

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İNVAZİV İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN KANDİDA
TÜRLERİNİN FLUKONAZOL, VORİKONAZOL, AMFOTERİSİN B
DUYARLILIKLARININ MİKRODİLÜSYON VE TIME KILL
YÖNTEMİ (ZAMANA BAĞLI ÖLDÜRME KİNETİĞİ) İLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Emine İNMEZ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Kenan DEĞERLİ

Manisa, 2007

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU'na, Prof. Dr. Beril ÖZBAKKALOĞLU'na, Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ'a, tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimimdeki yardımları ve desteğinden dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Kenan DEĞERLİ'ye, dört yıllık uzmanlık eğitimim boyunca değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Semra KURUTEPE'ye, Doç. Dr. Sinem AKÇALI'ya, Yrd. Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK'e, Yrd. Doç. Dr. Talat ECEMİŞ'e ve Yrd. Doç. Dr. Hörü GAZİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistik çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gönül DİNÇ'e, grafik çizimlerindeki yardımlarından dolayı Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. M. İbrahim Tuğlu'ya, laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı Mikoloji Laboratuvarında görevli teknisyen arkadaşlarım İrfan SAĞLAM ve Nilsu SEVİM'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince bana her an destek olan aileme teşekkür ederim.

KISALTMALAR

CDC: Center for Disease Control

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DBD: Doza Bağlı Duyarlı

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ETA: Endotrakeal Aspirat

LCR: Ligaz Zincir Reaksiyonu

MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MOPS: Morfolinpropansülfonik asit

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance

PCR: Polimeraz Zincir reaksiyonu

PDA: Patetes Dekstroz Agar

SDA : Sabauroud's Dekstroz Agar

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

ÖNSÖZ

KISALTMALAR

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
I. GİRİŞ	1
II.GENEL BİLGİLER	3
1.Tarihçe	3
2.Mantar Sınıflamasında Kandidaların Yeri ve Genel Özellikleri	4
3.Kandidaların Laboratuvar Tanısı	6
3.1. İzolasyon	7
3.2. İdentifikasyon	7
4. Patogenez	13
5. Klinik	14
5.1. Yüzeysel Kandidozlar	14
5.2. Derin-Sistemik Kandidozlar	15
6. Antifungal İlaçlar	18
6.1. Poliyen Antibiyotikler	19
6.2.Primidin Sentez İnhibitörleri	21
6.3. Azoller	21
6.4. Alilaminler	24
6.5. Morfolinler	25
6.6. Ekinokandinler	25
6.7. Pnömokandinler	25
6.8. Pradimisinler-Benanomisinler	25
6.9. Nikkomisinler	25
6.10. Sitokinler	25
6.11. Aktif Ve Pasif İmmünizasyon	26
7. Antifungal İlaçlara Direnç Mekanizmaları	26
8. Antifungal Duyarlılık Testleri	28
8.1. Mikrodilüsyon Testi	30
8.2.Makrodilüsyon Testi	32
8.3. Disk difüzyon Testi	32
8.4. E Test	32
9. Time Kill (Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği) Yöntemi	33
9.1. Genel Özellikler	33
9.2. Yorum	33
9.3.Yöntemin Avantajları	34
9.4. Yöntemin Dezavantajları	34
II. GEREÇ VE YÖNTEM	35
1. İzolatlar	35
2. İzolasyon ve Tür Tayini	35
3. Mikrodilüsyon Yöntemi İle Antifungal Duyarlılık Çalışması	37
4.Time Kill Yöntemi İle Duyarlılık Çalışması	41

	<u>SAYFA</u>
IV.BULGULAR	45
1.Çalışmaya Alınan Örneklerin Dağılımı	45
2. <i>C.albicans</i> Suşlarının Antifungal Duyarlılık Sonuçları	45
3.Time kill Çalışmasının Sonuçları	47
V.TARTIŞMA	62
VI.SONUÇ VE ÖNERİLER	70
VII.ÖZET	73
VIII.İNGİLİZCE ÖZET	74
IX.KAYNAKLAR	75

I.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 (1).

Son yıllarda fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığında artış gözlenmektedir. Bu artış, AIDS vakalarının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının yaygınlaşması, immunsupresif ilaç kullanımının artması, artan invaziv kateter uygulamaları ve majör cerrahi girişimler ile ilişkilidir. 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 (1,2,3).

Nozokomiyal fungal infeksiyonları %86'sından kandida türleri sorumludur. Kan kültüründen en sık izole edilen mikroorganizmalar arasında dördüncü sıradadır(4). Kandida türlerinin nozokomiyal septisemilerin % 8-12'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir (5). Kandida kaynaklı nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonları, altta yatan hastalıktan daha fazla tıbbi sorunlara ve ekonomik kayıplara sebep olur (6).

Şimdiye kadar kabul edilmiş 200'den fazla kandida türü vardır (1-4). Önceleri bu cins içinde yalnız *Candida albicans*'ın patojen olduğu düşünülmüştür.1960'lardan sonra; *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. catenulata*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C.guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyri*, *C. krusei*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis* ve *C. zeylanoides* olmak üzere 15 türün patojen olduğu kabul edilmiştir(7). Tüm kandidozlarda en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır. Ancak son yıllarda *C.*

albicans dışı türler sistemik kandidoz olgularında %46'lık bir oranla daha sık görülmeye ve kolonize olmaya başlamıştır. Sıklık sırasına göre *C tropicalis* (%25), *C. glabrata* (%8), *C. parapsilosis*(%7), *C. krusei* (%4) ve diğer türler izole edilmektedir(8).

İnvaziv kandida infeksiyonlarının tedavisinde sınırlı sayıda antifungal ajan kullanılmaktadır. Son yıllarda triazol grubu antifungallerin profilaksi ve tedavide sık kullanımları sonucu, *C. albicans* dışı türlerin (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) daha az patojen ama dirençli suşları tespit edilmiştir (9,10,11). Bütün bunlar antifungal tedavi seçiminde in vitro duyarlılığı ölçen testlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) yeni adı ile Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI)'in antifungal duyarlılık alt komitesi 1982 yılından beri çalışmalarını sürdürüyor. NCCLS tarafından 1992'de ilk kez kandida türleri ve mayalar için standart makrodilüsyon yöntemi olan M27-P belgesinin 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 mikrodilüsyon yöntemi geliştirilmiştir. NCCLS, 1992 yılında M27-P belgesini, 1995 yılında M27-T belgesini, 1997 yılında mayalar için standart yöntem kabul edilen M27 A belgesini, 2002 yılında M27-A2 belgesini yayınlamıştır. Buna rağmen antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu halen tam sağlanamamıştır (10,12,13,14,15).

Bu çalışmada invaziv infeksiyonlardan izole edilen kandida türleri konvansiyonel sistemler ve ticari kitler kullanılarak tür tayinleri yapılmış ve 100 *C. albicans* suşunun üç antifungal ilaç (flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B) için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI tarafından önerilen standart yöntem olan mikrodilüsyon ile belirlenmiştir. Mikrodilüsyon sonuçlarına göre flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli suşlar tespit edilmiştir. Bu suşlardan MİK değerleri farklı 10 tanesinde time kill metodu kullanılarak ilaçların farklı dilüsyonlardaki fungostatik yada fungusid aktiviteleri araştırılmıştır.

II.GENEL BİLGİLER

1.Tarihçe

Kandidalara ait ilk bilgiler Hipokrates ve Galen'e kadar uzanmaktadır. 1665'de Galen ve Pepy pamukçuğu tanımlamış, 1839'da Langanbek oral lezyonlu bir hastadan mayayı izole etmiştir. 1841'de Berg aftöz membran materyali ile sağlıklı bebekleri aşılıyarak pamukçuğun fungal etiolojisini tespit etmiştir. 1843'de Robin organizmayı *Oidum albicans* türü ile ilişkilendirilmiştir (16). 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 (2).

C. albicans için tanımlanan 100'den fazla sinonimden ikisi 1890'da Zopf'un kullandığı *Monilia albicans* ve 1923'de Berkhout'un kullandığı *Candida albicans*'tır 1940'larda antibiyotiklerin klinik kullanıma girmeleri ile daha önceden rastlanmayan kandida infeksiyonlarının çeşitli klinik formları görülmeye başlamıştır (16).

Bu infeksiyonların önlenmesinde organizasyonun gerekliliği 1950'li yıllarda anlaşılmiş ve ilk organize komiteler 1970'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ve İngiltere'de kurulmaya başlanmıştır. En sağlıklı veriler ve öneriler de yaklaşık 20-25 yıldır bu konuda organize olarak çalışan ve deneyim kazanan bu ülkelerden gelmektedir. Ocak 1970'de CDC (Center for Disease Control) ABD'deki ulusal hastane infeksiyon verilerini prospektif olarak toplamak ve analiz etmek amacıyla NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) sistemini kurmuş ve böylece ülke bazında hastane infeksiyon oranlarını, faktörlerini, infeksiyon bölgelerini belirlemek mümkün olmuştur. Bugün ABD'de yaklaşık 150-200 hastane NNIS kapsamında olup dünyada bu

konu ile ilgili en organize ve verileri en güvenilir sistemdir (17).

ABD'de NNIS sistemine dahil 124 hastanede 1980-1989 yılları arasında 10 yıllık bir periyotta hematogen infeksiyon olarak tanımlanmış 25.000'den fazla hastada yapılan bir çalışmada stafilokoklardan sonra en büyük oranda artışı kandida türleri göstermiştir (18).

2. Mantar Sınıflamasında Kandidaların Yeri ve Genel Özellikleri

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. Mayozla çekirdek bölünmesi vardır. Morfolojik yapılarına göre maya ve küf görünümündedirler (2,19).

Mayalar, tek hücreli, tomurcuklanarak üreyen genellikle yuvarlak veya oval şekilde mikroorganizmalardır. Germ tüp, blastospor, klamidospore, artrospor ve kapsül gibi yapılar oluştururlar. Bunlar identifikasyonda önemlidir. Düşük oksijen basıncında ya da dokuda bazı mayalar hif, pseudohif veya her ikisini birden oluşturabilirler (19).

Mayalar kültürlerinde krema kıvamında, yuvarlak, sınırları düzenli koloniler meydana getirirler. Kapsülü olanlarda mukoid koloniler görülür. Mayalar makroskopik ve mikroskopik morfolojik karakterleri ve biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanabilirler. 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 (2,19).

Kandidalar, *Deuteromyces* (fungi imperfecti) sınıfının *Cryptococcales* takımında yer alırlar. Kandidalar oval biçiminde, gram pozitif, 80S ribozomları olan ökaryotik hücre yapısında olup fakültatif anaerob üreyen mayalardır. Glikoz, mannoz ve az miktarda protein, lipid ve kitinden oluşmuş hücre duvarına sahiptirler (1,2,19). Multilateral tomurcuklanma ile aseksüel olarak ürerler. Maya formu dışında kültür ve dokularda pseudohif veya gerçek hif oluşturabilirler. Pseudohifler tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu

meydana gelir. Gerçek hifler ise apikal uzantı tarzında septalı ve düzgün kenarlıdır(19).

Son yıllarda bazı kandida türlerinin seksüel fazları bildirilmiştir. Bu türlere ait mayalar Deuteromyces sınıfından çıkartılarak Ascomycetes sınıfına dahil edilmişlerdir (2,19). 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 (19,20).

1987'de Berlin'de 14. Ulusal Botanik Kongresinde, Dixon ve Fromling tarafından yapılan fungusların sınıflandırması esas alınarak, tıbbi önemi olan fungusların bu sınıflama içindeki yeri tablo 1 de görülmektedir.

Tablo 1: Tıbbi önemi olan funguslar (19)

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: Artroderma, Ajelomyces, bazı Aspergillus ve Penicillium türleri
Sınıf: Deuteromycetes Takım Cryptococcales Cins: Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Pilryosporum 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

3.Kandidaların Laboratuvar Tanısı

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

gerekir (21,22).

Kandidaların tanımlanmasında klinik örneğin uygun bir şekilde alınıp ekilmesi ve diğer laboratuvar işlemlerinin yapılması gerekir (23). Örnekler asepsi kurallarına uygun olarak alınıp hızla laboratuvara iletilmelidir (24). Klinik materyalden kandidaların izolasyonu ve identifikasyonu için bir dizi işlem yapılır (1).

3.1. İzolasyon

Primer izolasyon için klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan besiyeri Sabouroud's Dekstroz Agar (SDA)'dır (24). Primer izolasyon besiyelerinin bileşimine bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılayarak seçicilik sağlamak üzere antibiyotikler eklenebilir (Sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol gibi). Ayrıca ticari olarak hazırlanmış, antibiyotik içeren Mycosel (BBL), Mycobiotic Agar (Difco) gibi seçici besiyeleri kullanılabilir (19,24). Sikloheksimid'in, bazı türlerin üremesini kısmen veya tamamen inhibe etmesi nedeniyle, aynı zamanda Sikloheksimid içermeyen besiyerine de ekim yapılmalıdır (24).

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 (25). 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 (2-26).

3.2. İdentifikasyon

Geleneksel olarak kandidaların identifikasyonu makroskopik ve mikroskopik olarak morfolojik karakterlerinin incelenmesi ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesiyle yapılır. Morfolojik olarak hücre büyüklüğü ve şekli, koloni rengi ve görünümü, hif ve/veya pseudohif üretimi, germ tüpü veya klamidospore oluşturma yetenekleri gibi özellikleri değerlendirilir. Biyokimyasal olarak ise karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyonu, üre hidrolizi ve nitrat asimilasyonu değerlendirilir (2,19,25,26).

Germ Tüp Testi: Kandidaların identifikasyonunda ilk adımdır. Hızlı sonuç veren, uygulaması kolay, *C. albicans*'ın diğer kandidalardan ayrılmasını sağlayan basit ve çok değerli bir testtir. Ancak *C. albicans* kökenlerinin hepsinde pozitif olmayıp yalancı pozitiflik vardır. *C. albicans* kökenlerinin %95-97'si germ tüp oluşturur. *C. albicans* dışında *C. stellatoidea* da germ tüp üretir. *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* 'de de pseudo germ tüp oluşumu görülebilir (1,19,25,26). Germ tüp, blastospordan orijin alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir filament olarak gözlenir. Pseudo germ tüp de ise daha büyük bir blastospor vardır ve hif ile bağlantı bölgesinin daha belirgin olduğu gözlenir (1). İnsan serumu, yumurta albumini, sığır serum albumini, koagule tavşan plazması, koyun serumu, Doku Kültür Medium 199 (Difco), Trypticase Soy Broth (BBL) ve çeşitli peptonlu besiyerleri germ tüp deneyi için kullanılabilir. Rutinde en sık insan serumu tercih edilir (1,25,27). Germ tüp testi ile yapılan çalışmalarda, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon sonuçları ile uyumu yüksek bulunmuştur (27,28).

Hif, blastospor ve klamidospor yapımı: Hif, pseudohif, blastospor ve klamidospor üretme özellikleri mikroskopik olarak değerlendirilir. Bunun için Pirinç ekstresi-Tween 80 agar, Cornmeal-Tween 80 agar, Wolin Bevis agar, Oxgall agar veya Czapek Dox-Tween 80 agar besiyerlerinden 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 klamidospor ve pseudohif üretimini artırır (1,19,25).

Biyokimyasal testler:

Karbonhidrat asimilasyon testi: Mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Wickerham yöntemi, oksanografik yöntem ve ticari identifikasyon kitleri kullanılarak yapılabilir (1,25).

Nitrat asimilasyon testi:Karbonhidrat asimilasyon testine benzer mayaların

nitrojen kaynağı olarak nitrati kullanma yeteneklerini gösterir (1,19).

Karbonhidrat fermentasyon testi: Fermentasyon, karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımıdır. Modifiye Wickerham tekniği ile yapılabilir. Fermentasyon tüplerindeki pH değişikliği fermentasyonu göstermez. Durham tüpünde gaz kabarcığının gözlenmesi ile ortaya konur. Kandida türleri ile *Cryptococ* ve *Rhodotorula* gibi nonfermentatifleri ayırmada yararlıdır. Karbonhidrat asimilasyon testlerine göre kaba, zor ve daha az güvenilir olduğundan rutin identifikasyonda pek önerilmez (1-25).

Üreaz Testi: Christensen üre agarda üre hidrolizi üreaz aktivitesini gösterir. *C. krusei*, ve *C. lipolytica* üreyi hidroliz edebilir (1).

Sık rastlanan kandida türlerinden bazılarının karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri tablo 2'de sunulmuştur (2,19).

Tablo 2 :Sık rastlanan bazı kandida türlerinin karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri

Türler	Gl	M	S	L	Gl	Gal	L	M	R	S
<i>C. albicans</i>	+	+	±	-	+	+	-	+	-	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+

Gl:Glikoz, M:Maltoz, S:Sukroz, L:Laktoz, Gal:Galaktoz, 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 (12,19,24,25,29,30,31,32,33,34). Bunlar, maya identifikasyon yönteminde standardizasyon sağlar. Hem sık bulunan hem de az rastlanan türleri tanımlama yetkilidir. 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), Autobac (Organon Teknik) ve Pasteur Yeast System (Pasteur Production) gibi pek çok ticari kit vardır (12,25, 29, 30,31,32,33,34).

API 20C AUX, 19 karbonhidrat asimilasyon testinin kullanıldığı 20 mikrokuyucuk içerir. Test edilen karbonhidratlar: glukoz, gliserol, 2-keto-D-glukonat, L-arabinoz, D-ksiloz, adonitol, ksilitol, galaktoz, inositol, sorbitol, a-metil-D-glukozid, asetil-D-glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur. Mayalar inoküle edildikleri 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.

Kromojenik besiyerinde koloni rengi ve görünümü değerlendirilmesi: Kandida 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 kandida türlerinin farklı renklerde ürettiği besiyerleri vardır. Pagano-Levin Agar (Difco), tetrazolium hidrokloridin redüksiyonu ile farklı renkte koloniler oluşturarak tek bir klinik örnekten birden fazla kandida türünün izolasyonuna izin verir (35). Koloni rengine göre hızlı tanıyı sağlayan çeşitli kromojenik besiyerleri de vardır: Albicans İD (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) (26,36,37). Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (36,38).

Serolojik testler: Mikolojik hastalıkların tanısında mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemeler yanında serolojik testlerden de yararlanılabilir (1). Serolojik testler tanısal önemleri yanında hastalığın seyrinin izlenmesinde de

yaralıdır. Ancak serolojik testlerin teknik uzmanlara gereksinimi, 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 (19,39). Aspergilloz, blastomikoz, histoplazmoz, kandidoz gibi hastalıkların tanısında yardımcı olmaktadır. Ancak çapraz reaksiyonların çok fazla meydana gelmesi, geçirilmiş infeksiyon ile aktif infeksiyonu, kolonizasyon ile yaygın hastalığı ayırmada başarısız olmaları bu testlerin değerini azaltmaktadır (39). 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.

Mantarların polisakkarit antijeni galaktomannan (GM) çalışmalarının en önemli odağıdır. Çeşitli yöntemlere duyarlılığı %95'in üzerinde, özgüllüğü %29-90 arasında bildirilmektedir (39,40). Kriptokokkun kapsüler polisakkariti, histoplazmanın polisakkarit antijeni, blastomikozların yüzey proteini (W1-I), A ve AWSE antijenleri, kandidaların asit proteaz, 48kDa enolaz enzimi, 47 kDa, 29 kDa sitoplazmik 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 (19,39).

Kandidalar gibi normal florada bulunan mantarlara karşı sağlıklı kişilerde de antikor bulunması test sonuçlarını değerlendirmekte güçlükler neden olmaktadır (39). 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 infeksiyonu veya nonspesifik çapraz reaksiyonu işaret eder (19).

Ig M sınıfı antikorlar akut infeksiyonu 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 infeksiyondan aylar sonra pozitif kalır. Bu nedenle tek bir defa yüksek bulunmuş Ig G titresi yeni veya geçirilmiş infeksiyonun ayırımında kullanılamaz (19,28).

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 alması için henüz erken görünmektedir (41).

Moleküler yöntemlerin kullanılarak infeksiyon etkeni aranmasında 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 kandida DNA'sı saptanması ise 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 bir DNA parçası seçilebileceği gibi, tek türe, hatta türlere özgü DNA saptanacak

şekilde test geliştirilebilir. Amplifikasyon ürünlerinin küçük olması testin duyarlılığını artırır (41,42).

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 (41).

Moleküler yöntemler mantar epidemiyolojisini araştırmak için de başarıyla uygulanmaktadır. *Aspergillus*, kandida 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 yöntemler kullanılabilir (43).

4. Patogenez

Kandida infeksiyonlarında konak savunma faktörlerinin yanısıra mikroorganizma virulansının da infeksiyon gelişiminde önemi vardır (8).

Virulan türler arasında en güçlü yapışma yeteneği olanlar *C. albicans* ve *C. tropicalis*'tir. *C. parapsilosis* daha az virulandır, ancak sentetik maddelere daha yüksek afinite gösterir (44). İnsanlarda en sık görülen kandidemi etkeni *C. albicans*'tir (8,21). *C. albicans*, çok sayıda virulans faktörüne sahiptir. Bu virulans faktörleri; hızlı çoğalma, proteaz üretimi, ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyon için yüzey mollekülleri, kompleman proteini bağlayan reseptörler, fenotipik dönüşüm yeteneğidir (45). *C. glabrata* tedavide kullanılan cam ve plastik kaplara yapışabilme yeteneğini sağlayan slime faktörü üretir ve nozokomiyal infeksiyonlara neden olabilir (46). Slime faktörün özellikle non-albicans türler ile oluşan infeksiyonlarda daha önemli olduğu düşünülmektedir. Mukozal bariyerin invazyonu ve sistemik infeksiyon gelişim riski, mukozada kolonize olan kandidaların yoğunluğu ile ilişkilidir. Araştırmalarda, 10^{12} kandida içeren solüsyonların sağlıklı mukozalara temasının kandidemiye yol açtığı gösterilmiştir (44).

Konakta kandidalara karşı spesifik ve nonspesifik savunma mekanizmaları mevcuttur. Sıvısal ve hücrel bağışıklık gelişmekle beraber, hücrel bağışıklığın rolü daha büyüktür (47). Nonspesifik savunma mekanizmalarını yerleşik flora, normal hormonal denge, sağlam deri ve mukoza ile nötrofil, monosit ve eozinofillerin fagositik aktiviteleri oluşturur (48).

Kandidaların glukoprotein yapısındaki toksinleri patojenitede rol oynayan virulans faktörlerindedir. Bakteri toksinleri gibi pirojen olup hayvanlarda anaflaktik şoka neden olabilir, ancak bakteri toksinleri kadar etkin değildir (49). Kandidaların dokuda maya ve hif formunda bulunabilme (dimorfizm) özelliğinin de patojenitede rolü vardır. Hif formu dokuya daha kolay yapışır, fagositik hücreler tarafından sindirilemez ve plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriler bir tabaka oluşturur (50).

5. Klinik

Kandidalar, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan infeksiyonlara yol açabilir (51).

5.1. Yüzeysel Kandidozlar

Yüzeysel kandida infeksiyonları çoğunlukla kişinin kendi florasından köken alır. Ancak bazen başka kişilerden bulaş yolu ile de kazanılabilir (51).

Oral kandidoz :Dudaklar, dil, damak, diş etleri, yanak mukozası olmak üzere ağzın her yerinde gelişebilir (8). Akut pseudomembranöz oral kandidoz (pamukçuk), akut atrofik kandidoz, kronik atrofik kandidoz, angular şelit, kronik hiperplastik kandidoz gibi farklı klinik formları vardır. Maligniteli ve AIDS'li hastalarda oral kandidozun ilerlemesiyle özefajit ve gastrointestinal sistem kandidozu gelişebilir (8,51,52).

Genital kandidoz: Kadınların %40'ı normal vajinal floralarında kandidaları taşırlar (52). Kadınların %75'i yaşamlarında en az bir kandida vulvovajinit epizodu geçirirler (51). Vulvovajinitlerin en sık etkenlerinden biri kandidalardır (8,52). Diabetes mellitus, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, gebelik ve oral kontraseptif kullanımında vajinal kandidoz

gelişebilir (48,51). Erkeklerde genital kandidoz balanit, balanoprostit, üretrit şeklindedir (8).

Deri kandidozu :Daha çok aksilla, meme altı, anal bölge, ayak ve el parmakları gibi sıcak ve nemli bölgelerde oluşur. Şişmanlık, diabetes mellitus, travma, maserasyon kandidoz oluşumu için predispozan faktörlerdir. Lezyonlar yüzeysel erozyon şeklinde, kızarıklık, nemli ve bazen vezikül şeklinde oluşur. Kandida foliküliti de özellikle nemli ve oklüzyon olan bölgelerde görülür. İnfantlardaki pişiklerin en sık sebebi kandidalardır (8,48,52).

Konjenital kutanöz kandidoz, doğumda veya hemen sonrasında süt emen bebeklerde görülen ve eritemli zeminde vezikülopüstüler lezyonlarla seyreden nadir bir klinik formdur. Kendiliğinden iyileşebildiği gibi, ağır seyirli derin infeksiyona kadar gidebilir (51).

