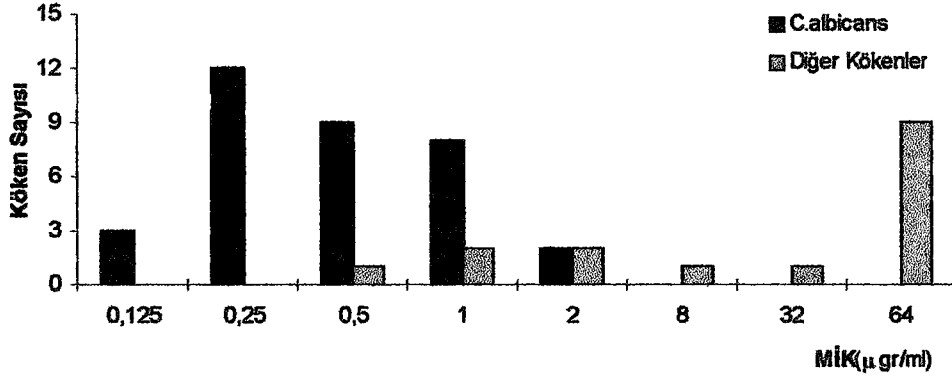
Şekil 8. *C.albicans* ve diğer Kökenlerde Makrodilüsyon Yöntemiyle Amfoterisin B'nin MİK Dağılımı

Amfoterisin B' ye karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle MOPS tamponlu RPMI 1640 besiyerinde saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 1'inde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 1'inde 0,125 µg/ml, 9'unda 0,25µg/ml, 22' sinde 0.5 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,09 µg/ml, 2'sinde 0,25 µg/ml, 9'unda 0,5 µg/ml, 4'ünde 1µg/ml saptandı (Şekil 9).



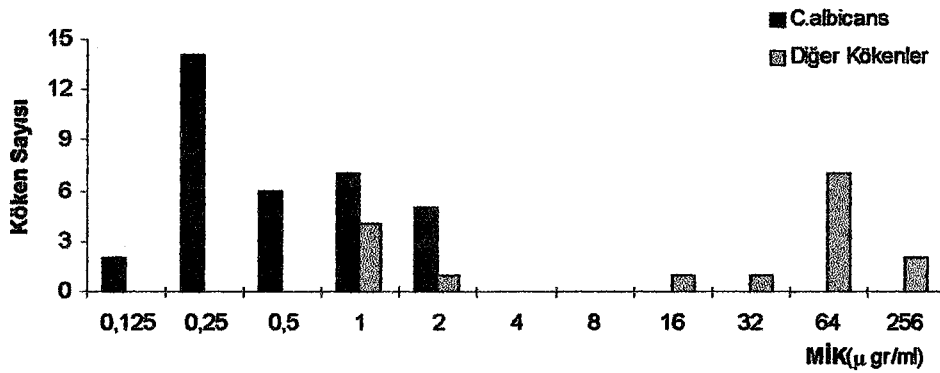
Şekil 9. *C.albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Amfoterisin B'nin MİK Dağılımı

Flukonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında makrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 3'ünde 0,125 µg/ml, 12'sinde 0,25 µg/ml, 9'unda 0,5µg/ml, 8'inde 1µg/ml, 2'sinde 2 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,5µg/ml, 2'sinde 1µg/ml, 2'sinde 2 µg/ml, 1'inde 8 µg/ml, 1'inde 32 µg/ml, 9'unda 64 µg/ml saptandı (Şekil 10).



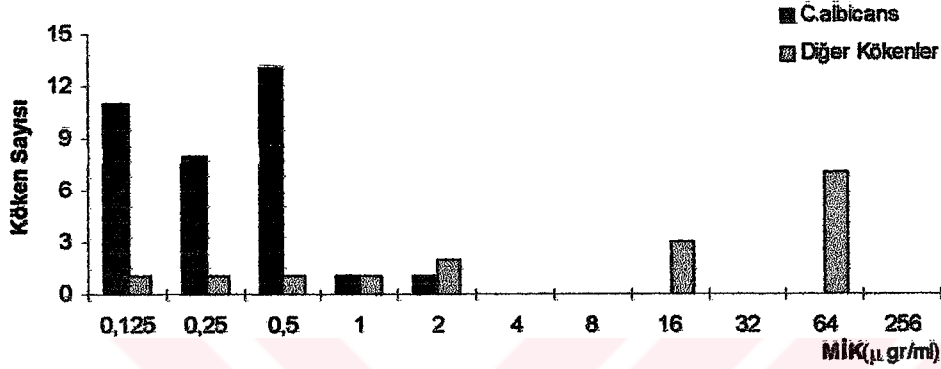
Şekil 10. *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde Makrodilüsyon Yöntemiyle Flukonazol'ün MİK Dağılımı

Flukonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle MOPS tamponlu RPMI 1640 besiyerinde saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 2'sinde 0,125 µg/ml, 14'ünde 0,25 µg/ml, 6'sında 0,5 µg/ml, 7'sinde 1µg/ml, 5'inde 2 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 4'ünde 1µg/ml, 1'inde 2 µg/ml, 1'inde 16 µg/ml, 1'inde 32 µg/ml, 7'sinde 64 µg/ml, 2'sinde 256 µg/ml saptandı (Şekil 11).



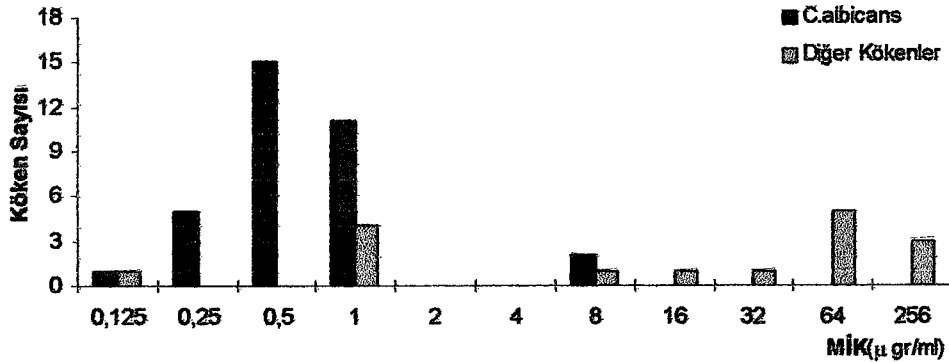
Şekil 11. *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Flukonazol'ün MİK Dağılımı

Flukonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle Fosfat tamponlu RPMI 1640 besiyerinde saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 11'inde 0,125 µg/ml, 8'inde 0,25 µg/ml, 13'ünde 0,5 µg/ml, 1'inde 1µg/ml, 1'inde 2 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,125 µg/ml, 1'inde 0,25 µg/ml, 1'inde 0,5 µg/ml, 1'inde 1µg/ml, 2'sinde 2 µg/ml, 3'ünde 16 µg/ml, 7'sinde 64 µg/ml saptandı (Şekil 12).



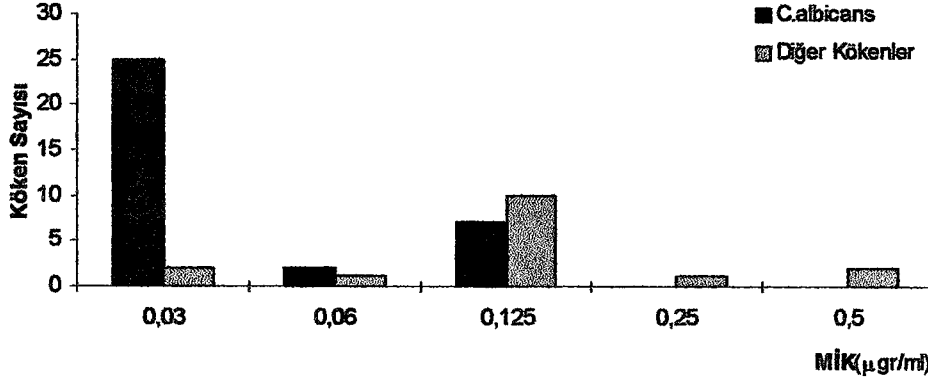
Şekil 12. *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (Fosfat-RPMI 1640) Yöntemiyle Flukonazol'ün MİK Dağılımı

Flukonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle Casitone agarda saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 1'inde 0,125 µg/ml, 5'inde 0,25 µg/ml, 15'inde 0,5 µg/ml, 11'inde 1µg/ml, 2'inde 8 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,125 µg/ml, 4'ünde 1µg/ml, 1'inde 8 µg/ml, 1'inde 16 µg/ml, 1'inde 32 µg/ml, 5'inde 64 µg/ml, 3'sünde 256 µg/ml saptandı (Şekil 13).



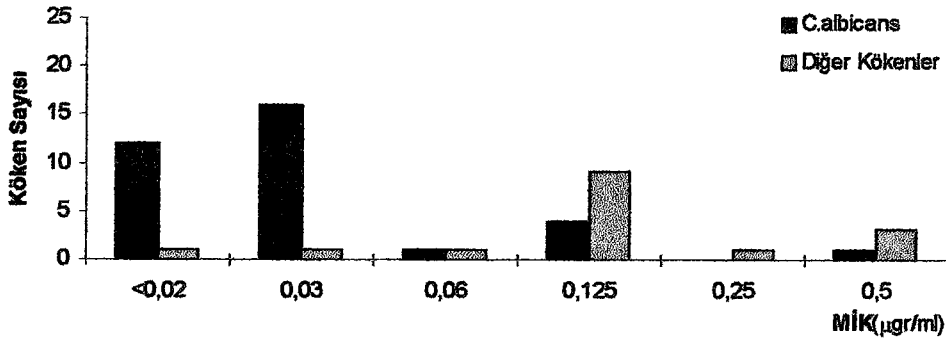
Şekil 13. *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (Casitone) Yöntemiyle Flukonazol'ün MİK Dağılımı

Ketokonazol'e karşı *in vitro* duyarlılığın araştırılmasında makrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 25'inde 0,03 µg/ml, 2'sinde 0,06 µg/ml, 7'sinde 0,125 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 2'inde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 10'unda 0,125µg/ml, 1'inde 0,25µg/ml, 2'inde 0,5µg/ml saptandı (Şekil 14).



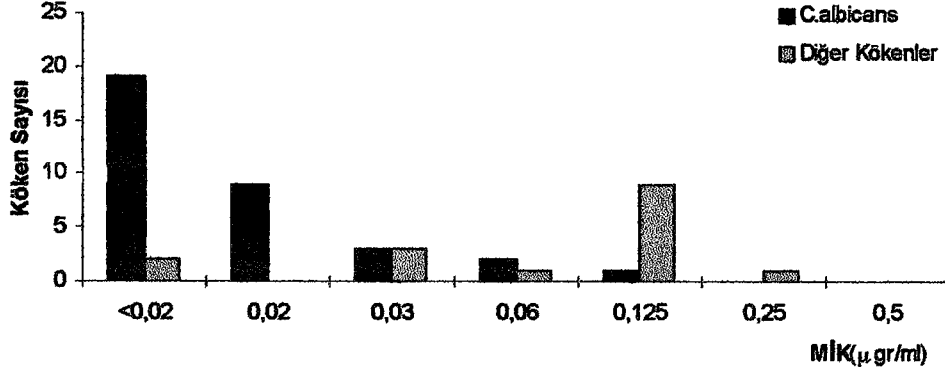
Şekil 14. *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde Makrodilüsyon Yöntemiyle Ketokonazol'ün Dağılımı

Ketokonazol'e karşı *in vitro* duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle MOPS tamponlu RPMI 1640 besiyerinde saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 12'sinde <0,02 µg/ml, 16'sında 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 4'ünde 0,125 µg/ml, 1'inde 0,5µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde <0,02 µg/ml, 1'inde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 9'unda 0,125µg/ml, 1'inde 0,25µg/ml, 3'ünde 0,5µg/ml saptandı (Şekil 15).



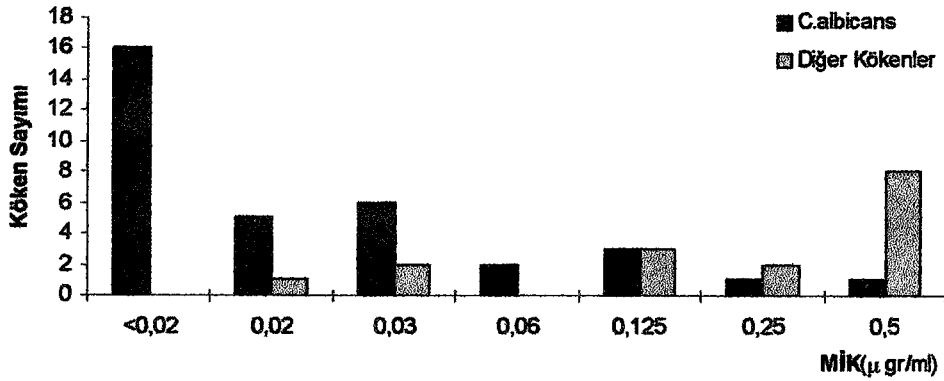
Şekil 15 *C. albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Ketokonazol'ün MİK Dağılımı

Ketokonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle Fosfat tamponlu RPMI 1640 besiyerinde saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 19'unda <0,02 µg/ml, 9'unda 0,02 µg/ml, 3'ünde 0,03 µg/ml, 2'sinde 0,06 µg/ml, 1'inde 0,125 µg/ml iken, diğer kökenlerde; 2'sinde <0,02 µg/ml, 3'ünde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 9'unda 0,125µg/ml, 1'inde 0,25µg/ml saptandı (Şekil 16).



Şekil.16 *C.albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (Fosfat-RPMI 1640) Yöntemiyle Ketokonazol'ün MİK Dağılımı

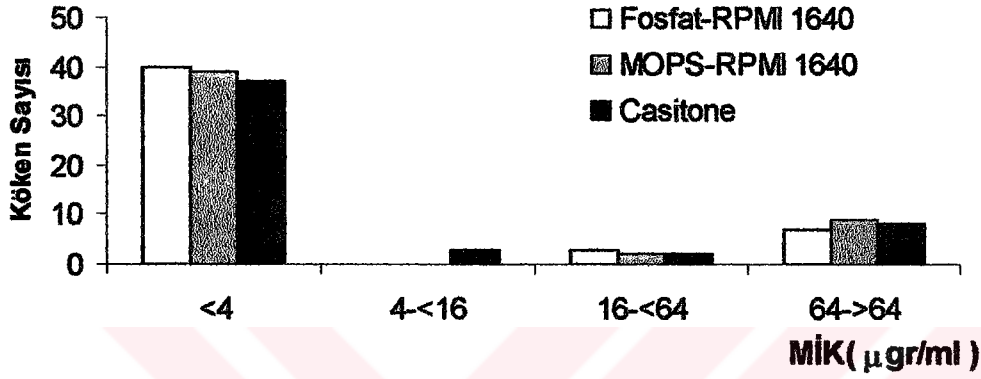
Ketokonazol'e karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında E test yöntemiyle Casitone agarda saptanan MİK değerleri *C. albicans* kökenlerinde; 16'sında <0,02 µg/ml, 5'inde 0,02 µg/ml, 6'sında 0,03 µg/ml, 2'sinde 0,06 µg/ml, 3'ünde 0,125 µg/ml, 1'inde 0,25µg/ml, 1'inde 0,5µg/ml iken, diğer kökenlerde; 1'inde 0,02 µg/ml, 2'sinde 0,03 µg/ml, 1'inde 0,06 µg/ml, 3'ünde 0,125µg/ml, 2'sinde 0,25µg/ml, 8'inde 0,5µg/ml saptandı (Şekil 17).