Onikomikoz: Kandidaların tırnaklarda infeksiyon oluşturmasıdır (8). Tırnak infeksiyonlarının %5-10'unda etken kandidalardır. Su ile fazla teması olanlarda meslek hastalığı şeklinde görülür. Baş ve orta parmak daha çok etkilenir (51,52). Tırnakla birlikte çevresindeki yumuşak dokunun da infekte olmasına paronychia denir (8,48).

Kronik mukokutanöz kandidoz :Deri ve müköz membranlar, saç ve tırnakları tutan kandida infeksiyonlarının heterojen bir grubudur (48). Genellikle erken çocukluk dönemlerinde başlar. Endokrinopatiler (hipoparatiroidizm, addison, hipotiroidizm ve diabetes mellitus) veya hücrel immünitedeki bozukluklarla bağlantılıdır. Deri ve/veya mukozalarda süregen yüzeysel ve tedaviye dirençli lezyonlar oluşur. Kronik mukokutanöz kandidoz sonrası nadiren de olsa dissemine kandidoz gelişebilir (8,48,51).

5.2. Derin-Sistemik Kandidozlar

Sistemik kandidoz kandidemi sonrası gelişir. Konak savunmasının normal olduğu durumlarda, kandidemi geçici olup vücut kısa sürede mantarı kandan uzaklaştırır. Buna karşılık, yetersiz fagositik etkinlik durumlarında kandan uzaklaştırılmaz; mantar kanda çoğalıp herhangi bir organ veya sisteme yerleşerek infeksiyon odakları oluşturur (8).

Kandidemi: Kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir ya da daha fazla kan kültüründe kandida üremesidir (51). İntravenöz ilaç kullananlar dışında sıklıkla hastane kaynaklı bir komplikasyondur. Yanık hastaları, cerrahi (özellikle kalp ve gastrointestinal sistem) sonrası hastalar, onkoloji hastaları (özellikle lösemi) ve organ transplantasyonu sonrası immün sistemi baskılanan hastalar kandidemi için risk altındadır. Kandidemi gelişmesi ile ilişkili faktörler; santral venöz kateter kullanımı, parenteral alimantasyon, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, yoğun kemoterapi ve immünsüpresif tedavilerdir (52). Kandidemi kontamine kateterle ilişkili geçici bir durum olabilse de, kandidemiye bağlı mortalite %38-40 kadardır. Ciddi organ tutulumu olanların %50'sinde kandidemi saptanmayabilir (51,52).

Kandidemiye ait somut klinik belirtiler azdır. Nedeni açıklanamayan ateş, letarji, konfüzyon, bulantı-kusma, hipotansiyon bulguları ve organ yetmezliği kritik hastalarda kandidemi gelişmesi esnasında sık görülen bulgulardır. Yaşlılar, yenidoğanlar, immünsüpresif tedavi görenlerde kandidemi veya sepsise rağmen ateşin yükselmeyeceği akılda tutulmalıdır. Hipotermi genellikle kötü prognoza işaret eder(53).

Kandida türlerinin, kandidemi yaptıktan sonra yol açtıkları bazı klinik tablolar:

C. tropicalis; endokardit, endoftalmit, artrit ve peritonit.

C. parapsilosis; bronkopulmoner ve diğer sistemik infeksiyonlar.

C. guilliermondii; endokardit.

C. krusei;endokardit

Ayrıca lösemili hastalarda *C. albicans* veya *C. tropicalis*, kemik iliği transplant alıcılarında ise *C. krusei* veya *C. lusitaniae* infeksiyonları daha sık görülmektedir (8,54,55,56).

Akut dissemine kandidoz :Fulminan bir infeksiyondur ve genellikle antibakteriyel tedaviye direnç gösteren bir ateş görülür. Nötropenik olan ve olmayan hastalarda görülebilir. En sık rastlanan komplikasyonlar; menenjit, beyin apsesi, renal apse, miyokardit, endokardit, endoftalmit ve kutanöz apselerdir (51). Patolojik değişiklikler; akut süpüratif ve

granülomatöz reaksiyonlarla kombine diffüz mikroapseler ve küçük makroapselerdir (48).

Kronik dissemine kandidoz :Genellikle lösemili hastaların nötropenik döneminde ortaya çıkar. Herhangi bir organ tutulumu belirtisi olmayabilir, ancak ısrarcı ateş vardır. Nötrofil sayısı normale dönse bile ateş ve kilo kaybı devam eder. Karaciğer dalak büyüyebilir. Alkalen fosfataz genellikle çok yüksektir ve tomografide çoklu lezyonlar görülür (51).

Gastrointestinal kandidoz: Kanser hastalarında ve AIDS'lilerde görülür (51). Özefagus ve midede görülebilir. Genelde mukozada tekli veya çoklu ülserler şeklindedir (48). Yeni doğanlarda *C.albicans*'a bağlı diyareler olabilmektedir (51).

Solunum sistemi kandidozu :Lokal veya diffüz bronkopnömoni veya hematojen yayılım sonucu oluşan nodüller, diffüz infiltratif infeksiyon gelişebilir. Kandidalar bronşiyal infeksiyon, larenjit, epiglotit de oluşturabilirler (48,51).

Merkezi sinir sistemi kandidozu :Hematojen dissemine kandidozun bir komplikasyonu olarak kandida, parankimal beyin dokusunu ve meninksleri infekte edebilir. Vasküler şant, lomber ponksiyon, travma, cerrahi, AIDS ve komplike bakteriyel menenjitler predispozan faktörlerdir. Olguların %90'ında sorumlu *C.albicans*' tır (48).

Kardiyak kandidoz :Kanser kemoterapisi alanlarda, kalp kapak protezlilerde, uzun süre intravenöz kateteri olanlarda, bakteriyel endokardit sonucu kardiyak kandidoz gelişebilir (8,48). Tüm endokardit olgularının %2'sinden kandidalar sorumludur (51). Miyokardit, perikardit, dissemine kandidoz sonrası miyokardiyumda mikroapseler görülebilir (48,57).

Üriner sistem kandidozu: Asendan ya da hematojen yolla renal kandidoz gelişebilir. Üretral katater uygulaması, genital veya gastrointestinal sistemden yayılım sonucu sistit gibi alt üriner sistem infeksiyonu gelişebilir(51).

Osteomvelit, artrit, miyozit: Nadiren hematojen yayılım, travma ve

kortizon injeksiyonu sonrası gelişebilir (51).

Oküler kandidoz: Hematojen yayılımla, travma ve cerrahi sonrası gelişebilir. Konjonktiva, kornea, lens, silier cisim, vitröz humor, uvea tutulabilir, körlük gelişebilir (48,51).

6. Antifungal İlaçlar

Antifungal ajanlar deri, mukoza ve organların lokal veya sistemik infeksiyonlarına karşı etkili bileşiklerdir (58). Topikal, oral ve parenteral yoldan uygulanabilirler. Fungal infeksiyonun tanısının konulamaması veya geç konulması nedeniyle tedavide kullanılacak antifungalın seçimi, dozu ve kullanım süresiyle ilgili veriler yetersizdir. Ayrıca antifungal ajanların in vitro ve in vivo duyarlılık sonuçları arasında korelasyon da yeterli değildir. Antifungal ilaç kullanımında bir diğer sorun, mantar hücrelerinin de ökaryotik hücre olmalarından kaynaklanmaktadır. Tedavinin başarılı olması için geniş spektrumlu, vücut doku ve sıvılarına iyi dağılım gösteren ve konakçıdan daha fazla fungal özgülüğü olan ajanlara gereksinim duyulmaktadır (16).

İlk kez 1903 yılında bir sporotrikoz vakasında, iodyidlerin ve 1939'da dermatofitlere karşı griseofulvinin tedavi maksadıyla kullanılmasından sonra, 1950'li yıllara kadar antifungal tedavide pek fazla gelişme olmamıştır. 1950'de nistatin, 1956'da amfoterisin B, 1964'de flusitozin ve 1960'ların sonlarında da azoller antifungal tedavide kullanılmaya başlanmıştır (59).

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 1. kuşak triazolardan terkonazol, itrakonazol ve flukonazol klinik kullanıma girmiştir. Günümüzde bu ajanlara ek olarak yeni triazol, amfoterisin B'nin lipozomal türevleri, ekinokandinler, nikkomisiner, pradimisin ve analogları gibi yeni antifungaller de geliştirilmiştir. Ayrıca, fungal infeksiyon tedavisinde çeşitli antifungallerin ve immunomodülatör ajanların birlikte kullanımı da gündemdedir.

Tedavi seçeneklerinin bu denli genişlemiş olmasına karşın, antifungal ajanların yaygın kullanımı sonucu dirençli fungal patojenler ortaya çıkmıştır (60,61).

6.1. Poliyen Antibiyotikler

Amfoterisin B: 1950'li yılların sonlarına doğru kullanıma giren amfoterisin B, *Streptomyces nodosus*'un bir suşundan elde edilen bir haptendir(62). Parenteral kullanılır. Hücre membranında ergosterole irreversibl bağlanarak hücre permeabilitesini bozar, stoplazmik içerik dışarı sızarak hücre ölümü meydana gelir. Fungusidal etki gösterir(63). Amfoterisin B'nin *C.albicans* üzerindeki etkisinin elektron mikroskopunda incelenmesinde; on ikinci saatte hücre membranının yer yer kesintiye uğrayarak por yapılarının oluştuğu ve hücrelerin düzgün yapısını kaybettiği, hücre duvar yapısının yer yer kesintiye uğradığı ve incelendiği gösterilmiştir. Yirmidördüncü saatte hücre duvar ve membran yapılarında incelme ile stoplazmalarında organel kaybı gözlenmiş, çoğalma şekli olan tomurcuklanmaya (budding) rastlanmamıştır (64).

Antifungal spektrumu nistatinden daha geniştir. Sistemik ve lokal kandidiaziste kullanılır. Sistemik kandidiazis ile aspergillozis, mukormikozis, kriptokokkozis, koksidiomikozis, dissemine histoplazmozisde en sık tercih edilen ilaçtır. Oral kullanımda emilimi iyi değildir, metabolize olmaz ve lipidten zengin dokularda birikir, uzun süre az miktarda idrar ve safrayla atılır. Yarı ömrü on dört gündür (62).

Tedavi sırasında nefrotoksisite görülebilir. Ayrıca ateş, titreme, hemoglobin konsantrasyonunda azalma, tromboflebit, nörotoksisite, kardiyotoksisite gibi yan etkileri de mevcuttur. Amfoterisin B'nin ateş, üşüme gibi yan etkileri prostoglandin veya Tümör Nekrozis Faktör (TNF) salınımına; böbreklere olan yan etkisi ise, ilacın direkt olarak böbrek kan akımını azaltması ve tübül fonksiyonlarına etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır (62,65).

Amfoterisin B, böbrekten atılan siklosporin ve aminoglikozit türevi ilaçlarla etkileşime girebilmektedir (62).

Klasik amfoterisin B'nin etki spektrumunu değiştirmeden yan

etkilerini azaltan lipozomal formülasyonlar geliştirmiştir. Lipid formülasyonların nefrotoksik etkilerinin belirgin olarak azalmasında etkili olan mekanizmalar; lipozom ile taşınan amfoterisin B'nin seçici olarak fungal hücrelere transfer edilmesi, lipozomal amfoterisin B'nin HDL'ye klasik amfoterisin B'den daha fazla bağlanması olarak özetlenebilir. İnfüzyona bağlı yan etkileri oluşturan monosit ve makrofajlardan TNF-a, İL-1, IL-6 salgılanması, amfoterisin B'nin lipozomal yapılar ile çevrenmesi ile azalır. Güvenle kullanılan ilaçlar olmakla birlikte çok pahalı olmaları kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktördür (66). Amfoterisin B'nin lipozomal formları:

Amfoterisin B Lipid Kompleks (ABLC): Lopez-Berstein tarafından geliştirilen bu molekülde 7:3 molar oranda dimiristoyl-fosfotidilkolin ve dimiristoyfosfatidilgliserolün oluşturduğu şerit şeklinde kompleks yapılarıdır. Bu komplekste lipozomal olan ve olmayan çift tabakalı lipit yapılar bulunur. Önerilen doz 5mg/kg/gün'dür. Klasik amfoterisin B ile in vitro ve in vivo aynı etkiye sahip olup nefrotoksik etkisi belirgin olarak düşüktür (67).

Amfoterisin B Kolloidal Dispersiyon (ABCD): Amfoterisin B ile sodyum kolesteril sülfatın 1:1 oranında birleşmesi ile oluşturulmuş bir lipid formülasyondur. Multilameller bir yapıya sahiptir. Önerilen doz, 3-6 mg/kg/gün'dür. İnsanlarda diğer lipid formülasyonlara göre daha az çalışılmıştır. İnfüzyon ile ilişkili yan etkiler %86'ya kadar çıkmaktadır. Bundan kaçınmak için infüzyon hızı yavaş olmalı ve premedikasyon uygulanmalıdır. Nefrotoksik etki, klasik amfoterisin B 'ye göre oldukça düşüktür (66).

Lipozomal Amfoterisin B (LAB): Lipozomal amfoterisin B, uniform, sferik unilameller lipid veziküllerden oluşur. Bu çift katlı lipid tabaka kolesterol ile stabilize edilmiş distearoyl-fosfotidilgliserol ve hidrojenlenmiş soy fosfotidilkolin ile amfoterisin B nin kombine edilmesinden oluşur. İn vitro aktivitesi klasik amfoterisin B ile aynıdır. Önerilen doz 3-5mg/kg/gün'dür. Nefrotoksik etkisi klasik amfoterisin B 'den daha düşüktür (68).

Lipid Emülsiyonda Amfoterisin B: Amfoterisin B'nin %20'lik lipid içinde

verilmesi ile ilgili geniş kapsamlı çalışmalar yoktur.

Nistatin: Duyarlı fungusların stoplazmik membranındaki sterole bağlanarak bu yapının harap olmasına ve esansiyel metabolitlerin kaybına yol açar. *Aspergillus*, dermatofitler ve bazı dimorfik funguslara etkilidir. Toksisitesinden dolayı parenteral olarak kullanılamaz. Mukokutenöz kandidiaziste topikal ve gastrointestinal kandidiaziste oral olarak uygulanır. İlacın sistemik kullanımına potansiyel sağlamak üzere lipozomal nistatin ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (16).

6.2.Primidin Sentez İnhibitörleri

Flusitozin: Antifungal etkinliği ilk kez 1963 yılında kandidiazisin hayvan modelinde kullanılmıştır. Primidin metabolizmasını bozarak fungal hücrede RNA ve protein sentezini engellemiş olur. Sitozin permeaz aracılığıyla fungal hücreye girer ve burada sitozin deaminaz ile 5-florourasile dönüşerek RNA ile etkileşir. Aynı zamanda 5-Florourasilin metaboliti DNA sentezinde rol oynayan timidilat sentetazı inhibe eder. Sitozin permeazın eksik olduğu memeli hücresindeki flusitozin, 5-florourasile dönüşemeyeceğinden ilaç seçici olarak mantarlara toksik etki gösterir. Suda çözünebilir ve oral olarak verildiğinde yüzde 80-90 oranında emilir. Yarı ömrü dört saattir. Böbreklerden % 90 oranında değişikliğe uğramadan atılır(62).

Etki spektrumu kandida türlerini, *C.neoformans* ve *Aspergillus* türlerini içerir. Yan etkileri doza bağımlıdır. Düşük dozlarda bulantı, kusma diare, baş ağrısı, karaciğer enzimlerinde yükselme görülür. Flusitozin yüksek kan düzeylerinde belirgin kemik iliği toksisitesi gösterir. Antifungal etki gücü amfoterisin B' ye göre daha zayıftır ve genelde diğer antifungaller ile kombine şekilde kullanılır. Primer direncin en yoğun olarak görüldüğü ajan flusitozindir (62,65).

6.3. Azoller

Azoller iki grup altında incelenir:

1. İmidazoler: Klotrimazol, Mikonazol, Ketokonazol
2. Triazoller:

Birinci kuşak triazoller: Flukonazol, İtrakonazol

İkinci kuşak triazoller:Vorikonazol, Posakonazol, Rovukonazol

Triazollerin imidazolerden üç noktada üstünlükleri vardır().

1. Daha yavaş metabolize edilirler ve daha uzun süre etkilidirler.
2. İnsan hücreesindeki sterollere daha az etkilidirler. Direkt toksik etkileri zayıftır.
3. Endokrin yan etkileri yoktur.

Azollerin etkisi lanosterolün ergosterole dönüşümünden sorumlu olan sitokrom P450'ye bağımlı olan 14 α -demetilazı inhibe etmek yoluyla olur. Bu süreç fungal organizmalar için gerekli ergosterolü azaltır. Sterol birikmesine fungal hücre metabolizması dayanamaz (fungustatik). Ayrıca endojen respirasyonun inhibisyonu, membran fosfolipitleri ile toksik etkileşim, mayaların miçel forma dönüşümünün inhibisyonu diğer etki mekanizmalarını oluşturur. İnsan hücrelerindeki sitokrom P-450 enzimi ile etkileşime girerek bazı metabolik olaylarda bozulmaya yol açarlar. Adrenal ve gonad steroid hormonlarının sentezini bozarlar. Azollerin in vitro etkinlikleri her bir ajanda değişiktir ve klinik etkinlikleri ile tam korelasyon göstermez (65). Azollerin teratojenik olduğu da bildirilmiştir (62).

Ketokonazol:1978'de keşfedilen ketokonazol oral emilimi, normal mide asiditesinde iyi olan, geniş spektrumlu, düşük toksiteli bir ilaçtır. Eliminasyon yarı ömrü dokuz saattir. Enterohepatik sirkülasyonda metabolize edilir. Kandidalarda maya şeklinin lökositler tarafından fagositoza daha az elverişli olan pseudohif şekline dönüşümünü azaltarak da antifungal etki oluşturur. Aktif üreme dönemindeki mantarlara etkili olduğundan yeterli süre tedavi yapılmamışsa nüks kaçınılmazdır. Hepatotoksik olabilmektedir. Ayrıca testesteronu, ACTH uyarımına bağlı kortizol yanıtını ve sentezini baskılayarak endokrin yan etkilere (impotans, oligospermi, libido azalması, jinekomasti, menstruel düzensizlik) neden olabilmektedir (62,65,69).

Siklosporinin metabolizmasını inhibe eder, rifampinle birlikte ketokonazolün metabolizması hızlanarak kan düzeyi düşer. Sisaprid, astemizol veya terfenadin ile kullanımı kardiak aritmi riskini artırır. Antiasitler, simetidin ve ranitidin mide pH'sını artırarak ilacın emilimini azaltırlar (62).

C. albicans ergosterol içerdiği için, *C. pseudotropicalis* ve *C. tropicalis*'ten daha duyarlıdır. *C. glabrata* ise orta derecede duyarlı veya dirençlidir (61).

Flukonazol:1981 yılında imidazol çekirdeğinin değiştirilmesiyle elde edilmiştir. Suda çözünür, oral ve parenteral olarak kullanılır. Yüksek kan düzeyine ulaşır ve BOS dahil tüm dokulara iyi dağılır. İyi tolere edilir ve yan etki insidansı çok düşüktür. En sık gastrointestinal yan etkiler görülür. Özellikle kanserli ve AIDS hastalarının, orofaringeal ve özefageal kandida tedavisinde en etkili ajanlardan biridir(62). Ancak AIDS hastalarının % 33'ünde flukonazole dirençli *C.albicans* tespit edilmiştir ve çoğunda diğer azollere de çarpaz direnç mevcuttur (70,71,72,73).

Vajinal kandidiaziste de çok etkilidir. Kandidemili nötropenik olmayan hastalarda amfoterisin B kadar etkilidir. Aspergillus dışında geniş etki spektrumuna sahiptir. Suda eriyebilirliğinin yüksek olması, plazma yarılanma ömrünün uzun olması ve toksisitenin az olması nedeniyle yaygın kullanımı sonucunda, öncelikle *C.krusei* ve *C. glabrata* türlerinde olmak üzere *C.albicans*'ta da primer direnç ortaya çıkmaktadır (61).

İtrakonazol:1986'da keşfedilen itrakonazol geniş antifungal spektrumuna sahip bir ajan olmakla birlikte yan etkileri flukonazolden daha fazladır. Suda çözünmeyen bir triazol türevidir. Midenin asit ortamında absorpsiyonu artar. Ketokonazolden daha iyi tolere edilir. Yan etkileri daha çok bulantı, kusma şeklindedir. Trigliseritlerde artma, hipopotasemi, transaminazlarda yükselme, deride lekelenme, aldosteron benzeri etki, periferik ödem ve hipertansiyon diğer yan etkileridir (62).

Parenteral formunun olmaması, oral emiliminin güvenilirlik sorunu ve sabit kan konsantrasyonuna yavaş ulaşması tedavide kullanımını kısıtlamaktadır. Hepatik mikrozomal enzimlerin aktiviteleri üzerine etki ederek, bazı ilaçların metabolizmalarında azalmaya ve toksisitelerinde artmaya neden olurlar. Sisaprid, astemizol veya terfenadin ile aritmi riski artar (62).

Vorikonazol (UK-109,496):Son yıllarda geliştirilen ikinci jenerasyon triazolardan ilk FDA onayı alan ajandır. Flukonazolün sentetik bir türevidir.

Flukonazole oranla daha geniş antifungal spektrum elde etmek üzere, triazol halkalarından birinin florinlenmiş bir pirimidin ile yeri değiştirilmiş ve bir alfa metil grubu eklenmiştir. Bu değişikliklerin sonucunda daha güçlü, daha geniş spektrumlu yeni bir triazol olan vorikonazol elde edilmiştir (74). Ergosterol sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve flukonazolden çok daha etkin olduğu bildirilmiştir (75). Oral ve parenteral kullanıma uygundur. Yüksek oral biyoyararlanım ve yüksek dağılım hacmine sahiptir. Yüksek biyoyararlanım intravenöz ve oral kullanım arasında geçiş yapma imkanı sağlar. Atılım sitokrom P450 sistemi ile karaciğerden olur (76).

Aspergillus ve *Kandida* türleri başta olmak üzere birçok maya ve küf çeşidine karşı yüksek in vitro etkinlik gösterir. Oral formülasyonun yüksek biyoyararlanımı (%96) vardır. İnvaziv aspergilloz, ciddi kandida infeksiyonları, kandida özefajiti, *Scedosporium*, *Fusarium* türleri ile olan refrakter infeksiyonların tedavisi için onay almıştır. Endike olduğu ciddi mantar infeksiyonlarının primer tedavisi için kullanılacak bir antifungaldir (74).

Flukonazole dirençli *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* izolatlarına daha güçlü etkinlik göstermiştir. Bununla beraber flukonazole dirençli izolatlarda vorikonazol MİK değerleri, flukonazole duyarlı izolatlara göre daha yüksektir. Diğer taraftan flukonazole duyarlılığı azalmış *C. tropicalis*'in vorikonazole çapraz direnç gösterdiği görülmektedir (77).

Posakonazol (SCH 56592):İtrakonazolün hidroksillenmiş analogudur. Oral ve topikal formlar halinde hazırlanmıştır. *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus flavus*'a karşı itrakonazolden 10 kat daha güçlü 14 alfa demetilaz inhibisyonu yapar. *Candida spp*, *C. neoformans*, *Aspergillus spp* başta olmak üzere dimorfik funguslara, dermatofitlere, *Zygomyceteslere*, *Fusarium spp.*'ne karşı güçlü ve geniş spektrumlu etki gösterir. Çalışmalar faz I aşamasındadır.

Diğer yeni azol bileşikleri: Ravukonazol (BMS-207147), Syn-2869, TAK-187, T-8581, UR-9746, UR-9751, D0870 (75).

6.4. Alilaminler

Bu bileşikler ergosterol sentezinde anahtar enzim olan squalen

epoxidase enziminin reversibl nonkompetitif inhibitörüdür. Skualen birikimi ve ergosterol eksikliği membran fonksiyonlarının kaybına neden olur. Klinikte topikal uygulanan naftitin ve terbinafin mevcuttur. Terbinafinin invaziv mikozların tedavisinde kullanılması için oral preparatları araştırılmaktadır (62).

6.5. Morfolinler

Alilaminler gibi sentetik ajanlar olup, ergosterol sentez yolunda enzim inhibisyonu ile etkilidir. Amorolfın bu gruptaki tek ilaç olup topikal olarak kullanılmaktadır (66).

6.6. Ekinokandinler

Siklik lipopeptid yapıda, fungusitik antifungal ajanlardır ve memelilerde bulunmayan 1,3 β -glukan sentaz enzimini nonkompetatif olarak inhibe edip hücre duvarı sentezini önler. Birçok ekinokandin araştırma evresinde olup en ileri evrede olan ajan anidulafungin (LY-303366)'dir. Hayvan modellerinde, in vivo ve in vitro deneylerde kandida üzerinde etkinliğe sahiptir (61,62).

6.7. Pnömokandinler

Ekinokandin lipopeptidler sınıfından, onların analoğu olup etki mekanizması da aynıdır. *Pneumocystis carinii*, *Candida spp.* *Aspergillus* karşı etkindir. Bu grupta kaspofungin (L-7438729) bileşiği bulunmaktadır (62).

6.8. Pradimisinler-Benanomisinler

Fungisidaldir ve kalsiyuma bağlı olarak hücre duvarı mannopteinlerine bağlanır, ozmoza duyarlı lizise yol açarlar. İntrasellüler K⁺ dışarı sızar. Fungal hücre membranının stabilizasyonunu bozarlar (62).

6.9. Nikkomisinler

Memeli hücrelerinde olmayan hücre duvarı sentezi için gerekli kitin-sentazı kompetatif olarak inhibe ederler. Nikkomisin Z (SP-92,00704) azollerle kombine kullanıldığında *Candida spp.*, *C.neoformans* ve *Aspergillus* karşısında sinerjistik etki gösterdikleri saptanmıştır (61,62).

6.10. Sitokinler

İnterlökin (IL)1,3,6,10 deneysel ve klinik çalışmalarda, hücrelerin mikrop

öldürücü etkinliğini artırdığı için, immun yetmezlikli hastalarda sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

Günümüzde yeni ilaçların geliştirilmesi için; *C.albicans*'tan soyutlanan DNA topoizomeraz 1 enzimine, mantar hücrelerinde protein sentezinde rol alan elongasyon faktör 3'e ve mantar virülans genlerine yönelik araştırmalar sürmektedir (78).

6.11. Aktif ve Pasif İmmünizasyon:

Mantar infeksiyonlarının önlenmesinde poliklonal veya monoklonal antiserumlarla pasif immunizasyonun olabileceği düşünülmektedir.

Aktif immünizasyon için aşı yapılabilir. Aşılamada en büyük amaç mantarların tropizm gösterdikleri gastrointestinal veya respiratuvar yolların mukozal yüzeylerindeki sekretuar immunitenin istenilen düzeye ulaşmasını sağlamaktır. Bu amaçla oral yolla kullanımı kolay, gerekli uyarıyı yapabilen güvenli aşılamada konusunda araştırmalar devam etmektedir. Geliştirilecek aşı ile mukozadaki lenfoid dokuya antijenler tanıtılmalı, perifer bölgeler stimule edilmeli ve farklı mukozal bölgelerde bağımsız olarak koruyucu sekretuar immun yanıt sağlanmalıdır (79).

7. Antifungal İlaçlara Direnç Mekanizmaları

Amfoterisin B direnci: *C.lusitania*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* türlerinde direnç bildirilmiştir. Mantarların hücre membranlarındaki ergosterol sentezini azaltarak, amfoterisin B'ye dirençli hale geldikleri düşünülmektedir(62).

Flusitozin direnci: Direnç gelişimi önemli bir problem olup en önemli nedeni ilacın tek başına kullanımınıdır. Direnç ya ilacın metabolize olmasına ya da pirimidin biyosentezinin feedback kontrolünün yetersizliğine bağlıdır. Sitozin deaminaz enziminin defektine bağlı primer direncin en sık görüldüğü ilaçtır. *C.albicans* ve *C. glabrata*'da yüzde 7-10, diğer kandida türlerinde yüzde 21 oranında dirence rastlanmaktadır(61). Kazanılmış direnç ise *C. albicans*'taki metabolitlerin sentezinde rol oynayan Urasil fosforibozil transferaz enzimidaki defekte bağlıdır (71).

Azollere direnç: Azol direncinde çeşitli mekanizmalar rol oynar. Bunlar:

1. Klinik faktörler: Düşük doz, aralıklı kullanım ve profilaksi nedeniyle uzun

süre kullanım direncin ortaya çıkmasında önemli yer tutar. İlacın kümülatif dozu, fungustatik olması ve suşa karşı ilk MİK değeri diğer etkenlerdir. Zayıf immun sistem, altta yatan hastalık, antidepresan ilaç kullanımı, ilaç protokolüne uyumsuzluk ise yardımcı faktörleri oluşturur.

2. Hücresel faktörler: Kişinin doğal dirençli endojen suşlar ile kolonize veya infekte olması direnç gelişiminde son derece önemli yer tutar. Azol tedavisi duyarlı suşun dirençli suş ile yer değiştirmesine veya suşta mutasyon oluşturarak yada geçici gen ekspresyonuna neden olarak direnç gelişimine yol açmaktadır. Suşta hücresel direnç tanımı, izolata karşı ilaç MİK değerinin tedavi süresince gittikçe artıyor olmasıdır.

3. Moleküler mekanizmalar: Amfoterisin B, etkisini fungal membranın temel sterolü olan ergosterolü bağlayarak gösterir (fungusidal). Azoller ise hücre içine girmek zorundadırlar ve ergosterol sentezinde yer alan anahtar enzim olan lanosterol 14 α -demetilazı inhibe ederler (fungustatik). Dirençli suşlar,

a. Membranın sterol komponentinde değişiklik yaparak ilaç girişini azaltırlar. Bu şekilde amfoterisin B'ye de direnç gelişmiş olur.

b.14 α -demetilaz enzimini kodlayan ERG 16 geninde spesifik nokta mutasyonları oluşturarak enzimin yapısını değiştiriler ve ilaç enzimi tanıyamaz.

c.Gende amplifikasyon ve ekspresyon artmasına yol açarak aşırı miktarda 14 α -demetilaz enzimi oluşumuna ve ilacın bu miktardaki enzimi inhibe edememesine sebep olurlar.

d.Ergosterol sentezinde yer alan diğer enzimlerde değişiklikler oluştururlar.

4. İlaç atımındaki artış: Çoklu ilaç atım pompaları ilaçların ve küçük moleküllerin hücre içi konsantrasyonlarını azaltmaya yönelik çalışırlar. Dirençte majör rol oynayan bu faktörler iki tiptir: ABC transporter'lar, bir transmembran poru ile iki adet ATP bağlayan kasetten oluşur. Hem azollerin hem de diğer ilaçların transportunda rol alır. Majör facilitatör ise tek bir transmembran porundan oluşur ve sadece flukonazol atımında rol oynar. Bu sistemlere ait gen ekspresyonunun artışı sonunda ilacın dışarı atılma hızı ve miktarı artmakta, direnç gelişimi izlenmektedir.

Dirençte bu mekanizmalardan başka bilinmeyen, birbirinden farklı çok sayıda mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir (72,73).

8. Antifungal Duyarlılık Testleri

Bilindiği gibi 1950'li yıllarda kullanıma giren amfoterisin B'nin yeri tartışmasız olmasına rağmen son yıllarda *C.lusitaniae*, *Trichosporon spp.* gibi mayalarda amfoterisin B'ye karşı direnç gelişmesi ile triazol grubu antifungallerin profilaksi ve tedavide kullanımı artmış ve böylece daha az patojen ama dirençli olan *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* gibi maya türleri, sistemik patojen olarak görülmeye başlamıştır. Böylece antifungal ilaçların etkinliğini ölçmede in vitro duyarlılık testlerinin önemi artmıştır. Bu testler;

1. İki ya da daha fazla ajanın aktivitelerinin güvenilir olarak ölçülmesini sağlamalıdır.
2. İn vivo aktivite ile uyum göstermeli ve tedavi sonuçlarını ölçebilmelidir.
3. Duyarlı organizma topluluğu içindeki direnç gelişiminin takibini sağlamalıdır.
4. Yeni geliştirilen deneysel ajanların tedavi edici güçlerini ölçebilmelidir.

Tedavide doğru yönlendirmeyi yapabilen en güvenilir metodolojiyi geliştirmek amaçlanmakta ancak bu durum antimikrobik ilaçlardaki kadar kolay olmamaktadır(10). Son yirmi yıla kadar sistemik tedavi gerektirecek mantar infeksiyonlarının çok nadir olması ve amfoterisin B dışında bu amaçla kullanılacak fazla bir seçeneğin bulunmaması bu durumun en önemli nedenidir. Ciddi derin mikoz insidansının ve bu mikozlara yol açan mantar türlerindeki çeşitliliğin artmasıyla, terapotik ajanlardaki seçenekler, antifungal ilaç direncini gösterebilecek güvenilir in vitro metodların gereksinimini doğurmuştur (63).

Mayalar ile ilgili duyarlılık testlerinde standardizasyon çalışmaları 1982 yılında NCCLS ' ye bağlı bir antifungal duyarlılık testleri alt komitesi kurulması ile başlamıştır. Bu komite, 1992 yılında ilk referans yöntem olarak makrodilüsyonu kabul ederek, etkili olacak faktörleri standart hale getirdiği M27-P belgesini yayınlamıştır (14). Sonraki yıllarda kalite kontrol suşları belirlenmiş ve mikrodilüsyon yöntemi M27-T belgesi ile bildirilmiştir.

1997 yılında ise kullanılmakta olan antifungal ajanlar için duyarlılık ve direnç sınırları belirlenerek mikrodilüsyon yöntemi için M27-A ve 2002 yılında M27-A2 belgeleri sunulmuştur (12,13).

Bu referans yöntemin yalnızca kandida türleri ve *C. neoformans* için standardize edildiği, difazik yada küf mantarları için uygun olmadığı, ayrıca in vitro sonuçlarla hastanın tedaviye yanıtı arasında kesin bir korelasyonun bulunmadığının mutlaka bilinmesi gerekmektedir (9).

İn vitro duyarlılık testleri çok sayıda teknik değişkenden etkilenen antifungal ajanlar ile yapılır. Bu değişkenler; inokulum büyüklüğü ve hazırlanması, besiyeri içeriği, pH'sı, şekli ve inkübasyon ısısıdır. Ayrıca MİK değerini belirleme yöntemi, antifungal ajanların çözünürlük dereceleri, kimyasal stabiliteleri, belli konsantrasyonlar üzerinde bölgesel inhibisyon yapma özellikleri de değişken olarak düşünülmelidir (12,80).

Antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gereken durumlar (81):

1. Etkin mikroorganizmaya etkili olduğu bilinen antifungal ilaç ile tedaviye yanıt alınamaması,
2. Alternatif ilaçların araştırılmasının gerekliliği ve özellikle seçilen ilaca karşı mantarın direnli olduğunun bilinmesi (örn: *C.lusitaniae* ile amfoterisin B gibi),
3. Flusitozin ile tedavi yapılması (direnç sıklıkla görülmektedir) ,
4. Yeni ilaçların kullanılması,
5. Ağır immun sistem yetmezlikli (nötropeni v.b) hastalarda sistemik infeksiyon gelişimi,
6. İn vitro ve in vivo uyumun belirlenmesinin amaçlanması durumlarında antifungal duyarlılık testleri uygulanmalıdır.

Tablo 3. Antifungal Duyarlılık Testleri (80,82)

YÖNTEMLER	MİK DEĞERLERİNİN ÖLÇÜLMESİ
Buyyon makrodilüsyon	Görsel (1:5 kontrol üreme bulanıklığı ile karşılaştırma), ATP fotometre, bulanıklığı ölçme (turbidometre), kolorimetre, radyometre, kuru ağırlık
Buyyon mikrodilüyon	Görsel (kontrol üreme bulanıklığı ile karşılaştırma) ATP fotometre bulanıklığı ölçme (turbidometre), kolorimetre, radyometre, kuru ağırlık
Kolorimetrik buyyon mikrodilüsyon	Renk değişiminin görsel izlenmesi
Agar dilüsyon	Görsel
Agar difüzyon	
Disk	Görsel (zon çapı ölçümü)
E test	Görsel (inhibisyon zonu)

Yapılan çalışmalarda antifungal tedavi başarısını belirlemede konağa ilişkin faktörlerin önemli rolü olduğu görülmüştür. Hastanın altta yatan hastalığı, CD4 sayısı, ilacın dozu, veriliş süresi, veriliş yolu gibi faktörler de in vitro uyumu etkilemektedir(80,83). Bununla beraber her ne kadar düşük MİK değerleri başarılı sonuçların garantisi değilse de, yüksek MİK değerleri de başarısızlığın göstergesi değildir. Klinik açıdan ilaç direncinin önceden haber verilmesi, hassasiyetin önceden haber verilmesinden çok daha önemlidir (83).

8.1. Mikrodilüsyon Testi

Şu anda CLSI tarafından maya mantarları için 2002 yılında yayınlanmış bir standart yöntem (M27-A2) olan mikrodilüsyon kullanılmaktadır (12). Mayalar için standart yönteme ilişkin parametreler tablo 4’de gösterilmiştir(84).

Standart bir yöntem önerilmesine rağmen henüz antifungal duyarlılık

sonuçları ile ilgili sorunlar bitmemiştir. Klinik kandida suşları için flukonazol, itrakonazol ve flusitozin için MİK direnç sınır değerleri belirlenmiştir. Ancak amfoterisin B için bu değerler henüz kesinlik kazanmamıştır. Bunun nedeni, standart yöntemin amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli suşları ayırd etmekte yetersiz kalmasıdır. Genellikle kandidiyazisli olgulardan izole edilen suşlarda flukonazole yanıt açısından in vitro ve in vivo sonuçlar arasında bir korelasyon olduğu saptanmaktadır. Ancak klinik yanıtı belirleyen tek parametre suşun o antifungal için saptanan in vitro duyarlılık durumu değildir. Konak faktörü çok önem taşımaktadır (84).

Tablo4. Mayalar için referans yöntem (NCCLS M27-A2)

Yöntem:	Mikrodilüsyon
Besiyeri:	RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatız, MOPS ile tamponlanmış, ph=7)
İnokulum:	0.5-2.5x10 ³ CFU/ml
Sıcaklık:	35°C
Süre:	48 saat (kandidalar), 72 saat (<i>C. neoformans</i>)
MİK değeri:	Amfotersin B için skor "0" (Üremenin tam inhibisyonu) Azoller ve Flusitozin için skor "2" (Üremenin %80 azalması)
Öneri:	Azoller için mikroplağın okunmadan önce çalkalanması

Diğer mikrodilüsyon testleri:

Alamar mavisi yöntemi: Bir oksido-redüksiyon indikatörü olan alamar mavisi normalde mavi olup, mantar üremesi olduğunda pembe renge dönüşür. Mavi olan son kuyucuk MİK değerini verir(79).

MTT yöntemi: MTT (4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromid) boyası canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar tarafından indirgenerek sarı renkten mor renkli formazana dönüşür. Bu yöntemin mayaların antifungal ajanlara duyarlılığın saptanmasında kullanılabileceği gözlenmiştir (79).

Spektrofotometrik yöntem: Bu yöntemde bulanıklığın kontrole göre amfoterisin B için %90, flukonazol için %50-70 oranında azaldığı çukurlar

MİK olarak kabul edilir(79).

Yapılan çalışmalarda bu üç testin M27-A2 protokolü ile uyumu %80-100 arasında bulunmuştur (79).

8.2. Makrodilüsyon testi

Makrodilüsyon testinin temel prensipleri tablo 5'te gösterilmiştir (12).

8.3. Disk difüzyon testi

Antifungal ajanlarla doyurulmuş disklerin kullanıldığı bu yöntem için kazeinli veya asparaginli yeast nitrojen glukoz agar besiyerinde 48 saatlik inkübasyon önerilmektedir. Azoller dışındaki antifungaller için kullanılabilir. Çünkü azollerde kısmi inhibisyon ve zon içi üremeler nedeniyle değerlendirme zor olmaktadır(85). M27-A2 protokolü ile uyumu %80 civarında bulunmuştur(32).

Tablo 5: Makrodilüsyon testinin temel prensipleri

Yöntem:	Makrodilüsyon
İnokulum hazırlanması:	0.5 McFarland bulanıklık standardına göre spektrofotometrik ölçüm ile
İnokulum konsantrasyonu:	0.5-2.5 x10 ³ CFU/ml
Besiyeri:	RPMI1640
Tampon:	Morfolinpropansülfonik asit (MOPS) 0.165 M
PH:	7
İnkübasyon ısı:	35°C
İnkübasyon süresi:	48 saat
MİK değeri:	Amfoterisin B: bulanıklığın görülmediği konsantrasyonun saptanması Azoller ve Flusitozin: bulanıklığın %80 azaldığı konsantrasyon

8.4. E test

E test (AB Biodisk, Solna, Sweden) plastik striplere emdirilmiş antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği bir difüzyon testidir. Pahalı olması en önemli dezavantajıdır. M27-A2 protokolü ile uyumunun %70-100 arasında olduğu belirtilmektedir(86).

9. Time Kill (Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği) Yöntemi

Antibiyotik kombinasyonlarının zamana ve konantrasyona bağımlı sidal aktivitelerinin incelenmesinde kullanılır.

Yeni antimikrobik ajanların veya ilaç kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılmasında, diğer in vitro testlerde görülen paradoksal etki, persistans ve tolerans fenomenlerinin doğrulanmasında, tedavide sidal etkinliğin önemli olduğu özel durumlarda tedavi başarısızlığını açıklamada yardımcı bir yöntem olarak uygulanabilmektedir.

9.1. Genel Özellikler

Test suşu antibiyotik içermeyen ve çeşitli yoğunluklarda bir antibiyotik veya antibiyotiklerin kombinasyonlarını içeren sıvı besiyerine aktarılır. İnokulasyon başlangıcında ve bunu takip eden zaman aralıklarında örnek alınır. Canlı organizma sayısı, katı besiyerine pasaj yapılarak belirlenir. Alınan sonuçlar koloni sayısının zaman içindeki değişimini gösterecek şekilde bir grafiğe kaydedilir (81).

Besiyeri olarak bakteriler için katyon eklenmiş Mueller Hinton buyyonu, maya türü mantarlar için RPMI 1640 besiyeri kullanılır. Son inokulum konsantrasyonu bakterilerde 6×10^5 CFU/ml, mayalarda $1-5 \times 10^5$ CFU/ml olmalıdır. İnokulum hazırlanırken kullanılan mikroorganizmalar logaritmik üreme fazda olmalıdır. MİK'un 1/2, 1/4, 1, 2, 4 katı gibi konsantrasyondaki antimikrobik dilüsyonları ile çalışılır. MİK saptama yöntemi makrodilüsyondur. İnkübasyon ısısı 35°C 'dir. Makrodilüsyon tüplerinden alınan örneklerden 0, 4, 8, 24. saatlerde dilüsyonlar hazırlanıp, katı besiyerine ekim yapılır. Değerlendirme katı besiyerinde üreyen koloni sayısına göre yapılır (81,87).

9.2. Yorum

Antibiyotiğin zaman içindeki öldürme (sidal) etkisinden söz edebilmek için koloni sayısında 24 saatte %99.9 yani 10^3 kat ($3 \log_{10}$) azalma görülmelidir. 10^3 katın altındaki azalmalar bakteriyostatik/fungostatik etki olarak yorumlanır.

İncelenen iki antibiyotiğin sinerjist etkisinden söz etmek için önce kombinasyonlardaki antibiyotiklerin daha aktif olanının koloni sayıları kaydedilir. Bu değerlere oranla kombinasyonun 24 saatlik koloni sayısında $\geq 10^2$ kat ($\geq 2 \log_{10}$) düşüş varsa sinerjik olarak tanımlanır; $\geq 10^2$ kat artış antagonizmi, < 10 kat artış veya azalış ise aditif veya indiferan etkiyi gösterir (88).

9.3.Yöntemin Avantajları

1. Mikrodilüsyon yöntemi ile yalnız inhibisyon verileri elde edildiği halde ölüm eğrisi yöntemi ile, denenen ilaç yada kombinasyonun sidal aktivitesi ölçülebilir. Bu nedenle sidal amaçlı tedavi takipleri için daha anlamlı bir yöntemdir.
2. Mikrodilüsyon yönteminde 16-20 saat sonunda tek ölçüm yapıldığı halde, bu yöntemde zamanla birlikte değişen etki dinamik olarak gösterilebilmektedir (88).

9.4. Yöntemin dezavantajları

1. Standardize değildir.
2. Tekniğe bağlı güçlükler söz konusudur.
3. Bu yöntem ve mikrodilüsyon yöntemi ile alınan sonuçlar arasında yüksek oranda uyumsuzluk olduğu bildirilmektedir. Ancak yöntemlerden biri inhibitör diğeri sidal aktivite ile ilgili olduğu için bu doğal karşılanmalıdır. Mikrodilüsyon yönteminde, Fraksiyonel Bakterisidal Konsantrasyon değerlerinin kullanılması ile uyum oranının artırılabilirdiği öne sürülmektedir.
4. Bu yöntem ile 8 saatte sinerji saptanmasına karşın 24 saatte değerlendirildiğinde mikroorganizmaların yeniden ürediği görülebilmektedir. Bu durum ilaçların inaktivasyonuna, dirençli mutantların seleksiyonuna, tüpün kenarına tutunan mikroorganizmanın besiyeri ile temas sonucu yeniden üremesine bağlı olabilir (81).

III.GEREÇ VE YÖNTEM

1. İzolatlar

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2005-2006 yılları arasında, yatan hastaların invaziv infeksiyonlarından izole edilen 100 *Candida albicans* suşu çalışmaya alınmıştır. Birden fazla kültüründe üremesi olan hastaların sadece bir suşu çalışmaya alınmıştır. Suşlar 18 kan kültürü, 10 balgam kültürü, 3 katater kültürü, 8 ETA (endotrakeal aspirat) kültürü, 61 idrar kültüründen izole edilmiştir.

2. İzolasyon ve Tür Tayini

Kandidaları kan kültürü örneklerinden izole etmek için üreme olduğunu gösterir sinyal veren Bac-Tec şişelerinden kanlı agar ve EozinMetilenBlue (EMB) plaklarına pasaj yapıldı. Kültür ekimlerinde üreyen şüpheli kolonilerden lam lamel arası direk preparat hazırlandı ve ışık mikroskopunda 400x büyütmede incelendi. Maya hücreleri görülen kolonilerden SDA'a pasaj yapıldı. SDA'da 24-48 saat inkübasyondan sonra 0.5-1 mm çapında beyaz veya krem renkli ve kendine özgü maya kokusu olan koloniler görüldü.

Balgam, katater, ETA ve idrar örneklerinden kandidaları izole etmek için SDA besi yerine ekimi yapıldı. 37°C'de bir hafta inkübe edildi. Üreme olan plaklarda koloniler 24-48 saatte görünür hale geldi. Üreyen şüpheli kolonilerden lam lamel arası direk preparat hazırlandı ve ışık mikroskopunda 400x büyütmede incelendi. Maya kolonileri tespit edildi.

Maya kolonilerinden germ tüp testi ve piringç besiyerine ekim ile *C. albicans* suşları belirlendi. İdentifikasyon sonuçları API 20C AUX Sistemi ile doğrulandı.

İzolatlar %15 gliserinli buyyon içeren ependorflarda -20°C'de saklandı. Duyarlılık çalışmasında önce SDA'ya pasaj yapıldı. Çalışmadan bir gün önce saf üreme saptanan besiyerlerinden tek koloni alınarak SDA'a ikinci bir pasaj yapıldı. Suşlar çalışmaya 24 saatlik inkübasyondan sonra alındı.

Germ Tüp Testi: 0.5 ml insan serumu içerisine test edilecek koloni eklenip karıştırıldı, 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lam

lamel arası preparat hazırlanıp 400x büyütmede incelendi. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık olmayan filament şeklindeki yapılar germ tüpü olarak değerlendirildi. Germ tüpü testi pozitif olan maya suşları *C. albicans* olarak tanımlandı (8).

Pirinç Besiyerine Ekim: Test edilecek koloniden iğne öze ile bir parça alınıp besiyeri üzerine birbirine paralel çizgiler halinde ekim yapılarak ekim alanının üzeri steril bir lamelle kapatıldı. 27°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra mikroskopta 400x büyütmede mikroskopik morfolojik özellikler incelendi. Klamidospor oluşturan koloniler *C.albicans* olarak tanımlandı. Hif ve pseudohif yapma özellikleri belirlendi(26).

API 20C AUX Sistemi: Klasik yöntemlerle identifikasyonu yapılan suşların sonuçlarının doğrulanması için ticari kitlerden API 20C AUX (BioMerieux, France) kullanıldı.

Testin Uygulanması:

1. Stripin hazırlanması: İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu, strip paketi açılarak içine yerleştirildi.
2. İnokülasyon: SDA'daki 24 saatlik kandida kolonilerinden steril bir öze ile alındı, 2ml'lik Suspension Medium (%0.85NaCl) içinde karıştırıldı, yoğunluğu 2 McFarland'a ayarlandı. Bu süspansiyondan, kit içeriğinde olan C medium içine 100 mikrolitre aktarıldı. Yeni karışımdan strip içindeki kuyucuklara dolacak fakat taşmayacak şekilde dağıtıldı. Strip inkübasyon kabının içine yerleştirilip, kapağı kapatıldı. 30°C'de 24-72 saat inkübe edildi.

Stripin okunması: Bulanıklık olan kuyucuklarda üreme pozitif kabul edildi. Testin geçerliliği için negatif kontrolde üremenin olmamasına dikkat edildi.