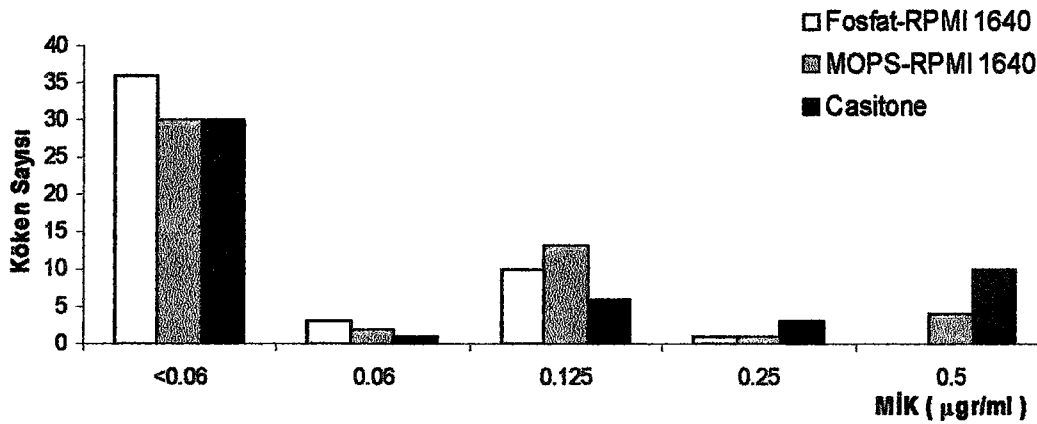
Şekil 17. *C.albicans* ve Diğer Kökenlerde E Test (Casitone) Yöntemiyle Ketokonazol'ün MİK Dağılımı

E testinde kullanılan besiyerlerinin karşılaştırılması:

Çalışmaya alınan Candida kökenlerinin flukonazol ve ketokonazol karşı in vitro duyarlılığı E testi ile MOPS tamponlu RPMI 1640, Fosfat tamponlu RPMI 1640 ve Casitone Agarda çalışılmıştır. Candida kökenlerinde üç farklı ortamda E test yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin dağılımının karşılaştırılması flukonazol için şekil 18’de, ketokonazol için şekil 19’da sunuldu.



Şekil 18. Candida Kökenlerinde Üç Farklı Ortamda E Test Yöntemi ile Flukonazol'ün MİK Dağılımının karşılaştırılması



Şekil 19. Candida Kökenlerinde Üç Farklı Ortamda E Test Yöntemi ile Ketokonazol'ün MİK Dağılımının Karşılaştırılması

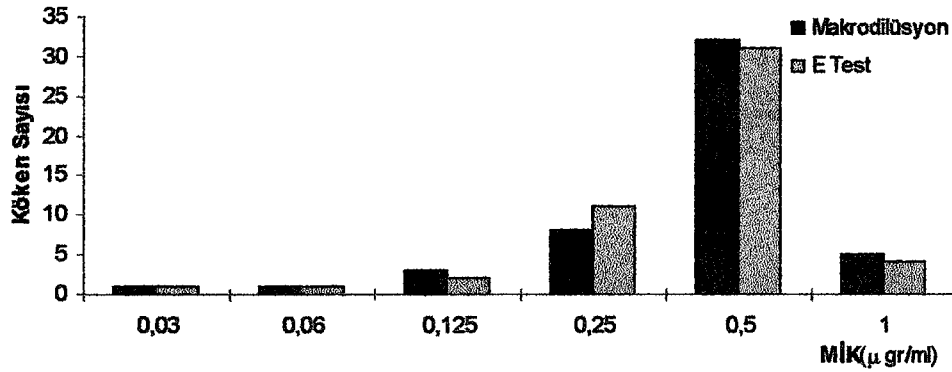
Flukonazol ve ketokonazol için, üç ortamda elde edilen ortalama MİK değerleri karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo X).

Tablo X: Candida kökenlerinin flukonazol ve ketokonazol duyarlılığının E testi ile üç farklı ortamda saptanan ortalama MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$).

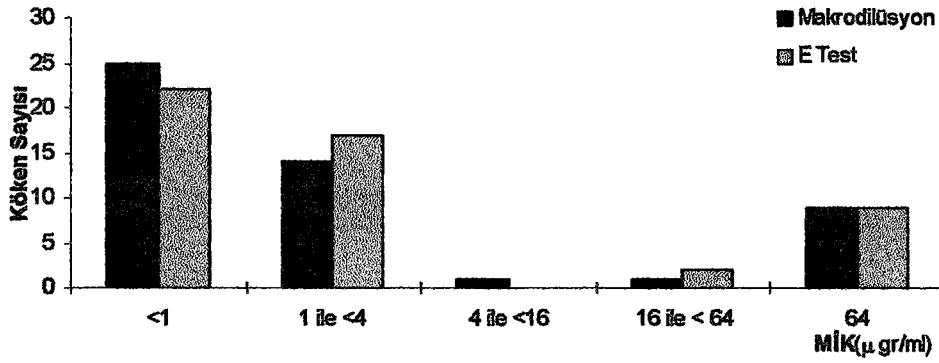
Antifungal	Besiyeri	ortalama MİK($\mu\text{g/ml}$)
Flukonazol	MOPS / RPMI 1640	12,60± 3,3
	Fosfat/ RPMI 1640	12,04± 3,3
	Casitone	12,51± 3,3
Ketokonazol	MOPS / RPMI 1640	0,01±0,02
	Fosfat/ RPMI 1640	0,06±0,01
	Casitone	0,14±0,03

E testi Yönteminin Standart Makrodilüsyon Yöntemi ile Uyumu:

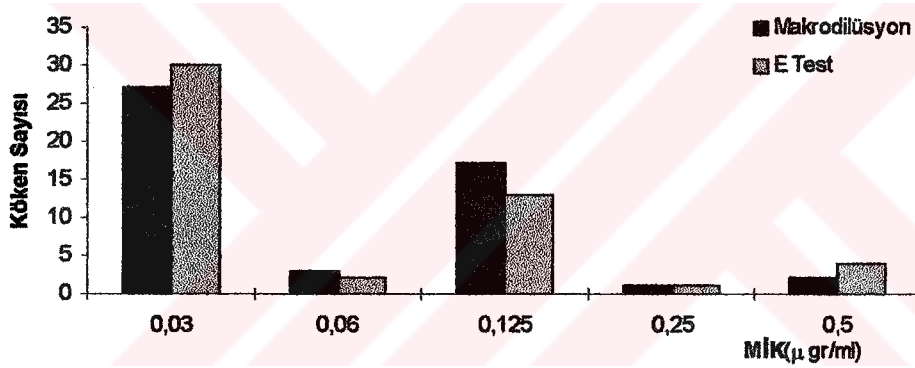
Çalışmaya alınan 50 Candida kökeninin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol in vitro duyarlılıklarında E test yöntemiyle saptanan MİK değerleri makrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri ile karşılaştırıldı (Şekil 20- 22).



Şekil 20. Candida Kökenlerinde Makrodilüsyon ve E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Amfoterisin B'nin MİK Dağılımı



Şekil 21. Candida Kökenlerinde Makrodilüsyon ve E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Flukonazol'ün MIK Dağılımı



Şekil 22. Candida Kökenlerinde Makrodilüsyon ve E Test (MOPS-RPMI 1640) Yöntemiyle Ketokonazol'ün MIK Dağılımı

E testi yönteminin standart makrodilüsyon ile uyumunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi regresyon analizi ile yapıldı. Buna göre, amfoterisin B için, standart makrodilüsyon yöntemi ile E testinin uyumu %84; flukonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640 besiyerinde %97, Fosfat tamponlu RPMI 1640 besiyerinde %90, Casitone agarda %90; ketokonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640 besiyerinde %78, Fosfat tamponlu RPMI 1640 besiyerinde %79 Casitone agarda % 60 olarak bulundu. Sonuçlar tablo XI'de sunuldu.

Tablo XI: Candida kökenlerinin in vitro antifungal duyarlılığının saptanmasında kullanılan E test yönteminin standart makrodilüsyon yöntemi ile uyumu.