Özellikle glukoz kuyucuğunda üreme olmamışsa inkübasyon süresi 24 saatten 72 saate kadar uzatıldı. Üreme olan kuyucuklar not edildi. Sonuçta mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri 24., 48. ve 72. saatte değerlendirildi.

3. İdentifikasyon: Test prosedürüne göre üreme olan kuyucuklara değerlendirme cetvelinde 1,2,4 gibi numaralar verildi. Her bir grup içindeki sayılar toplandı ve sayısal profil elde edildi. Hif oluşumu durumunda da 4

sayısı eklendi. Elde edilen sayısal profil, API 20C AUX Analytical Profile Index'e göre değerlendirildi (API 20C AUX, bioMerieux, France, Kit prosedürü).

3.Mikrodilüsyon Yöntemi İle Antifungal Duyarlılık Çalışması

Mikrodilüsyon ile antifungal MİK belirlenmesi NCCLS M27-A2'ye göre yapıldı (13). Kontrol suşu olarak *Candida albicans* ATCC 90028 suşu kullanıldı.

RPMI Besiyerinin Hazırlanması

Malzemeler (1 litre RPMI için):

1. Besiyeri: 10.4 g RPMI 1640, bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü (Sigma Chemical Co, St Louis, MÖ, USA)
2. Tampon tuz: 34.53 0.165M MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid) (Sigma Chemical Co, St Louis, MÖ, USA)
3. Distile su: 1000 ml
4. 10 N NaOH: 10 N NaOH hazırlamak için 100 ml içine 40 g NaOH (50 ml'ye 20g veya 25ml'e 10 g olabilir) eklendi, balon joje içinde karıştırılarak çözüldü. (1 litre RPMI için yaklaşık 5 ml 10 N NaOH gerekiyor.)
5. pH metre
6. Manyetik karıştırıcı
7. 1.5 litrelik silindirik mezür
8. Filtrasyon için gerekli malzeme: 0.22µm'lik Millipore® filtre
50 ml'lik enjektör
100'er ml alabilecek 10 adet steril şişe
9. Süzme sonrası sterilite kontrolü için kanlı agar plakları
10. Steril kapaklı şişeler

İşlemler:

1. Silindirik mezür içine 950 ml distile su koyuldu.
2. 34.53 g MOPS eklendi.
3. 10.4 g RPMI eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
4. 10 N NaOH eklenerek pH 6.9-7.0'a ayarlandı, eklenen NaOH miktarı not edildi.
5. Total hacim 1 litre olacak şekilde distile su eklendi.

6. Filtre ile süzme işlemi dikkatlice yapıldı ve besiyeri steril şişelere dağıtıldı.
7. Hazırlanan besiyerinden kanlı agar plak besiyerine 1 ml ekildi (sterilite kontrol).
8. +4 °Cde saklandı.

Antifungal Stok Solüsyonların ve Dilüsyonların Hazırlanması

Malzemeler:

1. Antifungal ilaç tozları
 - Flukonazol (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
 - Amfoterisin B (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA)
 - Vorikonazol (Pfizer İlaçları AŞ, İstanbul, Türkiye)
2. Organik çözücü: DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) Amfoterisin B ve Vorikonazolü çözmek için gerekli
3. RPMI 1640 besiyeri
4. Steril distile su, Flukonazolü çözmek için gerekli
5. Stok solüsyon hazırlamak için 3 tane büyük boy steril şişe, stok solüsyonları belli miktarlarda bölerek -80 °C'de saklamak için uygun steril tüpler
6. Antifungal dilüsyonları hazırlamak için steril şişeler
7. Üç adet spor
8. Steril mikroplaklar
9. Otomatik tek kanallı ve çok kanallı pipetler ve steril pipet uçları
10. Antifungal ilaç dilüsyonlarını mikroplaklara dağıtırken, çalışma kolaylığı için steril petri kutuları kullanılabilir (3 antifungal ilaç ve 10 dilüsyon için 30 adet, sterilite ve ürenerne kontrol için 4 adet, toplam yaklaşık 35 adet)
11. Amfoterisin B ışıkta bozulduğundan tüpleri kaplamak için alüminyum folyo kağıdı
12. DMSO ile çalışırken korunmak için eldiven
13. Hassas terazi

İşlemler:

1. Antifungal ilaç miktarları

Ağırlık (mg)= [Hacim(ml)xKonsantrasyon(µg/ml)] / Potens (µg /mg)

formülüne göre hesaplandı ve hassa terazide tartıldı.

Amfoterisin B:

Potens: %80 (100mg'da 80 mg, 1 mg'da 800µg; yani potensi 800 µg/ml)

Stok solüsyonun konsantrasyonu: 1600 µg/ml

Hacim: 20 ml DMSO

Ağırlık= (20x1600)/800 = 40mg = 0.040g

Flukonazol:

Potens:%100 (100mg'da 100mg, 1mg'da 1000µg; yani potensi 1000 µg/ml)

Stok solüsyonun konsantrasyonu:1280 µg/ml

Hacim: 20 ml distile su

Ağırlık= (20x1280)/1000 = 25.6 mg = 0.0256g

Vorikonazol:

Potens: %100 (100mg'da 100mg, 1mg'da 1000µg; yani potensi 1000 µg/ml)

Stok solüsyonun konsantrasyonu:1600 µg/ml

Hacim: 20 ml DMSO

Ağırlık= (20x1600)/1000 = 32 mg = 0.032g

2.Amfoterisin B ve vorikonazol DMSO içinde, flukonazol distile su içinde çözdürüldü.

3. Her bir stok solüsyon, birer ml olacak şekilde 20 adet steril tüpe aktarıldı ve -70 °C'de saklandı.

4. Hazırlanıp -70 °C'de saklanan antifungal stok solüsyonlar, dilüsyonlar hazırlanırken yeterli miktarda eridildi. Her bir antifungal ilaç için ayrı ayrı seri dilüsyonlar hazırlandı ve tüpler isimlendirildi.

Amfoterisin B ve vorikonazol için ilk dilüsyon 1/50, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile hazırlandı. 32 - 0.06 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.

Flukonazol için ilk dilüsyon 1/10, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile yapıldı. 128 -0.250 µg/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon elde edildi.

Bu konsantrasyonlar inokulum ile 1/2 tekrar dilüe olacağı için mikroplaktaki son konsantrasyonları yarıya inecektir. (Amfoterisin B ve Vorikonazol: 16-0.03 µg/ml, Flukonazol: 64-0.125 µg/ml)

5. Mikroplağın yatay sıradaki son kuyucuğu (12. kuyucuk) sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 200 µl RPMI kondu.

6. Mikroplağın 11. kuyucuğu üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve 100 µl RPMI kondu. Üzerine 100 µl inokulum eklendi.

7. En düşük ilaç konsantrasyonu 10. kuyucukta, en yüksek ilaç konsantrasyonu 1. kuyucukta olacak şekilde 100'er µl dilüsyonlar otomatik pipetle dağıtıldı.

8. Eğer inokulumlar bu aşamada eklenmeyecekse mikroplaklar -20°C'de saklanmak üzere kaldırıldı ve çalışma öncesinde oda sıcaklığında bir süre bekletildi.

Sonuçta her bir mikroplakta bir antifungal ilacın, 10 dilüsyonu ve her suş çift sıra çalışıldığı için 4 *Candida* susu çalışılabildi.

İnokulum Hazırlanması Ve Eklenmesi

Malzemeler:

1. Her bir suş için 3 adet steril orta boy tüp
2. Her bir suş için 2 ml. serum fizyolojik
3. Her bir suş için 10 ml RPMI besiyeri
4. Otomatik tek kanallı ve çok kanallı pipetler
5. Steril pipet ucu (sarı ve mavi)
6. Her bir suş için bir adet steril petri kutusu (Mikroplaklara daha kolay dağıtılmasını sağlamak için)
7. 0.5 McFarland'lık örnek süspansiyon
8. Spektrofotometre
9. Spor

İşlemler:

1. Her bir suş için üç adet tüp dizildi (A,B,C tüpleri).
2. A tüpüne 2 ml Serum fizyolojik
B tüpüne 4.75 ml RPMI besiyeri
C tüpüne 4.9 ml RPMI besiyeri kondu.
3. A tüpünde, SDA'da bir gece inkübe edilmiş olan kandida suşları ile 0.5 Mc Farland'a uygun süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyon 1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml maya içerdi.
4. A tüpündeki süspansiyondan 0.25 ml alınarak B tüpüne eklendi (toplam

hacim 5 ml oldu, 1/20 sulandırılmış oldu).

5. B tüpündeki süspansiyondan 0.1 ml alınarak C tüpüne eklendi (toplam hacim 5 ml oldu, 1/50 sulandırılmış oldu).

6. Şimdiye kadarki toplam sulandırım $1/20 \times 1/50 = 1/1000$ oldu, mikroplağa eklenince bir kat daha dilüe oldu ve $1/1000 \times 1/2 = 1/2000$ oranında sulandırılmış oldu. İçerdiği maya miktarı ise $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$ CFU/ml oldu.

7. Mikroplaklarda 12. kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 100'er µl inokulum eklendi.

8. Amfoterisin B içeren mikroplaklar alüminyum folyoya sarıldıktan, diğerlerinin de etüvde buharlaşmalarını engellemek amacıyla uygun önlemler (naylon torbaya koymak gibi) alındıktan sonra sıcaklığı 35°C olan etüve kaldırıldı ve 48. saatte sonuçlar değerlendirildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçlar değerlendirilmeden önce mikroplaklar karıştırıcıda iyice karıştırıldı ve kuyucuklardaki bulanıklıklar homojen hale gelince üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklıkla karşılaştırılarak ayna yardımıyla değerlendirildi.

Amfoterisin B için hiç üremenin olmadığı berrak kuyucuk, Flukonazol ve Vorikonazol için üreme kontrol kuyucuğuna göre bulanıklığın % 80 azaldığı kuyucuk MİK değeri olarak belirlendi.

4.Time Kill Yöntemi ile Duyarlılık Çalışması

NCCLS M27-A2'ye göre MİK'ları belirlenen duyarlılıkları farklı 10 suşun Time kill yöntemi ile duyarlılıkları çalışıldı. Bu suşlardan 5'i kan kültüründen, 2'si balgam kültüründen, 2'si idrar kültüründen, 1'i katater kültüründen izole edilmiştir.

Antifungal Dilüsyonların Hazırlanması

Malzemeler:

1. Antifungal ilaçların mikrodilüsyon yöntemi için hazırlanmış ilaç stok solüsyonları:

Flukonazol stok solüsyonun konsantrasyonu: 1280 µg/ml

Amfoterisin B stok solüsyonun konsantrasyonu: 1600 µg/ml

Vorikonazol stok solüsyonun konsantrasyonu: 1600 µg/ml

2. RPMI 1640 besiyeri

3. Antifungal dilüsyonlan hazırlamak için steril şişeler

4. Steril, vida kapaklı plastik tüpler
5. Tüp sporları
6. Otomatik tek kanallı pipetler ve steril pipet uçları
7. Amfoterisin B içeren tüpleri sarmak için aliminyum folyo

İşlemler

1. Hazırlanıp -70°C'de saklanan antifungal stok solüsyonlar, dilüsyonlar hazırlanırken yeterli miktarda eridildi. Her bir antifungal ilaç için ayrı ayrı seri dilüsyonlar hazırlandı ve tüpler isimlendirildi.

Amfoterisin B ve Vorikonazol için ilk dilüsyon 1/50, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile hazırlandı. Amfoterisin B için 32 - 0.06 µl/ml konsantrasyon aralığında 10 farklı dilüsyon, Vorikonazol için 32-0,007 µl/ml konsantrasyon aralığında 13 farklı dilüsyon elde edildi.

Flukonazol için ilk dilüsyon 1/10, sonraki dilüsyonlar 1/2 oranında RPMI besiyeri ile yapıldı. 128 -0.06 µl/ml konsantrasyon aralığında 12 farklı dilüsyon elde edildi. Ayrıca 256 µl/ml ilaç konsantrasyonu elde etmek için flukonazol stok solüsyonu 1/5 oranında RPMI besiyeri ile dilüe edildi.

2. Hazırlanan ilaç dilüsyonları 9'ar ml olarak plastik, steril, vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Üzerlerine içerdikleri ilaç konsantrasyonları yazıldı.

3. Amfoterisin B içeren tüpler, ışıktan korumak için aliminyum folyo ile sarıldı. Hemen kullanılmayacak olan, ilaç içeren tüpler, kullanılına kadar -20°C'de saklandı. Çalışma öncesinde oda sıcaklığında bir süre bekletildi.

İnokulum Hazırlanması, Eklenmesi ve Koloni Sayımı

Malzemeler:

1. Her bir suş için 1 adet steril orta boy tüp
2. Her bir suş için 8 ml steril serum fizyolojik içeren tüp
3. Her bir suş için steril 9'ar ml ilaçlı (suşun 1/4 MİK, 1/2 MİK, MİK, 2 MİK, 4 MİK konsantrasyonlarında ilaç içeren) 5 tüp ve 9 ml ilaçsız RPMI besiyeri içeren 1 tüp
4. Otomatik tek kanallı pipetler
5. Steril pipet ucu (sarı ve mavi)
6. Spektrofotometre
7. Spor
8. Steril boş cam tüpler

9. 80 mm. çaplı plaklara dökülmüş PDA besiyeri
10. Steril serum fizyolojik
11. Ekim için bek ve öze
12. Ekim öncesi tüpteki inokulum ve ilaç dilüsyonunun homojen dağılımını sağlamak amacıyla kullanılan otomatik karıştırıcı (Thermolyne Maxi-Mix III)
13. PDA besiyeri

İşlemler

1. PDA'da iki kez subkültürü yapılmış, 24 saatlik kolonilerden 3-5 tanesine dokunularak 8 ml serum fizyolojik içeren tüplerde 0.5 McFarland yoğunlukta inokulum hazırlandı. İnokulum 1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml maya içerdi.
2. Hazırlanan inokulumdan ilaçlı (1/4 MİK, 1/2 MİK, MİK, 2 MİK, 4 MİK konsantrasyonlarında ilaç içeren) ve ilaçsız 9 ml RPMI içeren tüplere 1'er ml aktarıldı. Bu tüplere eklenen inokulum 1/10 dilüe olduğu için 1×10^5 - 5×10^5 CFU/ml maya içeren başlangıç inokulumu elde edildi.
3. İnokulum ilaçlı ve ilaçsız tüplere aktarıldıktan hemen sonra (0. saat) otomatik karıştırıcıda karıştırıldı ve 0.1 ml örnek 9.9 ml. Serum fizyolojik içine aktarıldı (1/100 seyreltme). Bu tüpler de otomatik karıştırıcıda karıştırılıp, 30 µl 'lik bir hacim PDA plaklarına ekildi.
4. İlaçlı ve ilaçsız tüm tüpler 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondaki tüplerden 4, 8, 24. saatlerde ; flukonazol, vorikonazol içeren tüplerden ve ilaçsız üreme kontrolü olan tüpten 0.1 ml ayrılıp 1/100 dilüe edildi, amfoterisin B içeren tüplerden 0.1 ml ayrılıp 1/10 dilüe edildi.
6. Tüplerden 0.1 ml örnek ayrılmadan önce ve dilüsyon yapıldıktan sonra tüm tüpler otomatik karıştırıcıda karıştırıldı.
7. Dilüsyon tüplerinden 30 µl örnek PDA plaklarına ekildi. Tüm PDA plakları 24 – 48 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda koloni sayımı yapıldı. Dilüsyonlar sayılabilir düzeyde koloni oluşumunu sağlamak amacıyla yapılmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Her plaktaki koloni sayısı tespit edildikten sonra tüplerin içerdiği canlı maya miktarı şu şekilde hesaplandı:

Canlı maya sayısı(CFU/ml)= Plaktaki koloni sayısı x 33 x dilüsyon oranı

Örneğin 16 µg/ ml flukonazol içeren tüpten, 4. saatte 100 kat dilüsyon yapılarak PDA plağına 30 µl ekim yapıldı ve plakta inkübasyon sonrası 50 koloni sayıldı ise;

4. saatte 16 µg/ ml flukonazol içeren tüpteki canlı maya sayısı = 50x33x100=165000 CFU/ml=1,65x10⁵ CFU/ml

2. Her ilacın kullanılan her dilüsyonu ve ilaçsız üreme kontrolü için 0, 4, 8, 24. saatlerde yapılan ekimlerden elde edilen sonuçlar log₁₀ değeri olarak kaydedildi.

3. Başlangıç koloni sayısına göre, 24. saatteki koloni sayısında %99.9 yani 10³ kat (3 log₁₀) azalma fungusid, 10³ katın altındaki azalmalar fungustatik etki olarak yorumlandı.

İstatiksel analiz:

Mikrodilüsyon test sonuçları SPSS for Windows 10.0 programı ile değerlendirilmiştir. İzolatların alındığı örnek dağılımları ile antifungal duyarlılık durumları ki kare testi ile, farklı antifungal ajanların duyarlılık durumlarının birbirleri ile ilişkisi ise kappa istatistiği ile incelenmiştir. Time Kill test sonuçları kappa istatistiği ile incelenmiştir.

IV.BULGULAR

1.Çalışmaya Alınan Örneklerin Dağılımı

Çalışmada 18 kan , 10 balgam , 3 kateter , 8 endotrakeal aspirasyon ve 61 idrar örneğinden izole edilen 100 *C. albicans* suşu kullanıldı. *C. albicans* suşları klasik yöntemlerle (pirinç ekstrel-tween 80 agar, germ tüp oluşumu) tür tayini yapıldıktan sonra ticari kitlerden API 20C AUX ile doğrulandı.

2. *C. albicans* Suşlarının Antifungal Duyarlılık Sonuçları:

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının mikrodilüsyon testi ile flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B için tespit edilen MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri tablo 6 da görülmektedir.

Tablo 6: *C. albicans* suşlarının antifungal MİK değerleri(µg/mL)

ANTİFUNGAL	MİK ARALIĞI (µg/ml)	MİK 50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)
Flukonazol	0,125-64	1	16
Vorikonazol	0,03-4	0,06	1
Amfoterisin B	0,125-1	0,5	0,5

Çalışmaya alınan suşların MİK değerleri flukonazol için ≤ 8 µg/ml ise duyarlı, 16-32 µg/ml ise doza bağlı duyarlı, ≥ 64 µg/ml ise dirençli kabul edilmiştir (13).

Çalışmaya alınan suşların MİK değerleri vorikonazol için ≤ 1 µg/ml ise duyarlı, ≥ 4 µg/ml ise dirençli, arada kalan değerler ise doza bağlı duyarlı kabul edilmiştir. M27-A2 protokolünde vorikonazol için duyarlılık sınırı belirtilmemiştir. Bu değerler CLSI alt komitesince önerilen değerlerdir (89).

Çalışmaya alınan suşların MİK değerleri amfoterin B için henüz kesinleşmemiş olmakla birlikte CLSI M27 A-2'ye göre ≤ 1 µg/ml ise duyarlı, ≥ 2 µg/ml ise dirençli kabul edilmiştir (13).

Tablo 7'de çalışılan 100 suşun duyarlılıkları sayısal olarak verilmiştir.

Tablo 7: *C. albicans* suşlarının duyarlılık durumları

ÖRNEK	FLUKONAZOL			VORİKONAZOL			AMFOTERİSİN B	
	DY	DBD	DR	DY	DBD	DR	DY	DR
KAN (n=18)	17 (%94.4)	-	1 (%5.6)	16 (%88.9)	1 (%5.6)	1 (%5.6)	18 (%100)	-
BALGAM (n=10)	7 (%70)	3 (%30)	-	10 (%100)	-	-	10 (%100)	-
KATETER (n=3)	2 (%66.7)	-	1 (%33.3)	2 (%66.7)	1 (%33.3)	-	3 (%100)	-
ETA (n=8)	6 (%75)	2 (%25)	-	8 (%100)	-	-	8 (%100)	-
İDRAR (n=61)	50 (%82)	5 (%8.2)	6 (%9.8)	59 (%96.7)	-	2 (%3.3)	61 (%100)	-
TOPLAM (n=100)	82 (%82)	10 (%10)	8 (%8)	95 (%95)	2 (%2)	3 (%3)	100 (%100)	-

DY: duyarlı DBD: doza bağlı duyarlı DR: dirençli

Tabloda da görüldüğü gibi *C. albicans* suşlarının 82'si flukonazole duyarlı bulunmuştur. 10 suş doza bağlı duyarlı (dozu artırılarak tedavide kullanılabilir), 8 suş ise dirençlidir.

C. albicans suşlarının 95'i vorikonazole duyarlı, 2 suş doza bağlı duyarlı, 3 suş ise dirençlidir.

C. albicans suşlarının tamamı amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur. Amfoterisin B 'ye dirençli suş yoktur.

Tablo 7 istatistiksel olarak incelendiğinde örneklerin dağılımı ile flukonazol duyarlılık sonuçları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Örneklerin dağılımı ile vorikonazol duyarlılık sonuçları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş ($p=0.016$) ancak örnek sayısı az olduğundan kateter örnekleri analize dahil edilmemiştir. Tüm suşlar amfoterisin B'ye duyarlı bulunduğu için analiz bu antifungal için yapılmamıştır. Flukonazole ve vorikonazole karşı duyarlılık sonuçları arasındaki korelasyon sorgulanmış ve %84 lük bir tutarlılık yüzdesi ile istatistiksel olarak anlamlı ($kappa=0.26$) bulunmuştur.

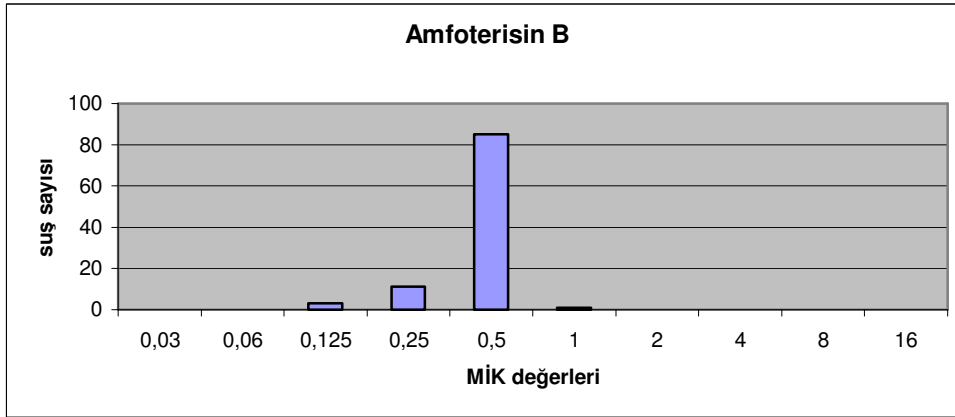
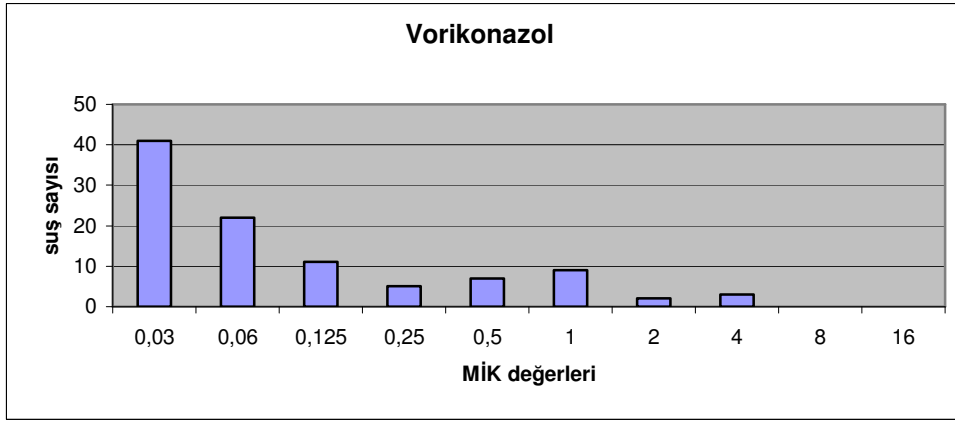
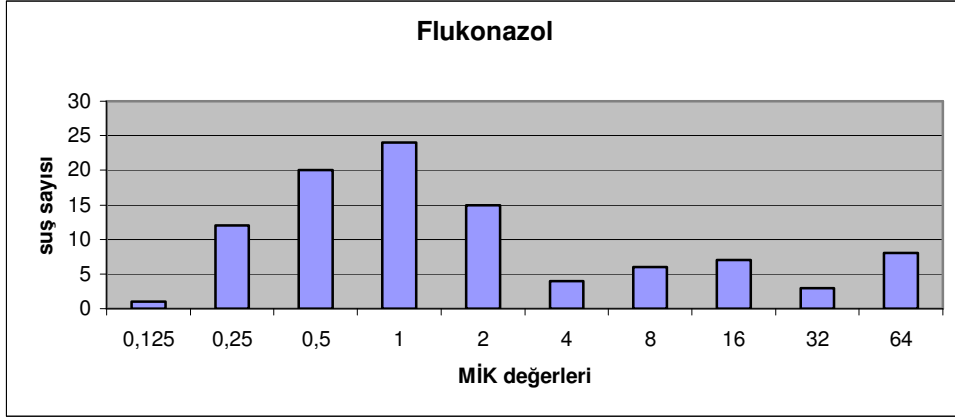
Flukonazol ve vorikonazolün etkinliği konusunda yapılan analizde doza bağlı duyarlı suşlar duyarlı kabul edildiğinde istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), bu üç ayrı grup korunduğunda vorikonazolün daha etkin olduğu istatikselsel olarak görülmüştür($p=0.001$).

Antifungallerin *C. albicans* suşlarına inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonların dağılımını grafik 1'de gösterilmiştir:

Flukonazol için *C. albicans* suşlarının MİK değerleri daha çok 1 µg/ml değerinde yoğunluk göstermektedir. Vorikonazol için en yoğun saptanan MİK değerleri 0,03 µg/ml, amfoterisin B için 0,5 µg/ml' dir.

3.Time Kill Çalışmasının Sonuçları:

Time kill çalışması için daha önceden mikrodilüsyon testi ile MİK'leri belirlenmiş olan *C. albicans* suşlarından 4 tane flukonazol'e duyarlı, 3 tane doza bağlı duyarlı, 3 tane dirençli, toplam 10 suş seçilmiştir. Bu 10 suştan 7 tanesi vorikonazole duyarlı, 1 tanesi doza bağlı duyarlı, 2 tanesi dirençli idi. Suşların hepsi amfoterisin B'ye duyarlı idi. Tablo 8'de time kill çalışmasına alınan suşların MİK değerleri verilmiştir. Grafik 2'den 11'e kadar her suşun MİK'lerinin 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı konsantrasyonda ilaç içeren tüpler ve ilaç içermeyen kontrol tüpleri içindeki maya hücrelerinin gelişiminin zaman içindeki değişimi görülmektedir. Ölçümler 0, 4, 8, 24. saatlerde inokulum eklenmiş ilaçlı tüplerden ve inokulum eklenmiş ilaçsız tüplerden (kontrol tüpü) alınan 100 µl. Örneğin dilüsyonlu yada dilüsyonsuz katı besiyerine ekimi ve 24-48 saat sonra oluşan kolonilerin sayımı ile yapılmıştır. Koloni sayıları değerlendirme kolaylığı açısından grafiklerde logaritma 10 tabanına göre yazılmıştır.

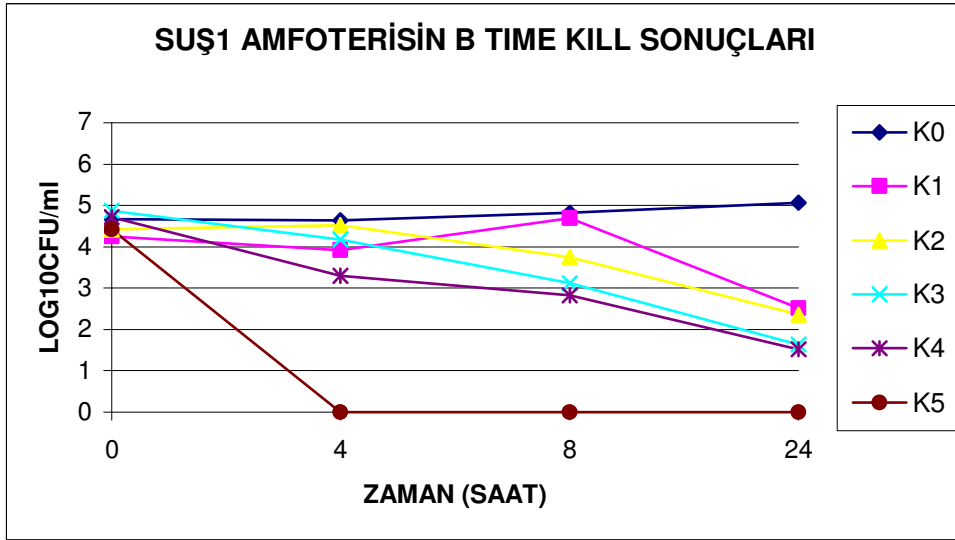
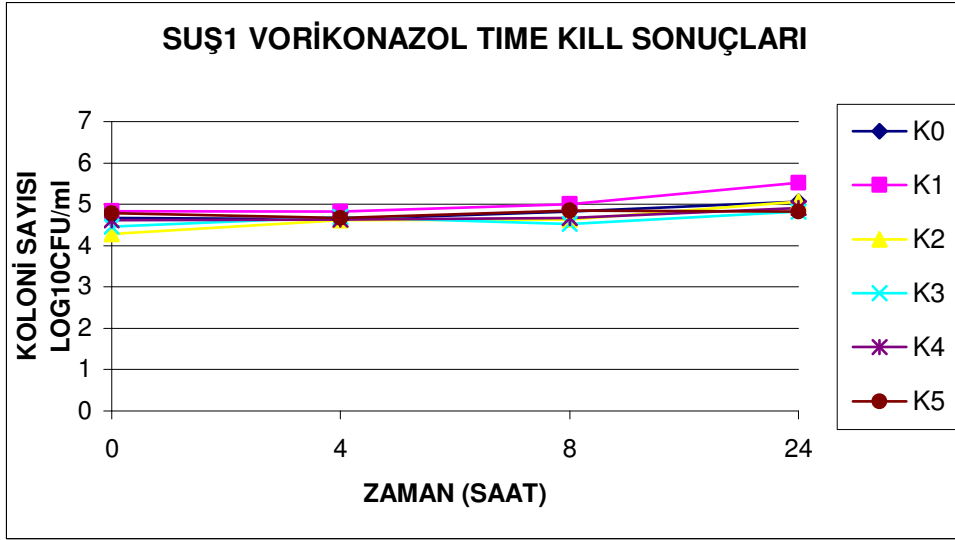
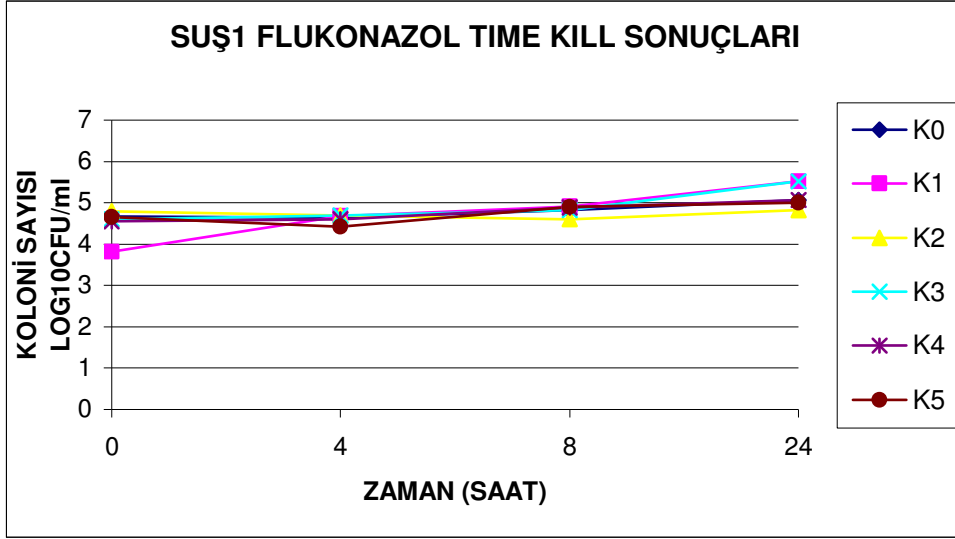


Grafik1: Antifungallerin *C. albicans* suşlarına inhibitör etki gösterdiği konsantrasyonların dağılımı

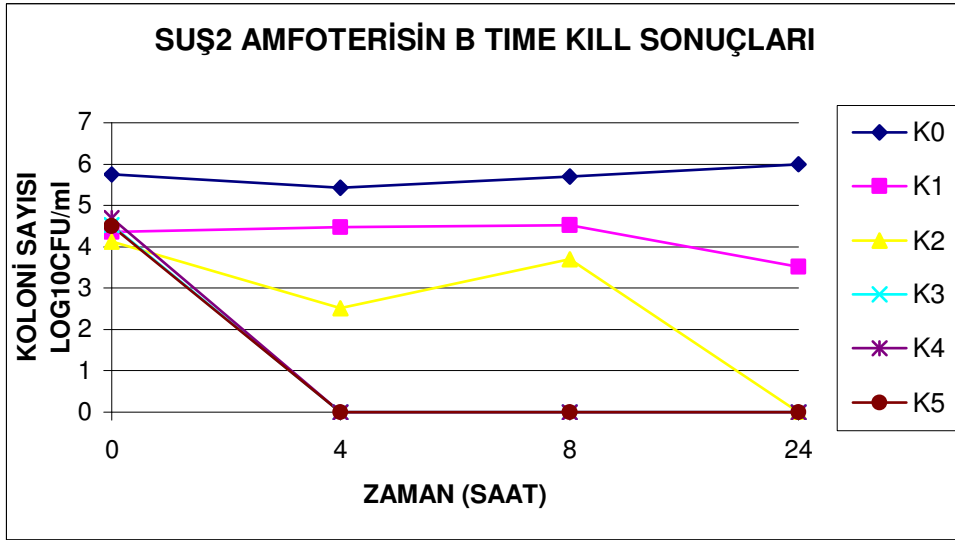
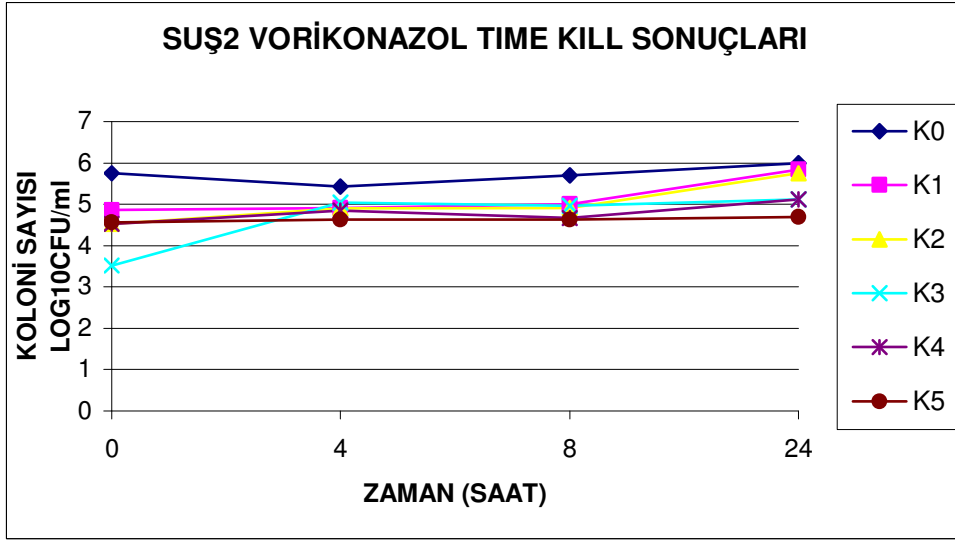
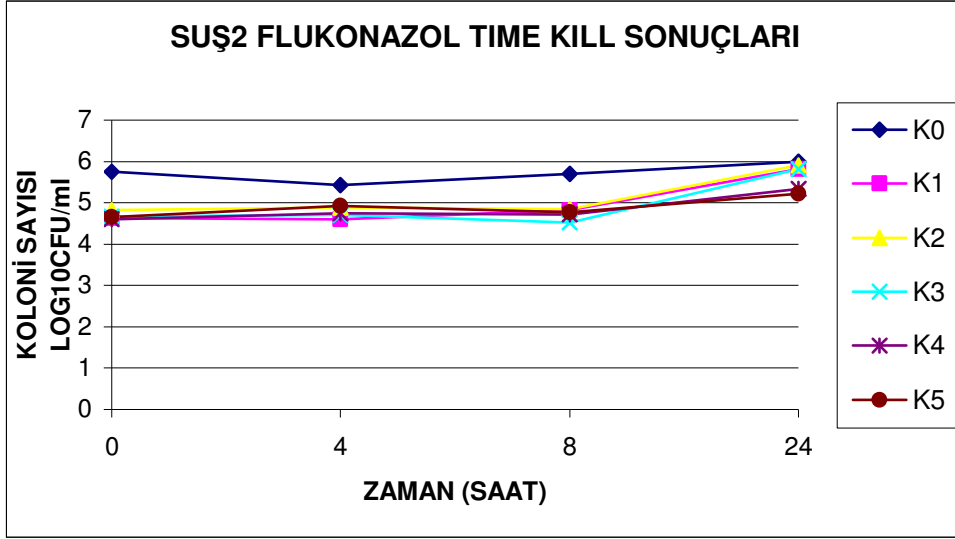
Tablo 8: Time kill çalışmasında kullanılan suşların MİK değerleri (µg/ml)

NO	ÖRNEK	FLUKONAZOL	VORİKONAZOL	AMFOTERİSİN B
1	Kan	0,5	0,03	0,5
2	Kan	1	0,03	0,5
3	Kan	0,25	0,03	0,5
4	Balgam	32	0,5	1
5	Kan	64	4	0,5
6	Balgam	16	1	0,5
7	Katater	64	2	0,5
8	İdrar	64	4	0,5
9	İdrar	32	1	0,5
10	İdrar	8	1	0,5

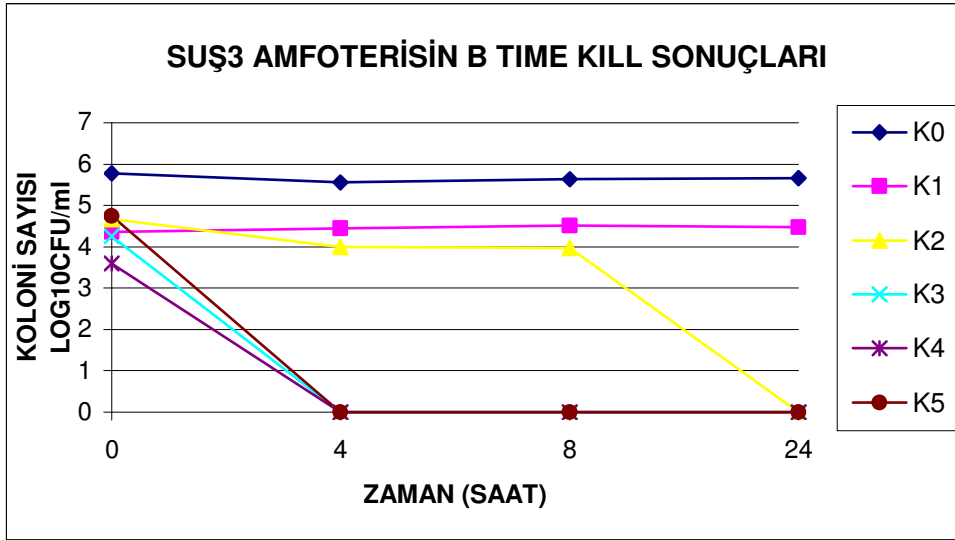
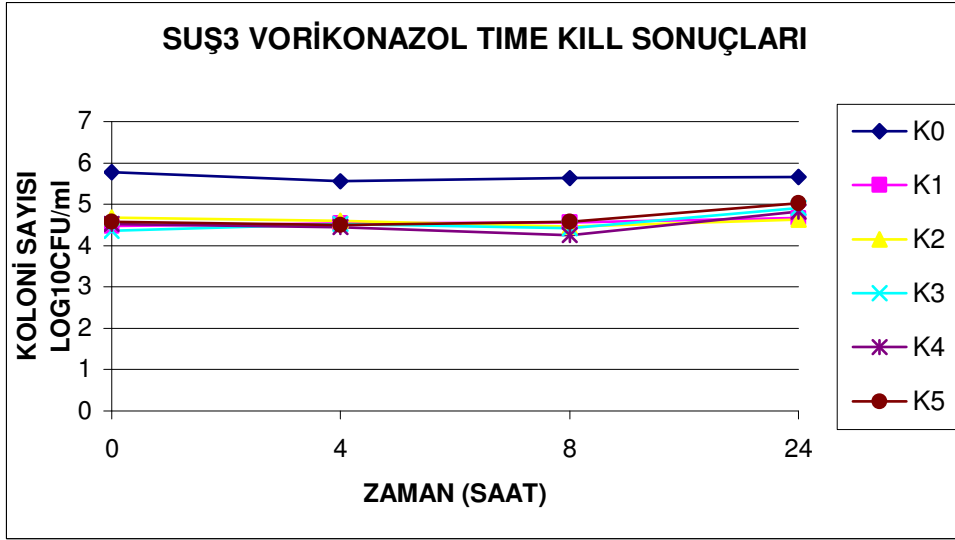
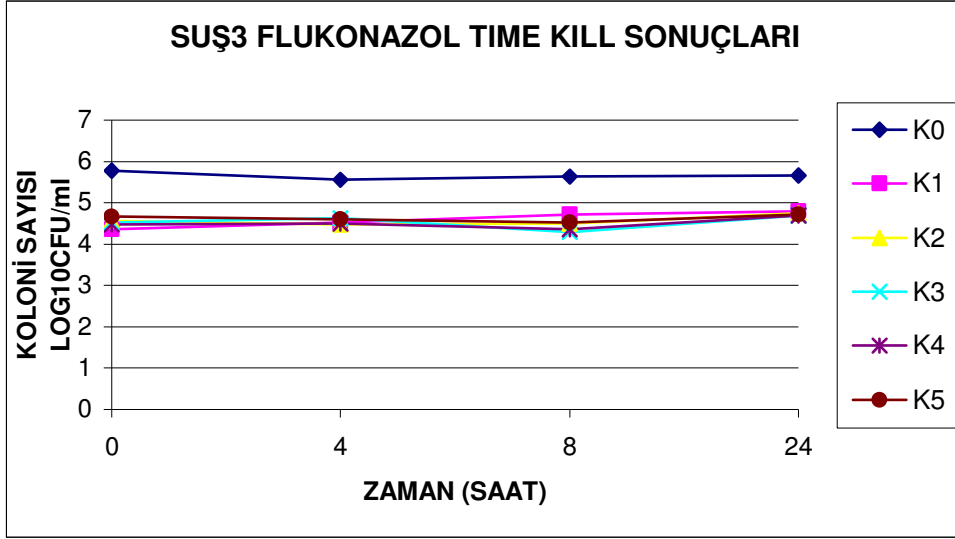
+



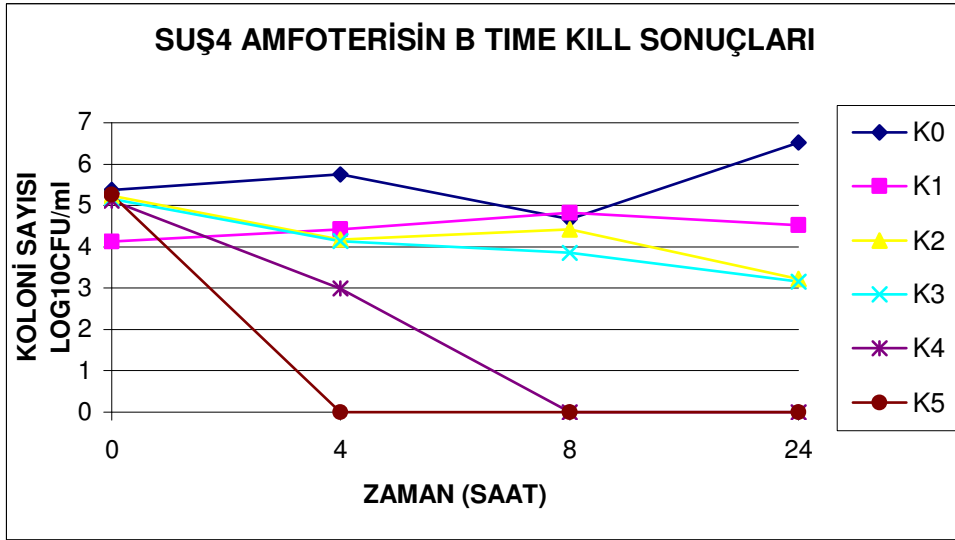
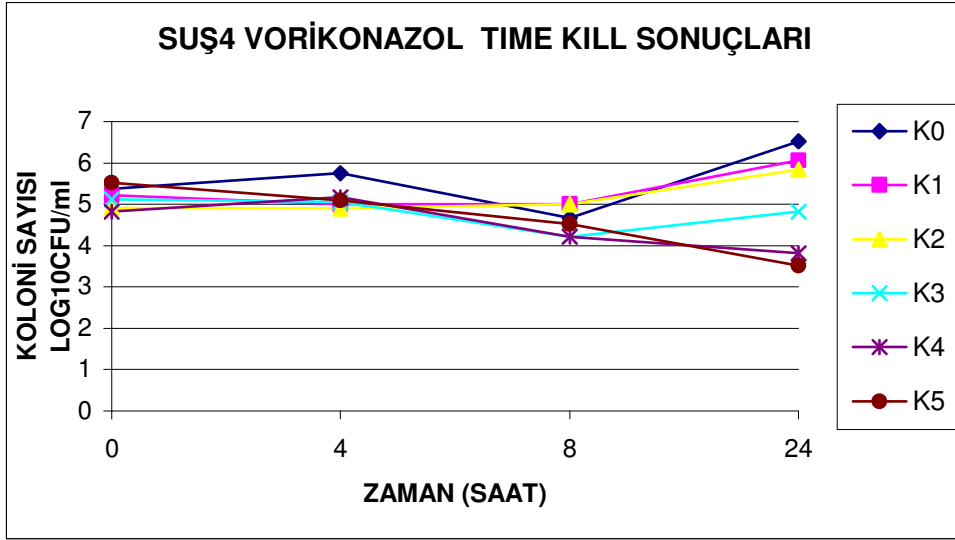
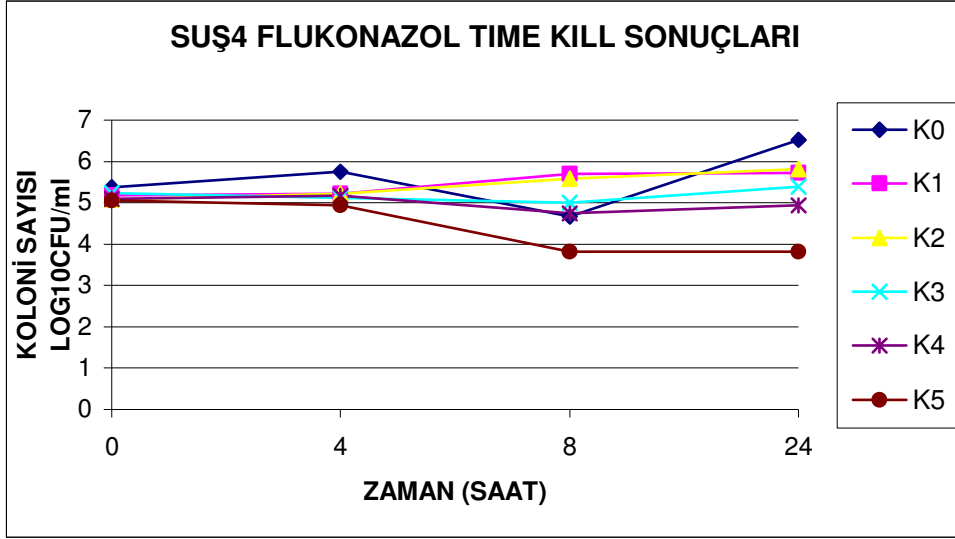
Grafik 2: Suş 1'in 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