Antifungaller	E testi	Standart Makrodilüsyon MİK değeri ile uyumu (%)
Amfoterisin B	MOPS / RPMI 1640	84
Flukonazol	MOPS / RPMI 1640	97
	Fosfat/ RPMI 1640	90
	Casitone	90
Ketokonazol	MOPS / RPMI 1640	78
	Fosfat/ RPMI 1640	79
	Casitone	60

TARTIŞMA

Özellikle immün sistemi baskılanmış olan kişilerde fırsatçı infeksiyonlara yol açan kandidalar eksojen olarak doğada ve endojen olarak mikroflorada yaygın olarak bulunurlar (35,114). Mikrobiyolojik ve biyokimyasal yönden komplike bir yapıya sahip olan vajen florasında da önemli bir yer tutarlar (58,62). Normal vajen florasındaki kandidaların çeşitli nedenlerle patojen hale geçmesiyle oluşan vajinal kandida infeksiyonları sık rastlanan klinik tablolardan biridir. Kültürde izole edilen kandidaların klinik olarak anlam ifade edebilmesi için, klinik bulguların olması veya aynı örnekten birden fazla sayıda aynı türün izole edilmesi gerekmektedir (114). Bu da, fungal kültür için laboratuvara teslim edilen örneklerden elde edilen kandidaların tümünün tür düzeyinde idantifiye edilerek bildirilmesi zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, tür düzeyinde idantifikasyon son yıllarda infeksiyon etkeni olarak tedaviye dirençli türlerin görülme sıklığının artması nedeniyle, tedaviye yanıtın izlenmesinde ve klinik relapsların değerlendirilmesinde de yararlı olmaktadır (15).

Çalışmada vajinal sürüntülerden elde edilen 50 Candida kökeni klasik yöntemler (Pirinç ekstresi- Tween 80 agar, germ tüp, karbonhidrat asimilasyon), API 20C AUX ve kromojenik besiyerinde tiplendirildi.

Vajinal sürüntü örnekleri ile ilgili çalışmalarda, izole edilen Candida türlerinin dağılımı incelendiğinde; Frye ve arkadaşları (43), *C. albicans*'ın %81'lik izolasyon oranıyla en sık izole edilen tür olduğunu, %16 izolasyon oranı ile *C. glabrata*'nın bunu izlediğini; Sobel ve arkadaşları (100), %77-95 *C. albicans* izole edildiğini, bunu sırasıyla *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın izlediğini bildirmişlerdir. Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalarda, Cengiz ve arkadaşları (16), %62.5 *C. albicans* izole edildiğini bunu, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*'in izlediğini bildirmişlerdir. Aydın ve arkadaşları (8), %34 *C. albicans* izole edildiğini, bunu sırasıyla *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis* ve *C. krusei*'nin izlediğini bildirmişlerdir. Sürücüoğlu ve arkadaşları (103), kontrasepsiyon yöntemi kullanan hastalarda %76 *C. albicans* izole edildiğini bunu, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. stelloidea*'nın izlediğini bildirmişlerdir. Arıkan ve arkadaşları (7), vajiniti olan 52 olgunun 13'ünde (%25) etkenin Candida türü olduğunu ve bunların sıklık sırasına göre *C. albicans*, *C. krusei*

ve *C. glabrata* olduğunu bildirmişlerdir. Koç ve arkadaşları (62), %60.3 *C. albicans*, daha sonra sırasıyla *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*. *C. guilliermondii* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kaya ve arkadaşları (58), %65 *C. albicans*, daha sonra sırasıyla *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Pirinççiler (87), %40 *C. albicans*, daha sonra sırasıyla *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis* izole ettiklerini bildirmiştir. Çalışmamızda ise 50 vajinal sürüntü örneğinden 34'ü *C. albicans* (%68), 9'u *C. krusei* (%18), 5'i *C. tropicalis* (%10), 2'si *C. glabrata* (%4) olarak değerlendirildi. Çalışmamızda ve diğer çalışmalarda görüldüğü gibi vajinal kandida infeksiyonlarında en sık görülen etken *C. albicans* olmasına karşın, son yıllarda *C. albicans* yanı sıra *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* gibi *C. albicans*'a göre tedaviye dirençli *Candida* türleri de görülmektedir.

Çalışmamızda kandidaların idantifikasyonda ilk öncelikle klasik mikolojik yöntemler kullanılmıştır. Pirinç ekstresi -Tween 80 agarda morfolojik özelliklerin mikroskopik olarak değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar güvenilir olmasına karşın acilen tanı ve tedavi gerektiren durumlarda bile bu yöntemle yaklaşık bir hafta içinde sonuç alınmakta sonuçta böyle hastalar zor durumlarla karşılaşmaktadırlar. *Candida* infeksiyonlarının tanısında çabuk ve kolay yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (10,12).

Germ tüp testi, *C. albicans*'ın hızlı idantifikasyonu için uzun zamandan beri kullanılmakta olan bugün de değerini koruyan, basit ve oldukça duyarlı bir testtir. Ancak germ tüp testinin, uygulama esnasında sıklıkla kullanılan insan serumunun saklama sorunu, deney sırasında bulaşabilen bazı infeksiyonlara yakalanma riskinin varlığı ve *C. albicans* dışındaki türlerin idantifikasyonunun yapılamaması gibi dezavantajları vardır (63,114). *C. albicans* kökenlerinin %95-97'i germ tüp oluşturduğu bildirilmiştir (12,15,50,87). Çalışmamızda ise Pirinç ekstresi- Tween 80 agar ve karbonhidrat asimilasyon testine göre *C. albicans* olduğu belirlenen 34 kökeninin 31 (%91.2)'i germ tüp pozitif olarak saptandı.

Son yıllarda, kandidaların çabuk ve kolay idantifikasyona yönelik ticari kitler geliştirilmiştir. Bunlardan API 20C AUX pek çok çalışmada kullanılmıştır (7,40,41,50,54,63,70,75,96,99,104). Bu çalışmaların bazılarında API 20C AUX diğer

ticari kitlerle ve/ veya klasik yöntemlerle karşılaştırılmaktadır. Fenn JP ve arkadaşları (41), germ tüp negatif 406 maya kökenlerinin idantifikasyonunda Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) ile API 20C AUX'u karşılaştırmışlar ve mayaların YBC ile %89.7, API 20C AUX ile %99.3 oranında doğru olarak idantifiye edildiğini, *C. krusei* kökenlerinden bazılarının *C. rugosa* ve *C. zeylanoides*, olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Torres-Rodriguez ve arkadaşları (104), API 20C AUX'u standart kabul edip Microring YT ile karşılaştırmışlar ve ikisi arasında %77 uyum olduğunu bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise API 20C AUX'un mayaların idantifikasyonunda standart klasik yöntemlerle birlikte kullanıldığı belirtilmekte fakat güvenilirliği ile ilgili bir oran verilmemektedir (7,40,50,54,70,75). Çalışmamızda ise API 20C AUX ile 50 *Candida* kökeninin 49 (%98)'u doğru olarak idantifiye edildi. *C. krusei* kökenlerinden 1'i *C. zeylanoides* olarak saptanırken, diğer kökenlerin hepsi doğru olarak saptandı. Bu bulgular API 20C AUX'un kandidaların idantifikasyonunda güvenle kullanılabilceğini düşündürmektedir.

Çabuk ve kolay idantifikasyon için bir diğer yöntem kromojenik besiyerlerinin kullanılmasıdır. Albicans ID₁, Candiselect, Albicans ID₂, Candichrom albicans, Chromoagar Candida, Mast ID CHROMagar Candida gibi çeşitli kromojenik besiyerleri vardır (42,121). Çeşitli çalışmalara göre kromojenik besiyerlerinin *C. albicans* kökenlerinde 48 saatte duyarlılığı ve özgüllüğü %88-100 arasında değişmektedir (13,42,81,84,94,121). Freydiere ve arkadaşları (42), Albicans ID₁, Candiselect ve Chromoagar Candida'nın, 72 saat inkübasyondan sonra *C. albicans* kökenlerinde duyarlılıklarının sırasıyla; %92.75, %91.30, %85.70 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Chromoagar Candida'da 48 saat inkübasyondan sonra *C. krusei* (n=5) ve *C. tropicalis* (n=2) kökenlerinin hepsinin doğru olarak tanındığını, *C. glabrata* kökenlerinin ise idantifiye edilemediğini bildirmişlerdir. Odds ve arkadaşları (81), Chromoagar Candida'nın *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* için, duyarlılık ve özgüllüğünün %99 olduğunu, *C. glabrata* kökenlerinin ise idantifiye edilemediğini bildirmişlerdir. Bernal (13) ve Pfaller (84) ise, CHROMagar Candida besiyerinde *C. glabrata*'nın idantifiye edilebileceğini ileri sürmüşlerdir. San-Millan ve arkadaşları (94), Chromoagar Candidanın 48 saat inkübasyondan sonra duyarlılığı ve özgüllüğünün *C. albicans* ve *C. tropicalis* için %99 ve %100, *C. krusei* için her