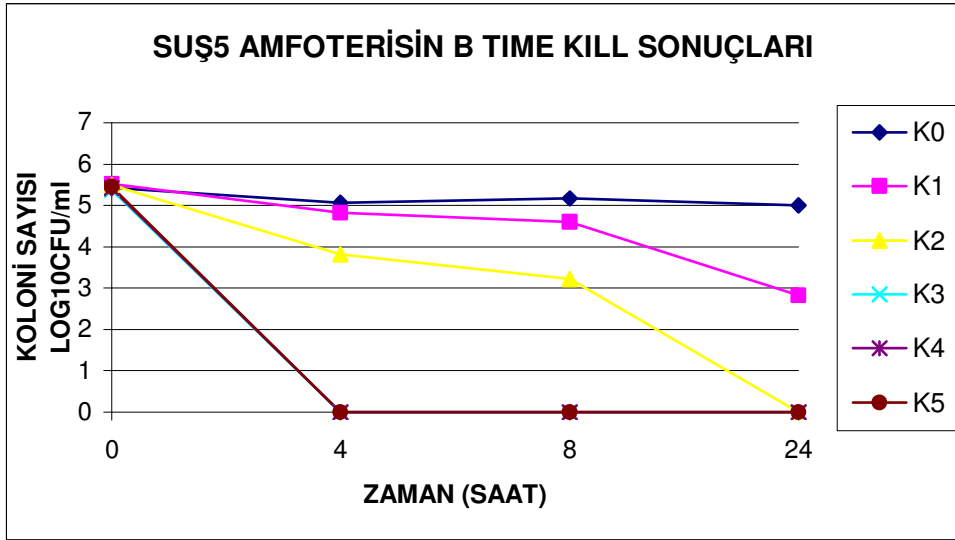
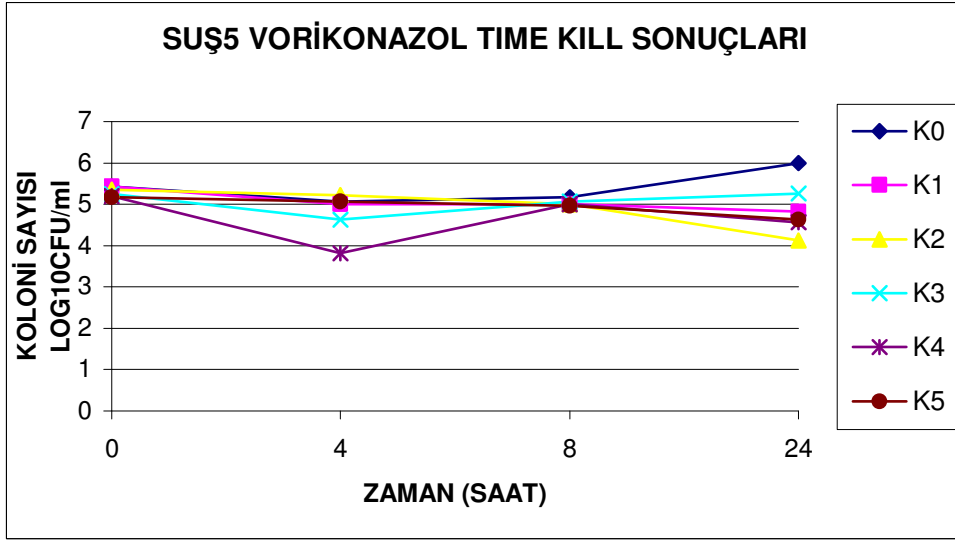
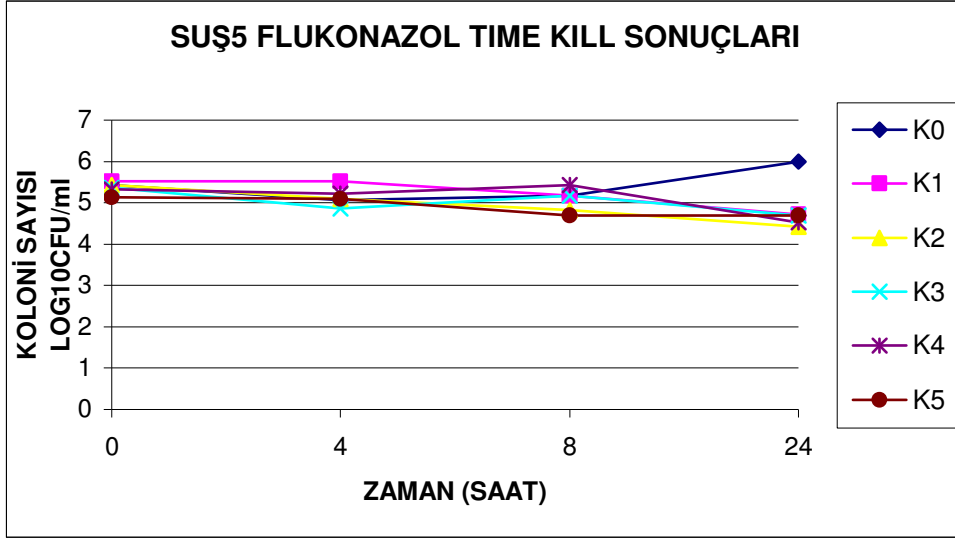
Grafik 3: Suş 2'nin 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



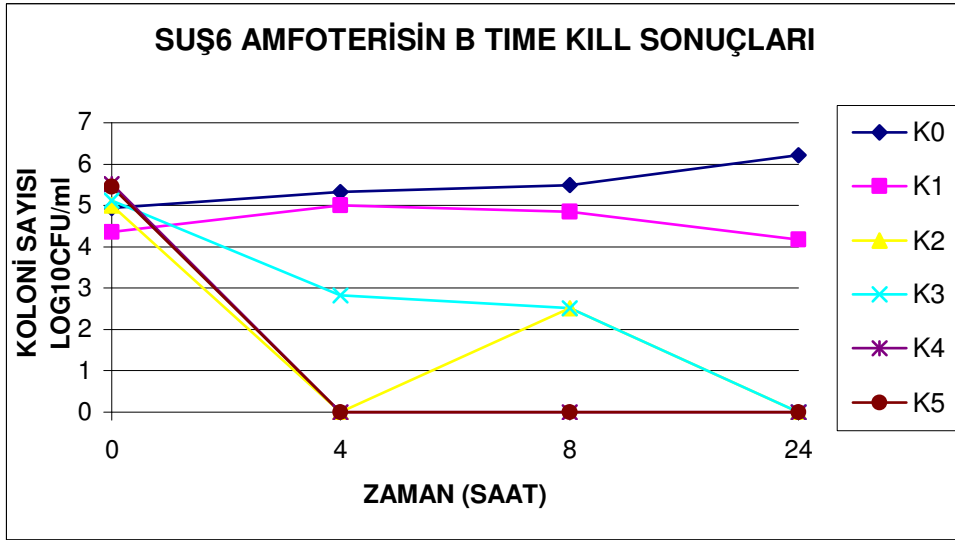
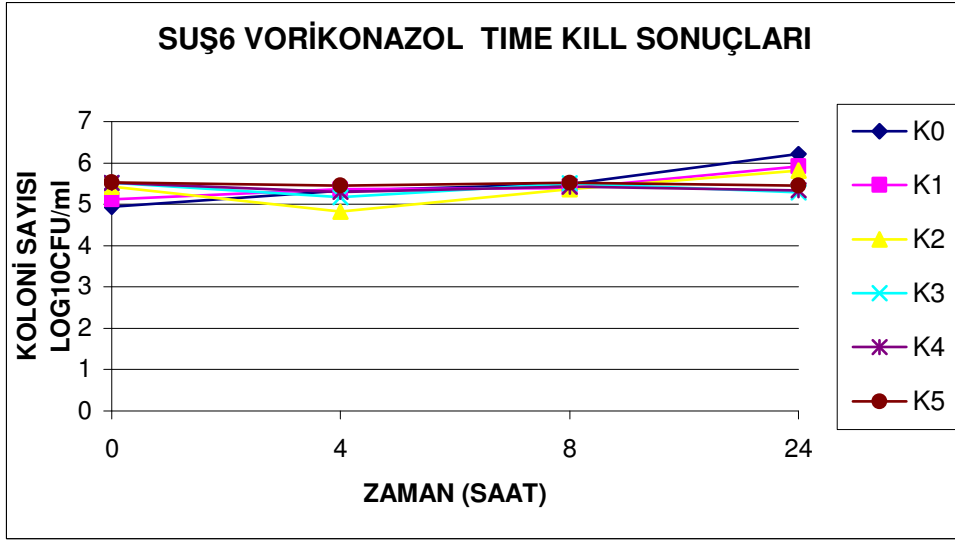
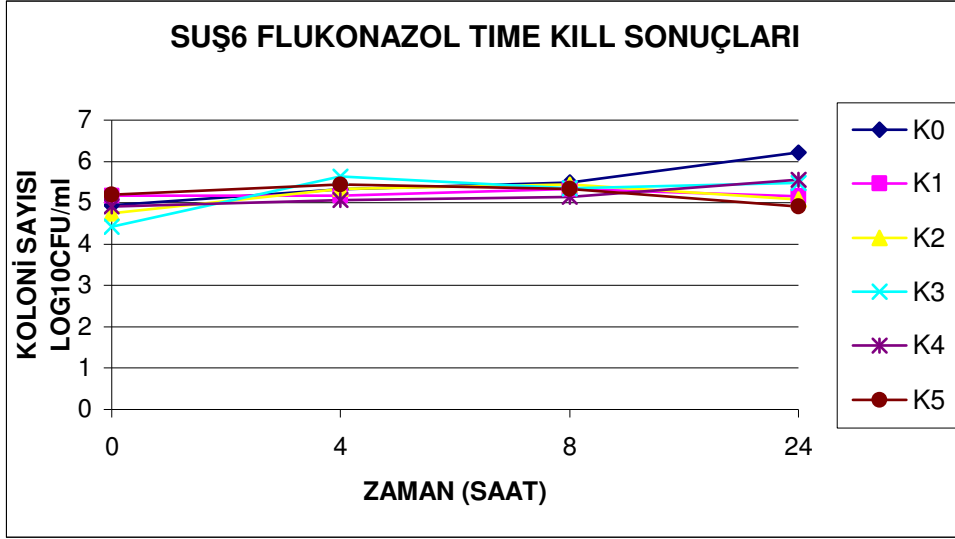
Grafik 4: Suş 3'ün 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



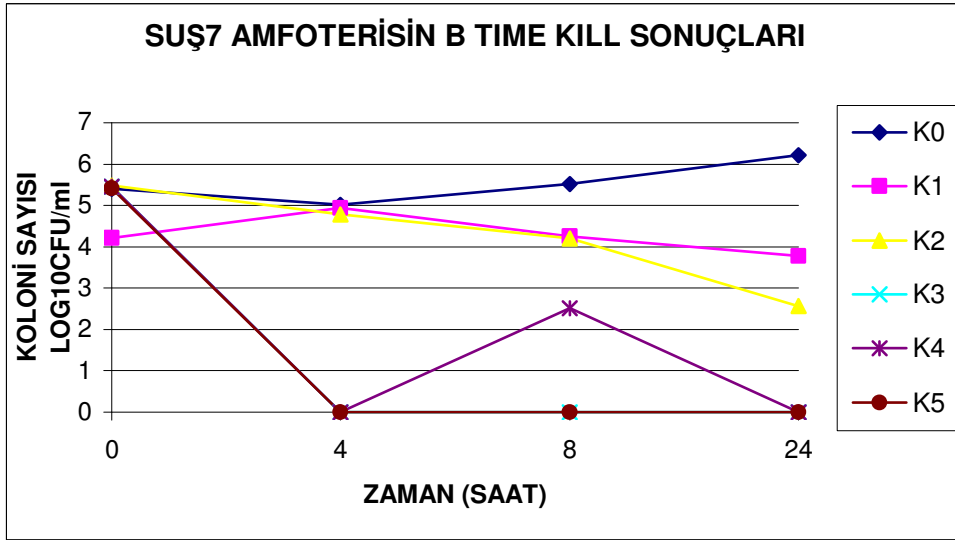
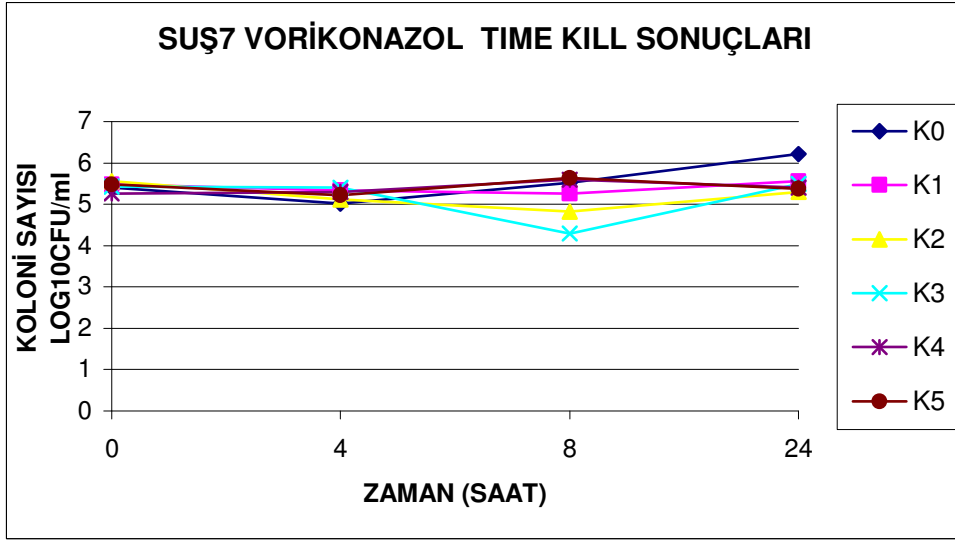
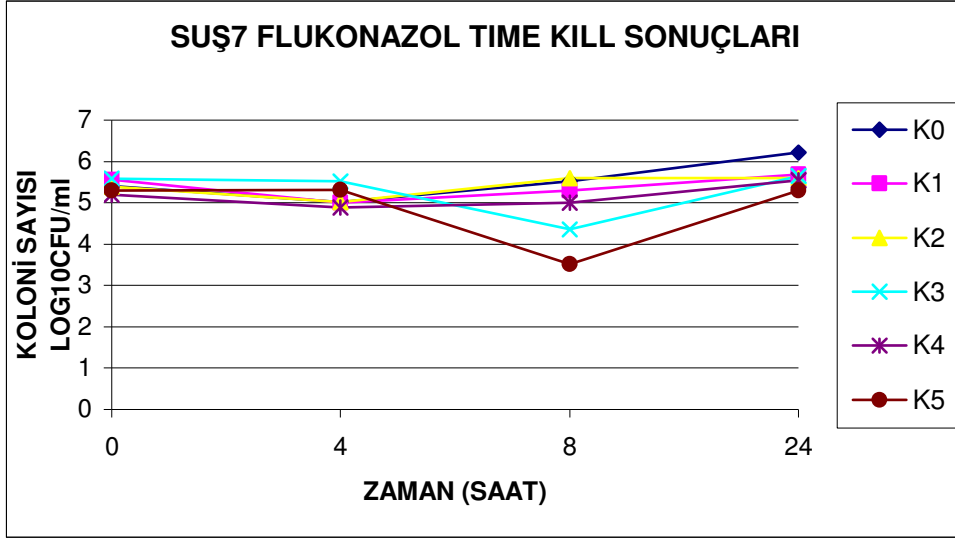
Grafik 5: Suş 4'ün 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



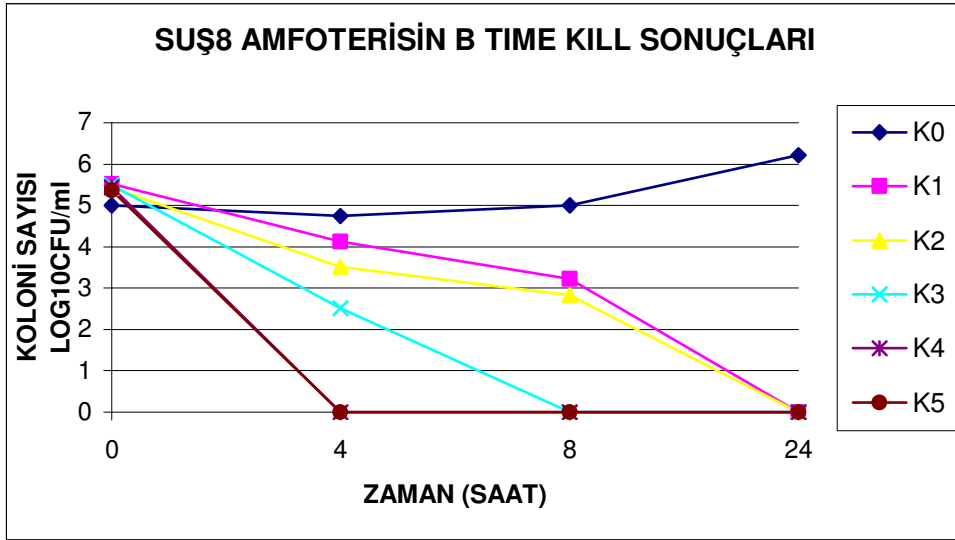
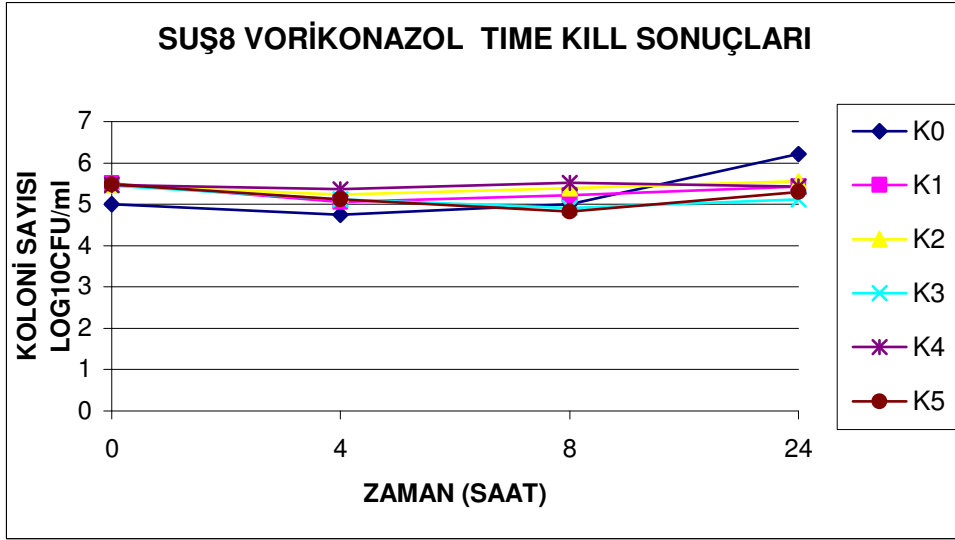
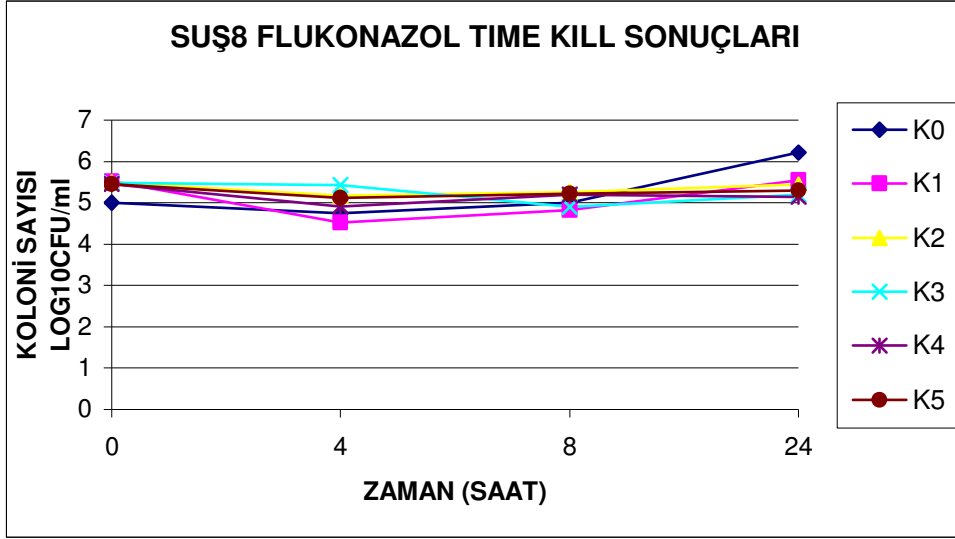
Grafik 6: Suş 5'in 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



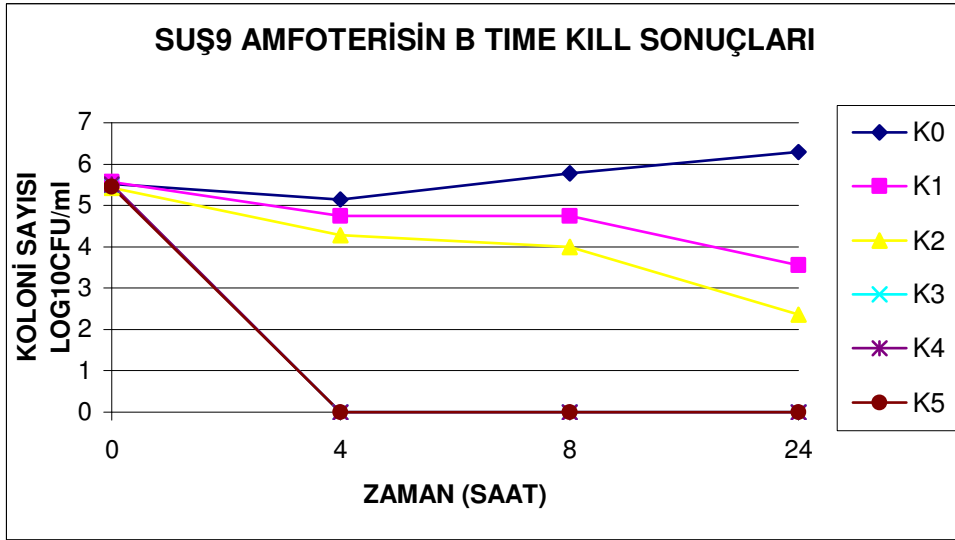
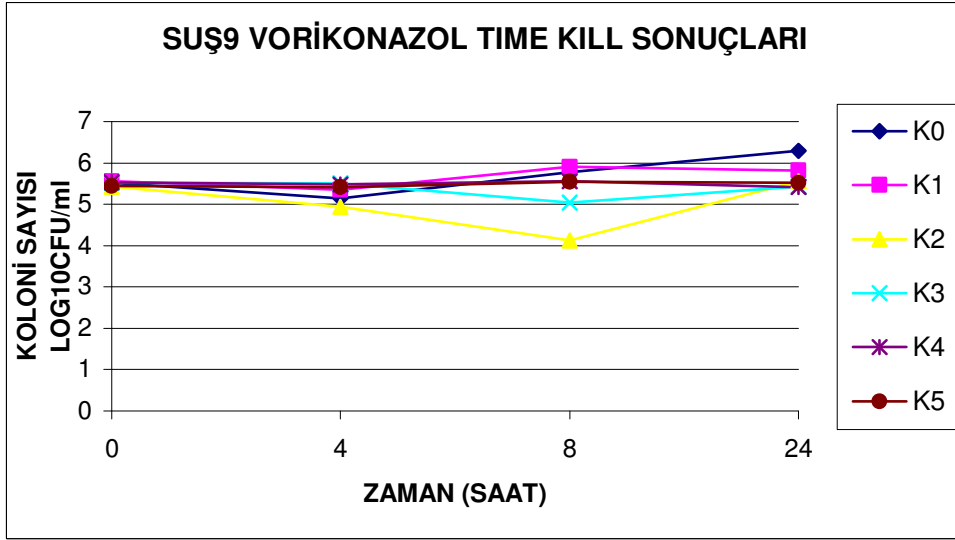
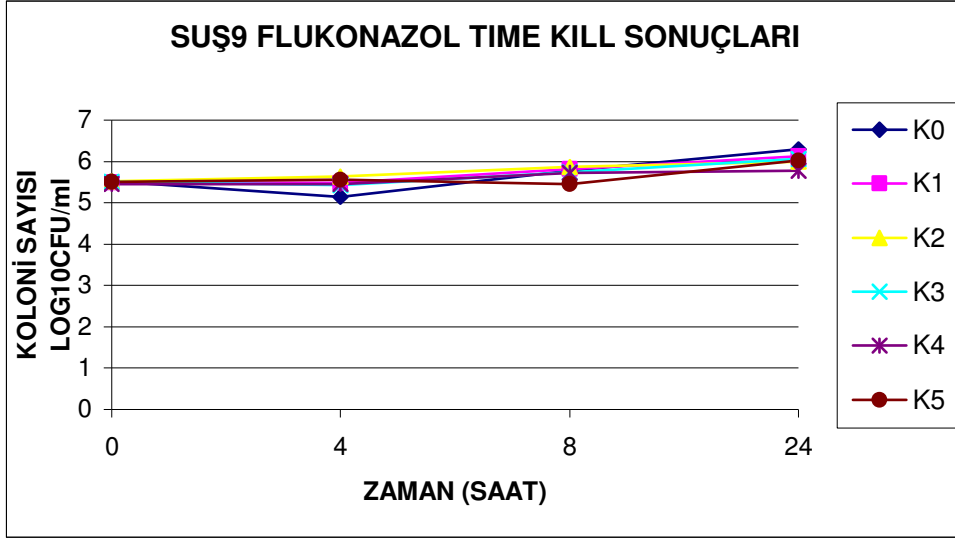
Grafik 7: Suş 6'nın 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