ikisinin de %100 olduğunu bildirmişlerdir. Baumgarner ve arkadaşları (10), Albicans ID ve Chromoagar'ın 72 saat inkübasyondan sonra özgüllüklerinin %93.6 ve %92.2, duyarlılıklarının ise %99.8 ve %100 olduğunu bildirmişlerdir. Yeğenoğlu ve arkadaşları (121), Albicans ID ve Candichrom albicans'ı germ tüp testi ve SDA ile karşılaştırmışlar, SDA'da maya olduğu belirlenen 17 suşun 13'ünün germ tüp oluşturduğu, 14'ünün ise Albicans ID ve Candichrom albicans'da pozitif reaksiyon oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise Mast ID- CHROMagar Candida besiyerinin 48 saat inkübasyondan sonra, *C. albicans* kökenlerinde duyarlılığı %97, özgüllüğü % 88; *C. tropicalis* kökenlerinde duyarlılığı % 80, özgüllüğü % 97.8 saptandı. *C. krusei* kökenlerinin ise hepsi doğru olarak saptandı. Klasik yöntemler ve API 20C AUX ile *C. glabrata* olduğu belirlenen 2 *Candida* kökeninin ise mor renkli koloniler oluşturduğu gözlemlendi, fakat *C. glabrata*'nın kromojenik besiyerlerinde idantifiye edilip edilmeyeceği konusunda çelişkili çalışmalar vardır (13,42,81,84). Sonuç olarak kromojenik besiyerlerinden Mast ID- CHROMagar Candida, *Candida* kökenlerinin çabuk, kolay ve büyük ölçüde güvenilir idantifikasyonunu sağladığından tanımlanması önerilebilir. Ayrıca Albicans ID₁, Candiselect, Albicans ID₂ gibi kromojenik besiyerlerinden farklı olarak, *C. albicans*'ın yanı sıra son yıllarda görülme sıklığı artan *C. tropicalis* ve *C. krusei*'nin de idantifikasyonunu sağladığından ve duyarlılığı ve özgüllüğü diğerlerinden farklı olmadığından diğerlerine tercih edilebilir.

Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarının insidansındaki artışa paralel olarak pek çok yeni antifungal ajan kullanıma girmiş ve bunların profilaksi ve tedavide kullanımları giderek yaygınlaşmıştır. Özellikle triazol grubu antifungal ajanların sık kullanılması ile hem *C. albicans* dışındaki türlerde artış hem de antifungal ajanlara dirençte artış saptanmıştır ve bütün bunların sonucunda antifungal ajanların in vitro duyarlılıklarını ölçen testlerin önemi artmış ve buna yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (66,122). NCCLS tarafından standart makrodilüsyon yönteminin önerilmesi bu konuda önemli bir adım olmuştur. Ancak standart yöntemle çalışılması zor ve zaman alıcı olduğu için, alternatif yöntem arayışları olmuş ve mikrodilüsyon yöntemi önerilmiştir. Standardizasyon halen sağlanamadığı için, bu arayışlar devam etmektedir (48). Yapılan çalışmalarda *Candida* türlerinin antifungal ajanlara duyarlılığı Candifast, ATB fungus, Mycototal gibi ticari kitlerle (27,99), agar disk difüzyonla (9,70,95),

flow sitometri yöntemi (60,115), alternatif mikrodilüsyon yöntemi (23,37,47,75) ve E test ile (5,22,40,98) çalışılmıştır. Bu yöntemlerle bulunan sonuçlar çoğu kez standart makrodilüsyon ve mikrodilüsyon sonuçları ile karşılaştırılarak aralarındaki uyum araştırılmıştır (5,22,23,40,47,75,98).

Çalışmada izole ettiğimiz ve tiplendirdiğimiz *Candida* kökenlerinin amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol'e karşı *in vitro* antifungal duyarlılıkları standart makrodilüsyon ve alternatif yöntemlerden E test ile çalışılarak, MİK değerleri belirlenmiş ve E test yönteminin standart yöntemle uyumu araştırılmıştır.

Candida kökenlerinin *in vitro* antifungal duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalarda, *C. albicans* kökenlerinde saptanan MİK değerlerinin, diğer kökenlerde saptanan MİK değerlerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir (37,47,75,88,98,118). Gülay ve arkadaşları (47), kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* kökenlerinde, makrodilüsyon yöntemiyle flukonazol'ün MİK 50 değerini *C. albicans*'ta 0,25 µg/ml; *C. parapsilosis*'de 0,5 µg/ml; *C. pseudotropicalis*'de 0,25 µg/ml ve *C. guillemondii*'de 4 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Ermertcan (37), kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* kökenlerinde, makrodilüsyon yöntemiyle flukonazol duyarlılığının *C. albicans* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata*=*C. krusei* olarak sıralandığını bildirmiştir. Molbay ve arkadaşları (75), kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* kökenlerinde, makrodilüsyon yöntemiyle saptanan flukonazol duyarlılığında MİK 50 ve MİK 90 değerlerinin *C. albicans*'ta 0,25µg/ml ve 0,5µg/ml iken; diğer kökenlerde 0,25µg/ml ve 1µg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Price ve arkadaşları (88), beş yıllık süreyle kan kültürlerinden soyutladıkları *Candida* kökenlerinin flukonazole duyarlılığının makrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK 50 ve MİK 90 değerlerinin ; *C. albicans*'ta ≤0,125 µg/ml ve 0,25 µg/ml; *C. tropicalis*'te 0,5 µg/ml ve 1µg/ml; *C. parapsilosis*'te 0,5 µg/ml ve 1µg/ml; *C. glabrata*'da 2 µg/ml ve 8 µg/ml; *C. krusei*'de 16 µg/ml ve 32 µg/ml olarak saptamışlardır. Simor ve arkadaşları(98), kan kültürlerinden soyutlanan mayalarda amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol duyarlılığını mikrodilüsyon ve E test ile araştırmışlar ve *C. albicans* kökenlerinde saptanan MİK 50 ve MİK 90 değerlerinin diğer *Candida* kökenlerindekiinden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Willke ve arkadaşları (118), kanserli hastalardan izole edilen *Candida* kökenlerinde amfoterisin B ve flukonazol MİK aralığını sırasıyla; *C. albicans*'ta ≤ 0,06-2 µg/ml ve

$\leq 0,06-4 \mu\text{g/ml}$; *C. glabrata*'da $\leq 0,06-4 \mu\text{g/ml}$ ve $\leq 0,06-8$; *C.tropicalis*'te $\leq 0,06-2 \mu\text{g/ml}$ ve $1-4 \mu\text{g/ml}$; *C.krusei*'de $\leq 0,06-0,25 \mu\text{g/ml}$ ve $>8 \mu\text{g/ml}$ olarak saptamışlardır. Çalışmamızda ise, *C. albicans* kökenlerinde MİK değerleri, diğer kökenlerde saptanan MİK değerlerinden diğer çalışmalarda olduğu gibi daha düşük olarak saptandı (Tablo IX, Şekil 8-17).

E test ile yapılan çalışmalarda test ortamı olarak Fosfat tamponlu RPMI 1640 agar , MOPS tamponlu RPMI 1640 agar, Casitone agar, Antibiyotik Medium 3, Yeast Nitrogen Base Agar gibi farklı besiyerleri kullanılmıştır (5,22,40,90). MOPS tamponlu RPMI 1640 agar, bütün antifungaller için önerilirken, Fosfat tamponlu RPMI 1640 agar ve Casitone agar sadece azoler için, Antibiotic Medium 3 ise sadece Amfoterisin B için önerilmektedir (E test technical guide 4, E test technical guide 4b; AB biodisk, Solna, Sweden).