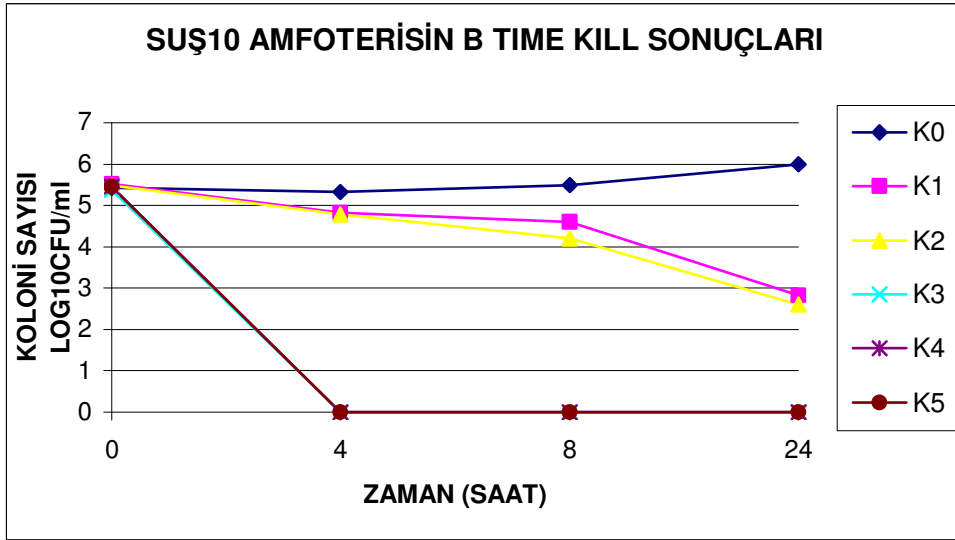
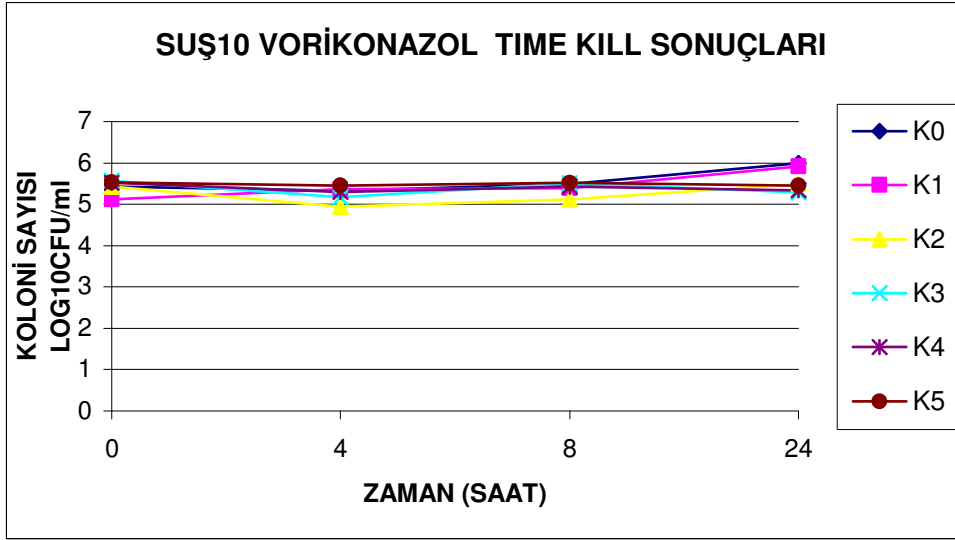
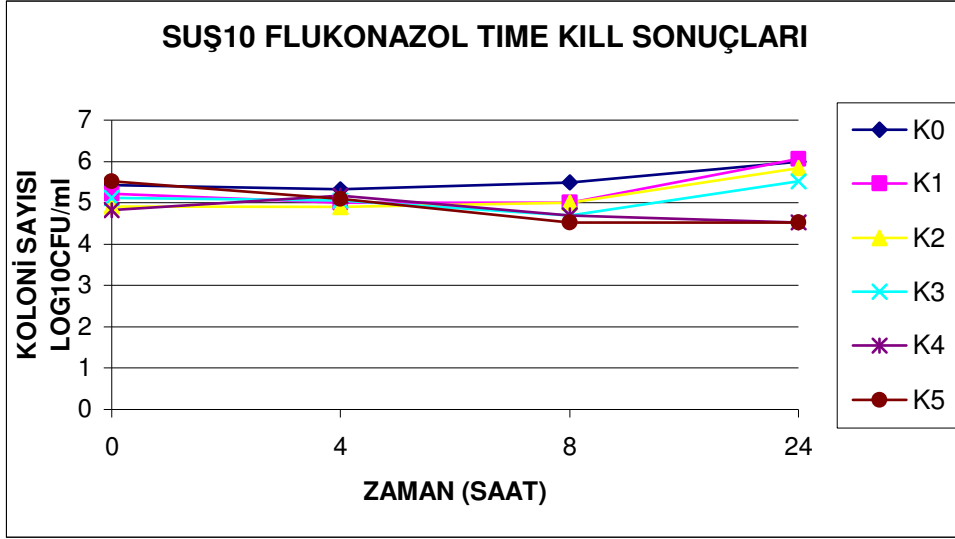
Grafik 8: Suş 7'nin 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



Grafik 9: Suş 8'in 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



Grafik 10: Suş 9'un 1/4 , 1/2, 1, 2, 4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi. **K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK



Grafik 11:Suş 10'un 1/4,1/2, ,2,4 katı MİK konsantrasyonunda koloni sayımının zaman içindeki değişimi.**K0:**Kontrol **K1:**1/4 MİK **K2:**1/2MİK **K3:**1MİK **K4:**2MİK **K5:**4 MİK

Time Kill Testi Flukonazol Sonuçları:

Mikrodilüsyon testinde duyarlı bulunan 4 suştan (suş 1, 2, 3, 10) suş 1'de MİK'un tüm katlarında flukonazol etkisiz kalmıştır. Suş 2 ve 10'da MİK'un 1, 2, 4 katı konsantrasyonlaraki ilaç dilüsyonları fungustatik aktivite göstermiştir. Ancak suş 2'nin 8. saat koloni sayımına göre 24. saatteki koloni sayısında bir artış gözlenmiştir. Suş 3'te tüm ilaç konsantrasyonlarında fungustatik aktivite gözlenmiştir.

Mikrodilüsyon testinde DBD bulunan 3 suştan birinde (suş 4) MİK' in 1/4, 1/2 katı ilaç konsantrasyonu içeren dilüsyonlarda flukonazol etkisiz bulunmuş, 1, 2, 4 katı ilaç konsantrasyonu içeren dilüsyonlarda fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 6'da MİK'un 1/4, 1/2, 1 ve 2 katı konsantrasyonlarda flukonazol etkisiz bulunmuş, 4 katı konsantrasyonda fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 9'da ise MİK'in tüm katlarında flukonazol etkisiz bulunmuştur.

Mikrodilüsyon testinde dirençli bulunan 3 suştan (suş 5, 7, 8) birinde (suş 5) flukonazol MİK'un tüm katlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 7 ve 8'de ise flukonazol MİK'in tüm katlarında etkisiz bulunmuştur. Suş 7'de 8. saatteki ölçümlerde MİK'un 1, 2, 4 katı konsantrasyonlarda fungustatik aktivite gözlenmiştir.

Time Kill Testi Vorikonazol Sonuçları:

Mikrodilüsyon testinde duyarlı bulunan 7 suştan (suş 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10) dördünde (suş 2, 4, 9, 10) MİK'un 1/4, 1/2 katı konsantrasyonlarda etkisiz kalırken 1, 2, 4 MİK katlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 1 ve 6'da MİK'un tüm katlarında vorikonazol etkisiz kalmıştır. Suş 3'de vorikonazol tüm MİK katlarında fungustatik aktivite göstermiştir.

Mikrodilüsyon testinde DBD bulunan bir suşda (suş 7) vorikonazol 1/4, 1/2 MİK katlarında etkisiz, 1, 2, 4 MİK katlarında ise fungustatik aktivite göstermiştir.

Mikrodilüsyon testinde dirençli bulunan 2 suştan birinde (suş 5) vorikonazol tüm MİK katlarında fungustatik aktivite gösterirken, diğerinde (suş 8) tüm MİK katlarında etkisiz kalmıştır.

Azollerle ilgili olarak dikkat çeken bir nokta 8. saatteki koloni sayımına göre 24. saatteki koloni sayısında ortaya çıkan artıştır. Bu suş 2 vorikonazol, suş 3 flukonazol ve vorikonazol, suş 4 vorikonazol, suş 7 flukonazol, suş 8

flukonazol ve vorikonazol, suş 9 flukonazol ve suş 10 flukonazol ile ilgili grafiklerde görülmektedir.

Time Kill Testi Amfoterisin B Sonuçları:

Suş 2, 3, 5, 6'da amfoterisin B MİK'in 1/4 katında fungustatik, 1/2, 1, 2 ve 4 katlarında ise fungusid aktivite gösterdiği görülmüştür. Suş 1, 4, 7, 9 ve 10'da ise 1/4 ve 1/2 MİK katlarında fungustatik, 1, 2, 4 MİK katlarında ise fungusid aktivite göstermiştir. Suş 8 de amfoterisin B tüm MİK katlarında fungusid aktivite göstermiştir.

Amfoterisin B ile ilgili olarak saptanan başka bir bulgu ise MİK ve MİK'un 2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungusid aktivitenin 4. saatten itibaren tespit edilebilmesiydi. Suşların MİK'un 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonlarda gösterdiği fungusid aktivite ise 24. saatte tespit edilebiliyordu ve koloni sayısı 24. saate kadar giderek azalıyordu.

V.TARTIŞMA

Son yıllarda fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığında AIDS vakalarının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının yaygınlaşması, immunsupresif ilaç kullanımının artması, artan invaziv katater uygulamaları ve majör cerrahi girişimler nedeniyle artış olmuştur. 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 hastalarda görülen kandidemiler mantarların neden olduğu infeksiyonlar içinde en sık morbidite ve mortaliteye yol açan hastalıklardır. Sonuçta hastanede kalış süresi 30 güne kadar uzayabilmekte ve maddi kayıplar da oluşmaktadır(1,2,3).

İnvaziv kandida infeksiyonlarının tedavisinde sınırlı sayıda antifungal ajan kullanılmaktadır. Son yıllarda triazol grubu antifungallerin profilaksi ve tedavide sık kullanımları sonucu, daha az patojen *C. albicans* dışı türlerinde (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) direncin arttığı tespit edilmiştir (9,10,11). Bütün bunlar antifungal tedavi seçiminde in vitro duyarlılığı ölçen testlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır. 1997 yılında mayalar için standart yöntem kabul edilen mikrodilüsyon yöntemini anlatan M27 A belgesi, 2002 yılında M27-A2 belgesi yayınlamıştır. Bu yoğun çalışmalara rağmen antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu halen tam sağlanamamıştır (12,13).

Bu çalışmada invaziv infeksiyonlardan izole edilen kandida türlerinin konvansiyonel sistemler ve ticari kitler kullanılarak tür tayinleri yapılmış ve 100 *C. albicans* suşunun üç antifungal ilaç (flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B) için MİK değerleri CLSI tarafından önerilen standart yöntem olan mikrodilüsyon ile belirlenmiştir. Mikrodilüsyon sonuçlarına göre flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli suşlar tespit edilmiştir. Bu suşlardan MİK değerleri farklı 10 tanesinde time kill yöntemi kullanılarak ilaçların farklı dilüsyonlardaki fungostatik yada fungusid aktiviteleri araştırılmıştır.

Flukonazol sistemik ve yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir triazol bileşimidir. Flukonazolün profilaksi veya tedavi amacıyla yaygın kullanımı sonucu kandida türlerinde flukonazole karşı direnç gelişimi çeşitli araştırmalarda klinik bir sorun olarak ortaya konmuştur. Antifungal direnç gelişimi ile ilgili olarak hastanın immunosüpresyon durumu ve daha önce azol türevlerini kullanmış olması risk faktörüdür (90). Bunlarla bağlantılı olarak HIV ile infekte ve uzun süre azol profilaksi almış kişilerde de amfoterisin B ve flukonazol dirençli *C. albicans* suşları ile karşılaşmaktadır (91).Yapılan çalışmalar *C. albicans*'da flukonazole direncin arttığını göstermiştir. Direnç oranları popülasyonlara göre farklılıklar göstermektedir (90,92,93,94,95,96,97,98).

Yapılan birçok çalışmada *C. albicans* suşlarında flukonazol direnci tespit edilmemiştir; Kiraz ve arkadaşları (99) 1998 yılında 300 *C. albicans* suşunun antifungal duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmada flukonazol direnci tespit etmemişler, suşların flukonazol için MİK aralığını 0,06-8 µg/ml, MİK 50 değerini 1 µg/ml, MİK 90 değerini 8 µg/ml olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde Gün ve arkadaşlarının(92) *C. albicans* suşları ile yaptıkları antifungal duyarlılık çalışmalarında flukonazol MİK aralığı 0,125-1 µg/ml, MİK 50 değeri 0,5 µg/ml, MİK 90 değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Molbay ve arkadaşları (42) *C. albicans*ların flukonazol MİK aralığını 0,125-8 µg/ml, MİK 50 değerini 0,25 µg/ml, MİK 90 değerini 0,5 µg/ml bulmuşlardır. Wilke ve arkadaşları (100) *C. albicans*'lar için flukonazol MİK aralığını 0,06-4 µg/ml, Price ve arkadaşları (28) 0,25-1 µg/ml, MİK 50 değerini 0,125 µg/ml, MİK 90 değerini 0,25 µg/ml olarak tespit etmişlerdir.

C. albicans'larda flukonazol direnci tespit edilemeyen çalışmalar yanında yüksek oranda direnç tespit eden çalışmalar da mevcuttur; Keçeli ve arkadaşları (93) 2003 yılında Kocaelide yaptıkları çalışmada 56 *C. albicans* suşunda flukonazol için MİK aralığını 0,032-256 µg/ml, MİK 50 değerini 0,125 µg/ml, MİK 90 değerini 1 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. 6 *C. albicans* suşunu flukonazole dirençli (%10,7) bulmuşlardır. Benzer şekilde Epsinel-Ingroff ve Pfaller (94) çalışmalarında kandidalar için MİK değerlerini 0,25-64 µg/ml, Hawser ve arkadaşları (95) 0,12-256 µg/ml, Gün ve arkadaşları (92) 0,12-64 µg/ml , Arıkan ve arkadaşları (96) 0,2-64 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Epsinel-Ingroff ve Pfaller'in 2004 yılında yaptıkları başka bir

araştırmada (97) 38 *C. albicans* suşunun flukonazol MİK aralığını 0,12-64 µg/ml, MİK 50 değerini 1 µg/ml, MİK 90 değerini 64 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Kaya ve arkadaşları(90) 2001 yılında profilaksi amacıyla flukonazol uygulanan hematolojik maligniteli nötropenik hastalardan izole edilen 138 candida suşunun flukonazol duyarlılıklarını araştırmışlar ve 32 *C. albicans* suşundan 22'sini dirençli (%68,7), 3'ünü doza bağlı duyarlı (%9,4), 7'sini duyarlı (%21,9) bulmuşlardır. Espinel-Ingroff ve Canton 'un 2007 'de yayınlanan çalışmalarında (98) ise 110 maya suşunun antifungal duyarlılıkları çalışılmış, bunların arasındaki 20 *C. albicans* suşunun 11 tanesi flukonazole dirençli (%55), 4 tanesi doza bağlı duyarlı (%20), 5 tanesi duyarlı (%35) bulunmuştur.

Çalışmamıza alınan 100 *C. albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla flukonazol için MİK aralığı 0,125-64 µg/ml, MİK 50 değeri 1 µg/ml, MİK 90 değeri 16 µg/ml bulunmuş, 82 suş flukonazole duyarlı, 10 suş doza bağlı duyarlı, 8 suş dirençli olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlarımızın diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumlu gözlenmiştir. Çalışma laboratuvar çalışması olarak planlandığı için hastaların klinik durumları ile ilgili veriler toplanmamıştır. Ancak yazım aşamasında görülmüştür ki direç oranları hastaların immun durumları, flukonazol profilaksisi alıp almadıkları, HIV ile infekte olup olmadıkları ile yakından ilişkilidir.

Vorikonazol, flukonazolden türetilmiş sentetik bir triazoldür. Sitokrom P450 sistemini kullanarak ergosterol sentezini inhibe eder. Yapısal değişiklikler sonucunda hedef enzim 14 α demetilazı inhibe edici aktivitesi artmış ve spektrumu genişlemiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki vorikonazol flukonazole göre kandida suşları üzerinde 10-100 kat fazla etkinliğe sahiptir. Flukonazole karşı duyarlılığı düşük *C. albicans* suşlarına karşı daha iyi aktivite gösterdiği bildirilmektedir. 250 maya izolatına karşı flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada vorikonazolün kandida ve trikosporon türlerine karşı en etkili ajan olduğu belirtilmiştir(75).

Vorikonazol ile yapılmış duyarlılık çalışmaları flukonazole göre daha az sayıdadır. Espinel-Ingroff ve arkadaşları (97) yaptıkları çalışmada vorikonazolün *C. albicans* suşları için MİK aralığı 0,008-8 µg/ml, MİK 50 değeri 0,06 µg/ml, MİK 90 değeri 2 µg/ml olarak bulunmuşlardır. Espinel-

Ingroff ve arkadaşlarının (98) 110 maya suşu ile yaptıkları diğer bir çalışmada ise 20 *C. albicans* suşundan 19'u vorikonazole duyarlı, 1'i doza bağlı duyarlı bulunmuştur. Bu çalışmada daha önce de belirtildiği gibi çalışılan *C. albicans* suşlarının 11'i flukonazole dirençli, 4' ü doza bağlı duyarlı bulunmuştur. Espinel-Ingroff ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada (89) 90 *C. albicans* suşunun vorikonazol MİK aralığı 0,008-16 µg/ml, MİK 50 değeri 0,25 µg/ml, MİK 90 değeri 2 µg/ml olarak bulunmuştur. Espinel-Ingroff (101) 1997 yılında yaptığı diğer bir çalışmada 32 *C. albicans* suşunun flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B duyarlılıkları araştırılmış ve sırasıyla vorikonazol MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri 0,03-4 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,5 µg/ml bulunmuştur. Karakoç ve arkadaşları (102) 54 kandida suşunun flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B duyarlılıklarını araştırmışlardır. 54 suş arasında bulunan 15 *C. albicans* suşunda flukonazole doza bağlı duyarlı suşlar bulunmasına rağmen, antifungallere direnç saptanmamıştır. Vorikonazol için MİK aralığını 0,125-0,5 µg/ml, MİK 50 değerini 0,125 µg/ml, MİK 90 değerini 0,125 µg/ml bulmuşlardır. Hoban ve arkadaşları (103) 1999 yılında 513 *C. albicans* suşunun flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B duyarlılıklarını araştırmışlardır. Vorikonazol MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri 0,007-0,5 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,06 µg/ml bulunmuştur ve vorikonazol direncine rastlanmamıştır.

Çalışmamıza alınan 100 *C. albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla vorikonazol için MİK aralığı 0,03-4 µg/ml, MİK 50 değeri 0,06 µg/ml, MİK 90 değeri 1 µg/ml bulunmuş, 95 suş flukonazole duyarlı, 2 suş doza bağlı duyarlı, 3 suş dirençli olarak değerlendirilmiştir. Vorikonazole dirençli bulunan 3 suşun aynı zamanda flukonazole de dirençli olduğu, doza bağlı duyarlı bulunan 2 suştan ise birinin flukonazole dirençli, diğerinin duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmamız literatürle uyumlu bulunmuştur. MİK sonuçlarının çoğu ± 1 dilüsyon içindedir.

Azollerde mikrodilüsyon sonuçlarının görsel olarak değerlendirilmesinin subjektif sonuçlar vermesi sebebiyle değerlendirmelerin spektrofotometrik olarak yapılmasının daha objektif sonuçlar vereceği düşünülmüştür.

Amfoterisin B 1950'li yılların sonlarına doğru kullanıma giren, *Streptomyces nodosus*'un bir suşundan elde edilen bir haptendir(62). Parenteral kullanılır. İlaç hücre membranında ergosterole irreversibl

bağlanarak hücre permeabilitesini bozar. Fungustatik etki gösteren azollerin aksine fungusidal etki gösterir(63). *C. lusitaniae* başta olmak üzere *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* gibi suşlarda çeşitli çalışmalarda dirence rastlanmıştır. Mantarların hücre membranlarındaki ergosterol sentezini azaltarak, amfoterisin B'ye dirençli hale geldikleri düşünülmektedir(62). Mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılığın ölçülmesinde hiç üreme olmayan kuyucuğun MİK değeri olarak tespit edilmesinden dolayı, amfoterisin B sonuçları azollerin duyarlılık sonuçlarına göre daha kolay yorumlanır ve daha objektiftir (13).

Yapılan çalışmalarda *C. albicans*lar için amfoterisin B'nin MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri için: Keçeli ve arkadaşları (93) 0,023-0,64 µg/ml, 0,032 µg/ml, 0,032 µg/ml, Gün ve arkadaşları (92) 0,062-0,125 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,125 µg/ml, Karakoç ve arkadaşları (102) 0,03-1 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,5 µg/ml olarak tespit etmişler ve direnç tespit etmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da 100 *C. albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla amfoterisin B için MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri sırasıyla 0,125-1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,5µg/ml olarak bulunmuş, amfoterisin B direncine rastlanmamıştır. Sonuçlarımızın yukarıdaki araştırmacıların sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Ancak amfoterisin B'ye *C. albicans* suşlarında direnç tespit eden çalışmalar da mevcuttur. Kiraz ve arkadaşları (99) 300 *C. albicans* suşunun amfoterisin B MİK aralığını, MİK 50 ve MİK 90 değerlerini sırasıyla 0,03-4 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml; Epsinel-Ingroff ve Pfaller (97) 0,5-8 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml olarak bulmuşlar ve dirençli suşlar tanımlamışlardır. Yine Espinel-Ingroff ve arkadaşları (98) 20 *C. albicans* suşunun 2 tanesini amfoterisin B dirençli olarak bulmuşlardır. Bu durum göstermektedir ki kandida türleri arasında henüz amfoterisin B'ye direnç ender olsada MİK düzeyi giderek artmaktadır(104).

Mikrodilüsyon testi ile MİK'ları tespit edilen *C. albicans* suşlarından farklı duyarlılıktaki 10 suşun time kill yöntemi ile MİK'larının 1/4, 1/2, 1, 2, 4 katı konsantrasyonda ilaç dilüsyonları kullanılarak antifungal etkinlikleri değerlendirilmiştir. Ölçümler koloni sayımına göre 0, 4, 8, 24. saatlerde yapılmıştır. Koloni sayıları logaritma 10 tabanına göre grafiklere aktarılmıştır. Başlangıç koloni sayısına göre, 24 saatteki koloni sayısında %99.9 yani 10^3 kat (3

\log_{10}) azalma fungusid, 10^3 katın altındaki azalmalar fungustatik etki olarak yorumlanmıştır.

Mikrodilüsyon testinde flukonazol duyarlı bulunan 4 suştan (suş 1, 2, 3, 10) 24. saatteki koloni sayılarına göre 2 tanesinde (suş 2, 10) MİK'un 1, 2, 4 katı konsantrasyonlaraki ilaç dilüsyonları fungustatik aktivite göstermiştir. Ancak suş 2'nin 8. saat koloni sayımına göre 24. saatteki koloni sayısında bir artış gözlenmiştir. Suş 3 MİK'un 1/4, 1/2, 1, 2, 4 katı olan tüm ilaç konsantrasyonlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 1 ise MİK'un tüm katlarında etkisiz kalmıştır.

Mikrodilüsyon testine göre flukonazole DBD bulunan 3 suştan birinde (suş 4) MİK' in 1/4, 1/2 katı ilaç konsantrasyonu içeren dilüsyonlarda flukonazol etkisiz bulunmuş, 1, 2, 4 katı ilaç konsantrasyonu içeren dilüsyonlarda flukonazol fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 6'da MİK'un 1/4, 1/2, 1 ve 2 katı konsantrasyonlarda flukonazol etkisiz bulunmuş, 4 katı konsantrasyonda fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 9'da ise MİK'in tüm katlarında flukonazol etkisiz bulunmuştur.

Mikrodilüsyon testine göre flukonazol dirençli bulunan 3 suştan (suş 5, 7, 8) birinde (suş 5) flukonazol MİK'un tüm katlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 7 ve 8'de ise flukonazol MİK'in tüm katlarında etkisiz bulunmuştur. Suş 7'de 8. saatteki ölçümlerde MİK'un 1, 2, 4 katı konsantrasyonlarda fungustatik aktivite gözlenmiştir.