E testi için farklı ortamların kullanıldığı çalışmalar gözden geçirilirse; Arıkan ve arkadaşları (5), *Candida* kökenlerinin Amfoterisin B'ye in vitro duyarlılığının belirlenmesinde Antibiotic Medium 3 besiyeri ile RPMI 1640 besiyeri kullanımını karşılaştırdıkları bir çalışmada, iki besiyeri ile elde edilen sonuçlar arasındaki uyumun %92.6 olduğunu, besiyerine bağlı MİK değerinde belirgin yükselme olan köken olmadığını bildirmişlerdir. Rex ve arkadaşları (90), benzer bir çalışmada, Antibiotic Medium 3 besiyerinin sadece dirençli kökenlerin MİK değerinde yükselmeye neden olduğunu, duyarlı kökenler her iki besiyerinde de test edildiğinde elde edilen MİK dağılımlarının benzer olduğunu bildirmişlerdir. Dannaoui ve arkadaşları (22), orafaringeal kandida infeksiyonu olan hastalardan soyutlanan *C. albicans* kökenlerinde E test yöntemiyle, amfoterisin B, flukonazol ve itrakonazol duyarlılığını farklı besiyerlerinde (RPMI 1640 , Yeast Nitrogen Base Agar ve sadece azoller için Casitone agar) çalışmışlar; ortalama MİK değerlerinin üç besiyerinde de farklı olmadığını ancak Yeast Nitrogen Base agardaki MİK değerlerinin, RPMI 1640 ve Casitone agarda saptananlardan düşük bulunduğunu ve ayrıca Casitone agarda keskin sınırlar oluşması nedeniyle, değerlendirmenin daha kolay yapıldığını bildirmişlerdir. Favel ve arkadaşları (40), *C. usitaniae* kökenlerinde amfoterisin B, florositozin, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol duyarlılığının belirlenmesinde E test yönteminde

RPMI 1640 veya Casitone agar kullanılarak elde edilen sonuçların, makrodilüsyon yöntemine uyumları arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ise Fosfat tamponlu RPMI 1640 agarda saptanan MİK değerlerinin, diğer ortamdakilerden düşük olduğu, ayrıca Casitone agarda, keskin sınırlar olduğu için, değerlendirmenin daha kolay olduğu saptandı. İstatistiksel olarak üç ortamda elde edilen ortalama MİK değerleri arasında fark olmadığı saptandı.

E test yönteminin güvenilirliğinden bahsedebilmek için, standart yöntemlerle karşılaştırılması gereklidir. Candida kökenlerinde antifungal duyarlılığın saptanmasında, E test ile makrodilüsyon yönteminin karşılaştırıldığı çalışmaların bazılarında ± 1 dilüsyonlar (2 kattan farklı olmayan), bazılarında ise ± 2 dilüsyonlardaki (4 kattan farklı olmayan) MİK değerleri aynı kabul edilmiş ve iki yöntemin uyum yüzdesi verilmiştir (6,17,18,110,112).

Van Eldere ve arkadaşları (110), E test ile standart makrodilüsyon yönteminin uyumunun çeşitli klinik örneklerden soyutlanan Candida kökenlerinde amfoterisin B için %89 flukonazol için %96 (± 1 dilüsyonlar aynı); Chen ve arkadaşları (17), flukonazol için %73-89 (± 1 dilüsyonlar aynı) ve %87-100 (± 2 dilüsyonlar aynı); Wanger ve arkadaşları (112), amfoterisin B için %96-97, flukonazol için %95 (± 2 dilüsyonlar aynı); Colombo ve arkadaşları (18), flukonazol için %80, ketokonazol için %71, itrakonazol için %84 (± 1 dilüsyonlar aynı) olduğunu bildirmişlerdir. Arıkan ve arkadaşları (6) ise, immunsupresse hastalardan soyutlanan Candida kökenlerinde Etest ile beraber mikrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemlerinin de standart makrodilüsyon yöntemi ile uyumunu araştırmışlar ve amfoterisin B için %86-93, flukonazol için %84-89 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da E test ile standart makrodilüsyon yönteminin uyumu ± 1 dilüsyonlar aynı kabul edilerek, amfoterisin B için % 84; flukonazol için %90-97 olarak saptanmış olup diğer çalışmalarda olduğu gibi yüksektir (6,17,18,110,112). Ketokonazol için ise %60-79 olarak saptanmış olup, diğer çalışmalarda olduğu gibi düşüktür (18).

Sonuçlarımız E test yönteminin Candida kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazol duyarlılığının saptanmasında kullanılmasının uygun olduğunu, ketokonazol duyarlılığının saptanmasında ise uygun olmadığını göstermiştir.

SONUÇLAR

1. 50 vajinal sürüntü örneğinden 34'ü *C. albicans* (%68), 9'u *C. krusei* (%18), 5'i *C. tropicalis* (%10), 2'si *C. glabrata* (%4) olarak değerlendirilmiştir.
2. Germ tüp testi ile 34 *C. albicans* kökeninin 31(%91.2)'i olumlu bulunmuştur. Yalancı pozitiflik saptanmamıştır.
3. Çalışmada API 20C AUX ile 50 *Candida* kökeninden 49 (%98)'u doğru olarak saptanmıştır.
4. API 20C AUX ticari kitinin kandidaların idantifikasyonunda güvenilir olduğu görülmüştür.
5. Çalışmamızda kullanılan Mast ID CHROMagar *Candida* besiyerinin 48 saat inkübasyondan sonra, *C. albicans* kökenlerinde duyarlılığı %97, özgüllüğü %88; *C. tropicalis* kökenlerinde duyarlılığı %80, özgüllüğü %97.8 bulunmuştur. *C. krusei* kökenlerinin ise hepsi doğru olarak tanınmıştır. Klasik yöntemler ve API 20C AUX ile *C. glabrata* olduğu belirlenen 2 *Candida* kökeninin ise mor renkli koloniler oluşturduğu gözlenmiştir.
6. Kromojenik besiyerlerinden Mast ID CHROMagar *Candida*'nın, *Candida* kökenlerinin çabuk , kolay ve büyük ölçüde güvenilir idantifikasyonunu sağlaması nedeniyle, tanıda kullanılabileceği görülmüştür.
7. *Candida* kökenlerinin standart makrodilüsyon yöntemi ve E test ile amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol'e karşı duyarlılıkları MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri araştırılarak saptanmıştır. Standart makrodilüsyon yöntemi ile MİK aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri sırasıyla amfoterisin B için *C. albicans* kökenlerinde 0.03-0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.5 µg/ml, diğer kökenlerde 0.125-1µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml,; flukonazol için *C. albicans* kökenlerinde 0.125-2 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, diğer kökenlerde 1-64 µg/ml, 64 µg/ml, 64 µg/ml; ketokonazol için *C. albicans* kökenlerinde 0.03-0.125 µg/ml, 0.03 µg/ml, 0.125 µg/ml, diğer kökenlerde 0.03-0.5µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.5 µg/ml, olarak saptanmıştır.
8. Çalışmamızda, *C. albicans* kökenlerinde saptanan MİK değerlerinin, diğer kökenlerde saptanan MİK değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

9. Çalışmada E test yöntemiyle bütün antifungaller, MOPS tamponlu RPMI 1640 agarda çalışılırken, azoller ayrıca, Fosfat tamponlu RPMI 1640 agar ve Casitone agarda çalışılmıştır. Fosfat tamponlu RPMI 1640 agarda saptanan MİK değerlerinin diğer ortamdakilerden düşük olduğu belirlenmiş, Casitone agarda, ise keskin sınırlar oluşması nedeniyle değerlendirmenin daha kolay olduğu görülmüştür.
10. İstatistiksel olarak E test yöntemiyle üç farklı ortamda elde edilen ortalama MİK değerleri arasında fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).
11. E test yönteminin standart makrodilüsyon yöntemi ile uyumu ± 1 dilüsyonlar aynı kabul edilerek, amfoterisin B için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %84; flukonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %97, Fosfat tamponlu RPMI 1640 ve Casitone agarda %90; ketokonazol için MOPS tamponlu RPMI 1640'da %78, Fosfat tamponlu RPMI1640'da %79, Casitone agarda %60 olarak saptanmıştır.
12. E test yönteminin makrodilüsyon yöntemiyle uyumu amfoterisin B ve flukonazol için yüksek bulunması nedeniyle, kandidalarda amfoterisin B ve flukonazol duyarlılığının saptanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
13. E test yönteminin makrodilüsyon yöntemiyle uyumu ketokonazol için düşük bulunması nedeniyle, kandidalarda ketokonazol duyarlılığının saptanmasında kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Akova M. Yoğun bakım ünitelerinde fungal infeksiyonlar. *Ankem Derg* 1992; 6: 331-334.
2. Altınok A, Gezer A. Kadınlarda genital akıntılar ve tedavileri. *Ankem Derg* 1994; 8: 269-274.
3. Anaissie EJ, Bodey GP, Kantarjian H, David C, Barnett K, Bow E, Defelice R, Downs N, File T, Karam G, Potts D, Shelton M, Sugar A. Fluconazole therapy for chronic disseminated candidiasis in patients with leukemia and prior amphotericin B therapy. *Am J Med* 1991; 91: 142.
4. Anaissie EJ, Darouchie RO, Abi-Said D, Uzun O, Mera J, Gentry Lo, Williams T, Kontayiannis DP, Karl CL, Bodey GP. Management of invasive candidal infections: results of a prospective, randomized, multicenter study of fluconazole versus amphotericin B and a view of the literature. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 964.
5. Arıkan S, Akova M. İn vitro amfoterisin B duyarlılık testlerinde 'Antibiotic Medium 3' besiyerinin kullanılması. *İnfek Derg* 1998; 12: 217-221.
6. Arıkan S, Gür D, Akova M. Comparison of Etest, microdilution and colorimetric dilution with reference broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses* 1997; 40: 291-296.
7. Arıkan S, Tunçkanat F, Günalp S. Vajinal akıntı yakınmasıyla başvuran hastalarda etkenlerin mikrobiyolojik olarak değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bült* 1997; 31: 103-111.
8. Aydın F, Tosun İ, Ekmen Ü, Bilekli C, Köroğlu H, Soylu H, Alpay Ş. Vulvovajinal candidiasis olgularından izole edilen mayaların türlere göre dağılımı. *Mikrobiyol Bült* 1996; 30: 51-55.
9. Barry AL, Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2154-2157.
10. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 454-456.

11. Bennett JE. Antifungal agents. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease (4rd edition). Vol. 1. Newyork, Churchill Livingstone, 1995; 401-410.
12. Berardinelli S and Opheim D. New germ tübe induction medium for the identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1985; 22: 861-862.
13. Bernal S, Mazuelos EM, Garcia M, Aller AL, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. Diagnostic Microbiol and Infect Dis 1996; 24: 201-204.
14. Boschman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, Obias AA, Noskin GA, Englund K, Postelnick MA, Suriano T, Peterspn LR. Thirteen- year evolution of azole rezistance in yeast isolates and prevelance of rezistant strains carried by cancer patients at a large medical center. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:734-738.
15. Buckley HR. Identifications of yeasts. In: Evans EGV and Richardson MD (eds). Medical Mycology: A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press, 1989; 97-109.
16. Cengiz AT, Ataoğlu H, Cengiz L, Seyhun A, Gülmezoğlu M. Vajinal akıntılardan izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı. Mikrobiyol Bült 1989; 23: 275-283.
17. Chen SC, O'Donnell ML, Gordon S, Gilbert GL. Antifungal susceptibility testing using E test: Comparison with broth macrodilution technique. J Antimicrobial Chemother 1996; 37: 265-273.
18. Colombo AL, Barchiesi F, McGouh DA, Rinaldi MG. Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 1995; 33: 535-540.
19. Çaksen H, Kurtoğlu S. Sistemik etkili antifungal ajanlar: Ketokonazol ve flukonazol. Yeni Tıp Derg 1995; 12: 361-364.
20. Çerikcioğlu N. *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezi. 7. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 1994 Ankara, kongre kitabı, s. 103-110.

21. Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. *Clin Pharmacokinet* 1988;14: 13.
22. Dannaoui E, Colin S, Pichot J, Piens A. Evaluation of the E test for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 228-232.
23. Davey KG, Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrobial Chemother* 1998;42:439-444.
24. Debona M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 471-497.
25. Debruyne D, Ryckelynck JP. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Pharmacokinet* 1993; 24: 10.
26. Dennig DW, Baily GG, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:261-280.
27. Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 336-342.
28. Drutz DJ. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 392-397.
29. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease* (4rd edition). Vol 2. Newyork, Churchill Livingstone, 1995; 2289-2306.
30. Ellis DH. *Clinical Mycology The Human Opportunistic Mycoses*. 4th edition. Australia, Gillingham Printers, 1995; 17-39.
31. Ener B. Antifungal dirençlilik ve genetik analizler. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik- Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler 1997 Kuşadası, kongre kitabı, s. 136-140.
32. Ener B. In vitro antifungal duyarlılık testleri: Standardizasyon ve klinik önemi. *Mikrobiyol Bült* 1996; 30: 419-425.
33. Ener B. Mantar infeksiyonlarında klinikten laboratuvara: Tanı sorunları. *Ankem Derg* 1998;12: 248-252.

34. Ener B. Yeni antifungaller üzerine çalışmalar. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 1996 Antalya , kongre kitabı, s. 23-125
35. Erbakan N. Derinin Mantar Hastalıkları. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1989.
36. Erensoy E. Mantarların saptanmasında moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 1996, Antalya kongre kitabı, s. 121-122.
37. Ermertcan Ş. Kan kültürlerinden soyutlanan Candida kökenlerinin flukonazol'e in vitro duyarlılığının makrodilüsyon ve kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleri ile saptanması. Uzmanlık tezi, Bornova, İzmir, 1998.
38. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology (6th edition). Washington DC, ASM Press 1995; 1405-1414.
39. Espinel-Ingroff A, Shadomy S. In vitro and In vivo evaluation of antifungal agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 352-361.
40. Favel A, Michel-Nguyen A, Chastin C, Trousson F, Penaud A, Regli P. In vitro susceptibility pattern of Candida lusitanae and evaluation of the E test method. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 591-596.
41. Fen JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carroll K. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. J Clin Microbiol 1994; 32: 1184-1187.
42. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of Candida species in clinical specimens. Euro J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16: 464-467.
43. Frye KF, Donovan JM, Drach DW. C. glabrata urinary infections: A Review. J Urol 1988; 139: 1245-1249.
44. Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi: Current status of the standardization process. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2517-2521.
45. Gallis HA, Drew RH, Pickard WE. Amphotericin B: Recent progress and future directions. Clin Infect Dis 1990; 22:133.

46. Gupta AK, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents. An overview. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 677.
47. Gülay Z, Yuluğ N. Antikandidal duyarlılık testlerinde yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül* 1995; 29:179-188.
48. Gülay Z. Yeni antifungal duyarlılık testleri-alternatif yöntemler.3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik- Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler 1997 Kuşadası, kongre kitabı, s. 130-135.
49. Hayran O, Kayhan M, Aksayan S. Vulvovajinal kandidozda risk faktörleri. *İnfekt Derg* 1992; 6:135-139.
50. Helvacı S, Gedikoğlu S, Mıstık R. *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. *İnfekt Derg* 1992;6:141-143.
51. Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: Recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 133-134.
52. Jacobs LG, Skidmore EA, Cardoso LA, Ziv F. Bladder irrigation with Amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 313-318.
53. Janknegt R, Maria S, Bakker-Woudenberg J.M, Crommelin DJA . Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23: 279-291.
54. Johnson EM, Davey KD, Szekely A, Warnock DW. Itraconazole susceptibilities of fluconazole susceptible and resistant isolates of five *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 1997; 36: 787-793.
55. Johnson EM, Warnock DW. Azole drug resistance in yeast. *J Antimicrobial Chemother* 1995; 36:751-755.
56. Katırcıoğlu İ, Tosun İ, Uyanık E, Bozkaya H, Bingöl R. Vajina akıntısı örneklerinde saptanan mayaların tiplendirilmesi. *İnfekt Derg* 1995;9:297-301.
57. Kaufman R.H. Establishing a correct diagnosis of vulvovaginal infection. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 986-988.
58. Kaya D, Kiraz. Vajinal akıntı örneklerinden izole edilen maya ve bakterilerin dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1994; 24: 91-95.
59. Kayaalp O. Antifungal Antibiyotikler ve Diğer Antifungal İlaçlar. Kayaalp O (ed). *Tıbbi Farmakoloji'den* .Ankara, Ulucan Matbaası. 1984; I. Cilt: 693-710.

60. Kirk SM, Callister SM, Lim LC, et al. Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 358-363.
61. Kirkpatrick CH. Host factors in defence against fungal infections. *Am J Med*, 30: 1-12, 1984.
62. Koç NA, Evrensel N, Aygen E, Duvan S. Vajinal örneklerden izole edilen mayaların tiplendirilmesi. *İnfekt Derg* 1997; 11:289-291.
63. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. *Mycology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (5 th edition). Philadelphia, Lippincott Co, 1997; 983-1069.
64. Kuştimur S. *Kandida patogeneğinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bült* 1994; 28: 175-181.
65. Kuştimur S. Mantar infeksiyonları serolojik tanısında yenilikler. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 1996 Antalya, kongre kitabı, s. 118-120.
66. Kuştimur S. Mayaların antifungal duyarlılık testleri. 3. Antimikrobiyal Kemoterapi Günleri 1997 Kuşadası, kongre kitabı, s. 118-121.
67. Kuştimur S, El-Nahi H. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin patojenite testleri ile saptanması ve bunlarda asit proteinazın gösterilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1991; 21: 64-69.
68. Levitz ML, Diamond RD. A rapid colorimetri assay of antifungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis* 1985; 152: 938-945.
69. Martinez-Suarez JV, Rodriguez-Tudela JL. Patterns of in vitro activity of itraconazole and imidazole antifungal agents against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 15512-1516.
70. May JL, King A, Warren CA. Fluconazole disc diffusion testing for the routine laboratory. *J Antimicrobial Chemother* 1997; 40: 511-516.
71. McGinnis MR, Rinaldi MG. Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. In: Lorian V (ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine* (4th edition). Baltimore, Williams-Wilkens Co, 1996;176-211.
72. Merz WG, Roberts GD. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds).

- Manual of Clinical Microbiology (6th edition). Washington DC, ASM Press 1995; 709-722.
73. Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *C. albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3344.
 74. Molbay D, Ener B, Gülen D, Korten V, Özek E, Bozok-Johnson C. Çeşitli *Candida* kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazol'e karşı in vitro duyarlılıklarının makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi. *İnfeks Derg* 1997; 11: 149-152.
 75. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth Dilution Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. NCCLS Document M27- A, Wayne, Pa, 1997.
 76. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth Dilution Susceptibility Testing of Yeasts: Proposed Standard. NCCLS Document M27-P, Villonova, Pa, 1992.
 77. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth Dilution Susceptibility Testing of Yeasts: Tentative Standard. NCCLS Document M27-T, Villonova, Pa, 1995.
 78. Nolte FS, Parkinson T, Falconer J, Dix S, Wiliams J, Gilmore C, Geller R, Wingard JR. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 196-199.
 79. Norwegian Antibiotic Working Group. Susceptibility testing of bacteria and fungi. *Scand J Dis* 1997; 103: 27-28.
 80. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 1923-1929.
 81. Özdemir Ş. Deneysel sistemik kandidiyazis modelinde; serum *C. albicans* mannan antijeni ve blastoconidia antikorlarının araştırılması. Uzmanlık tezi. Samsun 1997.
 82. Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Rhine-Chalberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. 1994; 32: 506-509.

83. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61.
84. Pfaller MA, Messer SA, Bolstrom A. Multisite reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1691-1693.
85. Pfaller MA, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing, current state of technology, limitations and standardization. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7: 435-444.
86. Pirinçiler M. Maya mantarlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığı. Uzmanlık tezi. Samsun 1995.
87. Price MF, Larocco MT, Gentry LO. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species recovered from blood cultures over a 5- year period. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1422-1424.
88. Rein M. Vulvovajinitis and cervicitis. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease* (4rd edition). Vol 1. Newyork, Churchill Livingstone 1995; 1074-1090.
89. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal drug susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-381.
90. Roberts GD. Laboratory Methods in Basic Mycology. In: Finegold S.M, Beren E.J eds. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri, J.V. Mostby Company, 1986; 678-774.
91. Rodriguez-Todela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 45-48.
92. Rogers TE, Galgiani JN. Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida Albicans* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 418-422.
93. Members of the Working Party of British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Antifungal drug susceptibility testing. *J Antimicrobial Chemother* 1995; 36: 899-909.

94. San-Millan R, Ribacoba L, Ponton J, Quindos G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 153-158.
95. Scheven M. Testing susceptibility of fungi to fluconazole. *European J Clin Microbiol and Infect Dis* 1993; 12: 393-394.
96. Schuffenecker I, Freydiere A, De Montclos H, Gille Y. Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 255-260.
97. Sewell DL, Pfaller MA, Barry AI. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution and E test antifungal susceptibility testing for fluconazole. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2099-3102.
98. Simor AE, Goswell G, Louie L, Lee M, Louie M. Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbroth dilution and the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 693-697.
99. Sivrel A, Köse Ş, Özgenç O, Erdenizmenli M. Maya türü mantarların çeşitli klinik örneklerden soyulanması ve antifungal duyarlılıkları. *İnfekt Derg* 1997; 11: 145-147.
100. Sobel JD, Vazquez J, Lynch M, et al. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects and therapy. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 93-99.
101. Sobel JD, Vazquez JS. Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole-resistant *Candida albicans* in a female who was not infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 727-728.
102. Sungur C, Akalın HE. Antifungal Ajanlar. Antibiyotikler, Temel Bilgiler ve Klinik Kullanımları. Akalın HE. ed, Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara, 1989; 147-155.
103. Sürücüoğlu S, Karcı L, Türker M, Ünal Z, Kıpıcı A. Kontrasepsiyon yöntemleri ile vajinanın maya kolonizasyonu arasındaki ilişki. *İnfekt Derg* 1997; 11: 71-74.
104. Torres-Rodriguez JM, Montsant- Montane L, Madrerenys-Brunet N. Identification of yeast of the *Candida* genus with a growth inhibition system:

- Microring YT. Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica 1994; 12; 439-442.
105. Trier JS, Bjorkmann DJ. Esophageal, gastric, and intestinal candidiasis. Am J Med 1984; 30: 39-43.
106. Tümbay E. Pratik Tıp Mikolojisi. Bilgehan Basımevi, İzmir 1983.
107. Ulusoy S, Dabak Z, Yüce K. Ketokonazol'a bağlı toksik hepatit olgusu. İnfekt Derg 1994; 8: 89-90.
108. Uzun Ö. Antifungal tedavi: Amfotersin B halâ standart ilaç mı? Ankem Derg 1998;12: 253-256.
109. Van de Velde VJ, Van Peer AP, Heykants JJ, Woestenborghs RJ, Van Rooy P, De Beule KL, Cauwenbergh GF. Effect of food on the pharmacokinetics of a new hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation of itraconazole. Pharmacother 1991;16:424.
110. Van Eldere J, Jousten L, Verhaeghe V, Surmont I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with Etest and semiautomated broth microdilution test. J Clin Microbiol 1996;34:842-847.
111. Von Belkum A. DNA fingerprintin of medically important microorganisms by use of PCR. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 174-184.
112. Wager A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant Candida isolates. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2520-2522.
113. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 27-38.
114. Warren NG, Shadomy HJ. Candida, crypococcus and other yeasts of medical importance. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology (6th edition). Washington DC, ASM Press 1995; 723-737.
115. Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J Clin Microbiol 1997; 35: 5-10.

116. White M, Anaissie EJ, Kusne S, Wingard JR, Hiemenz JW. Amphotericin B colloidal dispersion vs. lipid amphotericin B as therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1996; 24: 635.
117. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:382-402.
118. Willke A, Çerikcioğlu N, İnci R, Arslan H, Demirkazık A. Kanserli hastalardan izole edilen kandida türlerinin antifungallere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1993; 23:119-122.
119. Wingard JR. Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 49-53.
120. Yamane N, Saitoh Y. Isolation and detection of multiple yeasts from a single clinical sample by use of Pagano-Levin Agar medium. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 276-277.
121. Yeğenoğlu Y, Uzun M, Çekmeceli P. *Candida albicans*'ın hızlı tanısında selektif kromojenik yeni besiyerleri: Albicans ID, Candichrom albicans-ön çalışma. *İnfeks Derg* 1998; 12: 223-228.
122. Yuluğ N. Antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyon girişimleri. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 1996 Antalya , özet kitabı, s. 126-127.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