Mikrodilüsyon testinde flukonazole duyarlı ve DBD bulunan suşlardan 2, 4, 10 da flukonazolün MİK'un 1/4 ve 1/2 katlarında etkisiz kalıp, 1, 2, 4 katlarında fungustatik aktivite göstermesi beklentilerimize uygundur. . Suş 3 MİK'un 1/4, 1/2, 1, 2, 4 katı olan tüm ilaç konsantrasyonlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Bu durumun mikrodilüsyon ile MİK belirlenmesinin bulanıklık derecesine göre yapılması ve değerlendirmenin kişiden kişiye değişkenlik gösterebilmesine, bu nedenle alınan sonucun objektif olamayabilmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Mikrodilüsyon testinde ölçülen azol MİK değerlerinin suş 3'ün gerçek MİK değerlerinden daha düşük olabileceği düşünülmüş ve Time Kill yönteminde tüm konsantrasyonlara duyarlı bulunmasının sebebinin bu olabileceği düşünülmüştür. Suş 1'de ise flukonazol tüm MİK katlarında etkisiz kalmıştır. Time kill çalışmasında dilüsyonların hazırlanması aşamasına inokulum içindeki mayalar tüp

kenarlarına yapışıp, ilaçla temas etmeyerek canlı kalabilir. Vorteksleme aşamasında tüp içeriğine karışıp ekim plaklarına aktarılabilir. Bu durumda antifungal etkili olduğu halde üremelere bağlı olarak etkisiz gibi değerlendirilebilir. İki yöntem arasındaki tutarsız sonucun sebebinin bu şekilde açıklanabileceği düşünülmüştür. Suş 6'da flukonazolün sadece MİK'un 4 katı konsantrasyonda fungustatik aktivite göstermesi, suş 9'da tüm konsantrasyonlarda etkisiz kalması, flukonazole mikrodilüsyonla dirençli bulunan suş 5, 7 ve 8'de tüm konsantrasyonlarda fungustatik aktivite göstermiştir. Bu durum da yukarıdaki açıklamalarla değerlendirilebilir. Mikrodilüsyon testi ile flukonazol dirençli bulunan suş 7 ve 8'de ise flukonazol tüm MİK katlarında etkisiz bulunmuştur. Bu göstermektedir ki bu suların MİK değerleri çalışılan konsantrasyonların çok üzerindedir ve gerçekten suş flukonazole dirençlidir.

Mikrodilüsyon testinde vorikonazol duyarlı bulunan 7 suştan (suş 1, 2, 3, 4, 6, 9, 10) dördünde (suş 2, 4, 9, 10) MİK'un 1/4, 1/2 katı konsantrasyonlarda etkisiz kalırken 1, 2, 4 MİK katlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Suş 1 ve 6'da MİK'un tüm katlarında vorikonazol etkisiz kalmıştır. Suş 3'de vorikonazol tüm MİK katlarında fungustatik aktivite göstermiştir.

Mikrodilüsyon testinde vorikonazole dirençli bulunan 2 suştan birinde (suş 5) vorikonazol tüm mik katlarında fungustatik aktivite gösterirken, diğerinde (suş 8) tüm MİK katlarında etkisiz kalmıştır.

Mikrodilüsyon testinde DBD bulunan bir suşda ise (suş 7) vorikonazol 1/4, 1/2 MİK katlarında etkisiz, 1, 2, 4 MİK katlarında ise fungustatik aktivite göstermiştir.

Azollerle ilgili olarak dikkat çeken bir nokta 8. saatteki koloni sayımına göre 24. saatteki koloni sayısında ortaya çıkan artıştır. Bu suş 2 vorikonazol, suş 3 flukonazol ve vorikonazol, suş 4 vorikonazol, suş 7 flukonazol, suş 8 flukonazol ve vorikonazol, suş 9 flukonazol ve suş 10 flukonazol ile ilgili grafiklerde görülmektedir.

Mikrodilüsyon testinde vorikonazole duyarlı ve DBD bulunan suşlardan 2, 4, 7, 9 ve 10 da vorikonazol MİK'un 1, 2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungustatik aktivite gösterip, 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonlarda etkisiz kalması doğaldır. Suş 3'de vorikonazol tüm MİK katlarında fungustatik

aktivite göstermesi, suş 1 ve 6'da MİK'in tüm katlarında etkisiz kalması görsel okuma farklılıklarına bağlı olabilir. Yine mikrodilüsyonla vorikonazole dirençli bulunan suş 5'de vorikonazol tüm MİK katlarında fungustatik aktivite göstermiştir. Mikrodilüsyonla vorikonazole dirençli bulunan suş 8'de ise vorikonazol tüm MİK katlarında etkisiz kalmış ve gerçekten dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular göstermektedirki mikrodilüsyonla tespit edilen vorikonazol direnç oranları gerçekte daha düşük olabilir. Bu farklı sonuçlar yukarıda açıklanmaya çalışılan sebeplerden kaynaklanabileceği gibi yöntem farklarından da kaynaklanıyor olabilir.

Mikrodilüsyon testinde tüm suşlar amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur. Suş 2, 3, 5, 6'da amfoterisin B MİK'in 1/4 katında fungustatik, 1/2, 1, 2, ve 4 katlarında ise fungusid aktivite gösterdiği görülmüştür. Suş 1, 4, 7, 9 ve 10'da ise 1/4 ve 1/2 MİK katlarında fungustatik, 1, 2, 4 MİK katlarında ise fungusid aktivite göstermiştir. Suş 8 de amfoterisin B tüm MİK katlarında fungusid aktivite göstermiştir.

Amfoterisin B ile ilgili olarak saptanan başka bir bulgu ise MİK ve MİK'un 2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungusid aktivitenin 4. saatten itibaren tespit edilebilmesiydi. Suşların MİK'un 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonlarda gösterdiği fungusid aktivite ise 24. saatte tespit edilebilmiş ve koloni sayısı 24. saate kadar giderek azalmıştır.

Bu da göstermektedir ki mikrodilüsyonla amfoterisin B'ye duyarlı bulunan tüm *C. albicans* suşlarının time kill testi ile de MİK'un tüm katlarında da duyarlı olduğu, MİK'un 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonda fungustatik, 1,2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungusid etki gösterdiği görülmektedir. Ayrıca amfoterisin B konsantrasyonu arttıkça etki etme süresi kısalmaktadır.

Time Kill yöntemi ile mikrodilüsyon yöntemi arasındaki tutarlılık araştırıldığında Flukonazol veya vorikonazol için bu değer yeterli olmadığı ve iki yöntem sonuçlarının aralarında tutarsız olduğu gözlenmiştir (kapa: - 0.08 p=0.7).

VI.SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığında AIDS vakalarının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının, immunsupresif ilaç kullanımının, invaziv katater uygulamaları ve majör cerrahi girişimlerin yaygınlaşması ile artış olmuştur. 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 hastalarda görülen kandidemiler mantarların neden olduğu infeksiyonlar içinde en sık morbidite ve mortaliteye yol açan hastalıklardır. Hastanede kalış süresini 30 güne kadar uzatarak maddi kayıplara da sebep olmaktadır.

Kandidemilerde en sık karşılaşılan etken *C. albicans*'tır. *C. albicans* birçok antifungale duyarlı olmakla birlikte son yıllarda direnç oranında artış olmuştur. Bu direnç artışı özellikle AIDS başta olmakla birlikte diğer immunsupresyon durumları ile ilişkilidir. Direnç artışı çok fazla sayıda olmayan antifungallere alternatif arayışlarını da hızlandırmıştır. Uzun yıllardır sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan amfoterisin B ve daha sonra kullanıma sunulan flukonazol yanında yeni geliştirilen azollerden vorikonazol ve kaspofungin gibi ilaçlar da ruhsat alarak tedavi alternatifleri arasına girmiştir. Antifungallere direnç dışında bir diğer sorun duyarlılık testlerinin standardizasyonundaki eksikliklerdir. Mayalar için CLSI'nın önerdiği standart yöntem mikrodilüsyon metodu olmasına rağmen birçok antifungalın duyarlılık sınırları netlik kazanmamıştır. Ayrıca in vitro ve in vivo sonuçlar arasında uyumsuzluklar görülebilmektedir. Bu nedenlerle alternatif duyarlılık yöntemleri arayışları ve varolan yöntemleri geliştirme çabaları da sürmektedir. Bizim bu çalışmada kullandığımız time kill yöntemi de daha çok antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini ölçmede kullanılan bir yöntem olmakla birlikte sidal ve statik etkinin değerlendirildiği farmakodinamik çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Biz bu çalışmada kan, idrar, ETA, kateter ve balgam örneklerinden izole

edilen 100 *C. albicans* suşunun amfoterisin B, vorikonazol ve flukonazole olan duyarlılıklarını mikrodilüsyon testi ile araştırdık. Daha sonra bu 100 suştan duyarlılıkları ve MİK'ları farklı 10 tanesinde time kill metodu kullanarak bu üç antifungalın MİK'un farklı katlarındaki konsantrasyonlarda aktivitesini değerlendirdik. Çalışmaya alınan 100 *Candida albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla flukonazol için MİK aralığı 0,125-64 µg/ml, MİK 50 değeri 1 µg/ml, MİK 90 değeri 16 µg/ml olarak tespit edilmiştir. 82 suş flukonazole duyarlı, 10 suş doza bağlı duyarlı, 8 suş dirençli bulunmuştur. Çalışmaya alınan 100 *Candida albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla vorikonazol için MİK aralığı 0,03-4 µg/ml, MİK 50 değeri 0,06 µg/ml, MİK 90 değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. 95 suş flukonazole duyarlı, 2 suş doza bağlı duyarlı, 3 suş dirençli bulunmuştur. Çalışmaya alınan 100 *Candida albicans* suşunun mikrodilüsyon metoduyla amfoterisin B için MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri sırasıyla 0,125-1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,5µg/ml olarak tespit edilmiştir. Hiç bir *C. albicans* suşunda amfoterisin B direncine rastlanmamıştır. Suşların hepsi amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur.

Time kill testi ile flukonazol ve vorikonazol MİK'un 1, 2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungostatik etki göstermiştir. 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonlarda ise genellikle antifungal aktivite gösterememiştir. Amfoterisin B MİK'un 1, 2 ve 4 katı konsantrasyonlarda fungusid, 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonlarda fungostatik etki göstermiştir. Aynı zamanda amfoterisin B konsantrasyonunun artışı ile etki süresinin kısaldığıda tespit edilmiştir.

Mikrodilüsyon testi ile time kill sonuçları karşılaştırıldığında ise mikrodilüsyon testinde uyumsuzluklara rastlanmıştır. Uyumsuz sonuçlar daha çok flukonazol ve vorikonazol ile yapılan çalışmalarda görülmüştür. Sonuç olarak mikrodilüsyon testi ile tespit edilen flukonazol ve vorikonazol direnç oranlarının gerçekte daha düşük olabileceği düşünülmüştür. Okuma farklılıklarını en aza indirmek için görsel okuma yerine spektrofotometik değerlendirme yapılmasının daha sağlıklı olacağı düşünülmüştür. Yapılan in vitro çalışmaların sonuçları klinik çalışmalar ile de desteklenirse özellikle duyarlılık sınırlarının belirlenmesi ve uygun doz stratejilerinin geliştirilmesi bakımından faydalı olacaktır.

Gözlemlerimize göre yapılan time kill çalışması mikrodilüsyon testine göre

ilaçlar hakkında çok daha fazla veriye ulaşmamızı sağlamaktadır. Bunlar çok değerli verilerdir. Ancak yöntem deneyimli personel ve fazla miktarda ekipman gerektirir. Bu yüzden time kill çalışmasının araştırma geliştirme çalışmaları için uygun, ancak rutin kullanım için pratik olmayan bir yöntem olduğu düşüncesindeyiz.

VII.ÖZET

İNVAZİV İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN KANDİDA TÜRLERİNİN FLUKONAZOL, VORİKONAZOL, AMFOTERİSİN B DUYARLILIKLARININ MİKRODİLÜSYON VE TIME KILL YÖNTEMİ (ZAMANA BAĞLI ÖLDÜRME KİNETİĞİ) İLE ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada invaziv infeksiyonlu hastaların kan, idrar, ETA, kateter ve balgam örneklerinden izole edilen kandida türleri konvansiyonel sistemler ve ticari kitler kullanılarak tür tayinleri yapılmıştır. İzole edilen 100 *C. albicans* suşunun üç antifungal ilaç (flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B) için MİK değerleri CLSI tarafından önerilen standart yöntem olan mikrodilüsyon ile belirlenmiştir. Mikrodilüsyon sonuçlarına göre flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli suşlar tespit edilmiştir. Bu suşlardan MİK değerleri farklı 10 tanesinde time kill yöntemi kullanılarak ilaçların farklı dilüsyonlardaki fungostatik yada fungusidal aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 100 *Candida albicans* suşunun mikrodilüsyon yöntemiyle flukonazol için MİK aralığı 0,125-64 µg/ml, MİK 50/90 değeri 1 /16 µg/ml olarak tespit edilmiştir. 82 suş flukonazole duyarlı, 10 suş doza bağlı duyarlı, 8 suş dirençli bulunmuştur. Aynı suşların MİK aralığı vorikonazol için 0,03-4 µg/ml, MİK 50/90 değeri 0,06 /1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. 95 suş vorikonazole duyarlı, 2 suş doza bağlı duyarlı, 3 suş dirençli bulunmuştur. Amfoterisin B için MİK aralığı 0,125-1 µg/ml, MİK 50/90 değeri 0,5/0,5µg/ml olarak tespit edilmiştir. *C. albicans* suşlarında amfoterisin B direnci görülmemiştir. Time kill yöntemi ile flukonazol ve vorikonazolün MİK'in 1, 2, 4 katı konsantrasyonlarda fungostatik, amfoterisin B'nin MİK'in 1/4 ve 1/2 katı konsantrasyonda fungostatik, 1, 2, 4 katı konsantrasyonlarda fungusid aktivite gösterdiği görülmüştür. Amfoterisin B'nin konsantrasyonu artıkça daha çabuk etki ettiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak testler arasındaki uyumsuz sonuçlar bize azollerdeki direnç oranlarının gerçekte daha düşük olabileceğini göstermiştir. Time kill çalışmasının araştırma geliştirme çalışmaları için uygun, ancak rutin kullanım için pratik bir yöntem olmadığı görülmüştür. Klinik çalışmalar ile de desteklenen in vitro sonuçların duyarlılık sınırlarının belirlenmesi ve uygun doz stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B, mikrodilüsyon, time kill

VIII.SUMMARY

DETECTION OF THE SENSITIVITY OF CANDIDA SPECIES ISOLATED FROM INVASIVE INFECTIONS TO FLUCANAZOLE, VORICONAZOLE AND AMPHOTERICIN B WITH MICRODILLUTION AND TIME-KILL METHOD

In this study we classified candida species derived from patient's blood, urine, ETA catheter and sputum specimens who has invasive infection by using conventional systems and commercial classification kits. We determined isolated MIC values of 100 *C. albicans* strain for three antifungal medication (fluconazole, voriconazole and amphotericin B) by using microdilution, standard method recommended by CLSI. We indicated fluconazole, voriconazole and amphotericin B resistant and sensitive strains depending upon microdilution results and for 10 strains of these which has different MIC values we investigated fungistatic or fungicidal activities of drugs in different dilutions by using time kill method.

We determined MIC range as 0,125-64 µg/ml and MIC 50/90 value as 1 /16 µg/ml of 100 *Candida albicans* strains for fluconazole by microdilution method. We founded that 82 strains are fluconazole sensitive, 10 strains are dose-dependent sensitive and 8 strains are resistant. We determined MIC range as 0,03-4 µg/ml and MIC 50/90 value as 0,06 /1 µg/ml of same strains for Voriconazole. We founded that 95 strains are voriconazole sensitive, 2 strains are dose-dependent sensitive and 3 strains are resistant. We determined MIC range as 0,125-1 µg/ml and MIC 50/90 value as 0,5/0,5 µg/ml for Amphotericin B. No amphotericin B resistance observed in *Candida albicans* strains. We observed that fluconazole and voriconazole have fungistatic affect in 1,2,4 times concentrations of MIC, amphotericin B has fungistatic affect in quarter, half concentrations and fungicide affect in 1,2,4 times concentrations of MIC by time kill method and determined that amphotericin B has more rapid affect in higher concentrations.

In conclusion, inconsistent results presents resistance ranges in azoles can be lower essentially. We think that time kill method is adequate for research studies but not practical in rutin. However, we also think that supporting results of in vitro studies by clinic researches will help us determining sensitivity ranges and developing adequate dose strategies.

Key Words: fluconazole, voriconazole, amphotericin B, microdilution, time kill

IX. KAYNAKLAR

1. Warren NG, Shadomy HJ. Candida, cyrptococcus and other yeast of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC: ASM Pres, 1999:1184-99.
2. Erbakan N. Derinin Mantar Hastalıkları . Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi,1989.
3. Bruun B, Westh H, Stenderup J. Fungemia:An increasing problem in a Danish University Hospital from 1989-1994. J Clin Microbiol Infect 1995;1:124-29.
4. Beck CM, Jarvis WR, The national nosocomial infections surveillance system: Secular trendsin the epidemiology of nosokomial fungal infectionsin the US, 1988-1990. J Infect Dis 1993;167:1247-53.
5. Kao AS, Brandt ME, Pruit WR, Conn AL, Perkins BA. The epidemiology of candidemia in two United States cities : results of a population-based active survaillance. Clin Infect Dis 1999;29:1164-70.
6. Sergio BW, Motomi M, Michael A, Robert F, Richard P.Hospital acquired candidemia. Arch Intern Med 1988; 148:2642-5.
7. Yücel A. Kandidaların dünü. Kandida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar. Eskişehir. 2002:3-27.
8. Tümbay E. Candida türleri. Ustaçelebi Ş, ed; Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitabevi, 1999:1081-86.
9. Ener B. İn vitro antifungal duyarlılık testleri: Standardizasyon ve klinik önemi. Mikrobiyol Bült 1996;30:419-25.
10. Kuştimur S. Mayaların antifungal duyarlılık testleri. 3. Antimikrobiyal Kemoterapi Günleri Kongre kitabı. Kuşadası .1997 : 118-21.
11. Yuluğ N. Antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyon girişimleri. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. Antalya. 1996: 126-127.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptbility testing of yeast; Approved Standard.NCCLS document M27-A, 1997; 17(9)

13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2, Wayne, 2002
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Proved Standard. NCCLS document M27-P, Villanova, Pennsylvania, 1992
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Proved Standard. NCCLS document M27-T, Villanova, Pennsylvania, 1995
16. Piriñciler M. Maya mantarlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığı (Tez). Samsun: On Dokuz Mayıs Üniversitesi, 1995
17. Ener B: Hastane infeksiyonu etkeni olarak mantarlar. Ustaçelebi Ş, ed; Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi, 1. Basım. 1999: 1123-27.
18. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ. Secular Trends in Nosocomial Primary Bloodstream infections in the United States. Am J Med 1991; 16: 86-89.
19. Koneman EW, Ailen SD, Janda WM. Mycology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Co, 1997: 983-1069.
20. Frye KF, Donovan JM, Drach DW. *C. glabrata* urinary infections: A Review J Urol 1988;139:1245-49.
21. Ener B. Mantar infeksiyonlarında klinikten laboratuara tanı sorunları. Ankem Derg 1998;12 :248-52.
22. Kaufman RH. Establishing a correct diagnosis of vulvovaginal infection. Am J Obstet Gynecol 1988;158:986-88.
23. 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.
24. Rodriguez-Todela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:45-48.
25. Buckley HR. Identifications of yeasts. In: Evans EG, Richardson MD,

- eds. Medical Mycology: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press,1989;97-109.
26. Tümbay E. Pratik Tıp Mikolojisi. İzmir: Bilgehan Basımevi, 1983:21-64.
 27. Berardinelli S, Opheim D. New germ tübe induction medium for the Identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1985; 22: 861-62.
 28. 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: 1422-24.
 29. Arıkan S, Tunçkanat F, Günalp S. Vajinal akıntı yakınmasıyla başvuran hastalarda etkenlerin mikrobiyolojik olarak değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bült 1997;31:103-11.
 30. 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: 591-96.
 31. Johnson EM, Davey KD, Szekely A,Warnock DW. Itraconazole susceptibilities of fluconazole susceptible and resistant isolates of five candida species. J Antimicrob Chemoter1997;36:787-93.
 32. May JL, King A, Warren CA. Fluconazole disc diffusion testing for the routine laboratory. J Antimicrobial Chemother 1997; 40: 511-16.
 33. 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: 255-60.
 34. Sivrel A, Köse Ş, Özgene O, Erdenizmenli M. Maya türü mantarların çeşitli klinik örneklerden soyutlanması ve antifungal duyarlılıkları. İnfek Derg 1997;11: 145-47.
 35. 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: 276-77.
 36. 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; 16:464-67.
 37. Yeğenoğlu Y, Uzun M, Çekmeceli P. *Candida albicans*'ın hızlı tanısında selektif kromojenik yeni besiyerleri Albicans İD, Candichrom albicans. Infeks Derg 1998; 12: 223-28.

38. 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: 454-56.
39. Kuştimur S. Mantar infeksiyonları serolojik tanısında yenilikler. 27. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. Antalya. 1996:118-20.
40. Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Rhine-Chalberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution Susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1994; 32: 506-9.
41. Erensoy E. Mantarların saptanmasında moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması. 27. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı. Antalya. 1996:121-2.
42. 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: 149-52.
43. Von Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganism by use of PCR. Clin Microbiol Rev 1994; 7:174-84.
44. Frans M, Verduyn L, Jacques FGM, Andreas V. Nosocomial Fungal infections:Candidemia. Diagnostic Microbiol infect Dis 1999;34:213-20.
45. Muray PR, Kobayashi GS, Pfaller M, Rosenthal KS. Opportunistic Mycoses, Medical Microbiology, 2nd ed. Mosby USA,1994: 431-33.
46. Koç AN,Gökahmetoğlu S, Oğuzkaya M. Antifungal susceptibility testing of yeast with broth microdilution and E-test. ANKEM 1998; 12:497.
47. Bodey GP. Candidiasis in Cancer Patients. Am J Med 1984;30: 13-19.
48. Edwards JE. Candida species, in: Mandell GL, Dolin R, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5nd ed. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2000:2656-74.
49. Kuştimur S. Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyoloji Bülteni 1994;28: 175-81.
50. Carillo-Munoz AJ, Quindos G, Tur C. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B

- cholesteryl sulphate, lipozomal amphoterasin-B, amphoterasin B lipid complex, amphoterasin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 397-401.
51. Willke Topçu A, Çerikçioğlu N. Candida türleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, ed; İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1797-808.
 52. Maenza JR, Merz WG. *Candida albicans* and related species. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. Infectious Diseases, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998:2313-22.
 53. Didier P, Michel M, Peter MS, *Candida* Colonization and subsequent infections in critically III surgical patients. Annals of Surgery 1994;220: 751-58.
 54. Dima A.S, Elias A, Ömrüm U, İssam R, Helio P, Shahe V. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *candida* species. Clin Infect Disease 1997;24: 1122-28.
 55. Dreizen S. Oral candidiazis. Am J Med 1984;30: 28-33
 56. Meunier F. Overview of the treatment of disseminated fungal infections. Amphotericin-B Colloidal Dispertion (ABCD) in the Treatment of Disseminated Fungal İnfeksiyonları. Donald WR Mackenzie, Raund Table Series 1993;32:2-11.
 57. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Mikrobiyoloji 2000. İzmir: Asya Tıp Yayıncılık, 1998:353-86.
 58. Kayaalp O. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Tıbbi Farmakoloji. Ankara:Ulucan Matbaası, 1984:832-53.
 59. Shadomy S, Pfaller MA. Laboratory studies with antifungal agents susceptibility tests and quantitation in body fluids. In: Balows A, Hausler WJ, Herman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, 1991:1173-81.
 60. Yuluğ N. Antifungal duyarlılık testleri ve antifungal ajanların önemi.3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Kongre Kitabı. İzmir. 1997 : 115-17.
 61. Wingard JR. Infections due to resistant Candida species in patients with canser who are receiving chemotherapy. Clin Infect Diseases 1994;19(1):49-53.

62. Sugar AM, Lyman CA. A Pratical Guide to Medically Important Fungi and the Diseases They Cause. Newyork: Lippincott-Raven Publishers, 1998:95-119.
63. Ener B. Antifungal direnç. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kongre Kitabı. İzmir. 1999:187-99.
64. Gün H, Başustaoğlu A, Baysallar M, Kubar A, Özyurt M. Amfotericin B'nin *Candida albicans* üzerine etkisinin geçirim elektron mikroskop ile gösterilmesi. Gata Bült 1994;36:265-69.
65. Uzun Ö. Sistemik etkili antifungal ilaçlar. Akalın E, ed; Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Ankara: Güneş Kitabevi, 1994:273-98.
66. Taşova Y. Amfoterisin B'nin lipit formülasyonları. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı. Ankara. 2001:163-79.
67. Wong-Beringer A, Jacobs RA, Gmgliellmo BJ. Lipid formulations of amphotericin B: Clinical efficacy and toxicities. Clin Infect Dis 1998;27:603-18.
68. Wingard JR, While MH, Anaissie E. A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B us amphotericin B Lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. Clin infect Dis 2000;31:1155-63.
69. Kayaalp O. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Kayaalp O, ed; Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Feryal Matbaası, 1998:293-302.
70. Warren NG, Shadomy HJ. Yeasts of medical importance. In: Balows A, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology D.C, 1991:617-29.
71. Ener B. Antifungal dirençlilik ve genetik analizler. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler Kongre Kitabı. İzmir. 1997:137-40.
72. White TC. Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. ASM News 1997;63:427-33.
73. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *C. albicans* isolates from AIDS patients involve

- specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;2378-86.
74. Johnson LB, Kaufman CA. Voriconazole (Oral and intravenous Formulations) *Clin Infect Disease* 2003;36:630-37.
75. Yıldırım ŞT. Nozokomial fungal infeksiyonlar. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı. Ankara. 2001: 141-45.
76. FDA Antiviral Drugs Advisory Committee Briefing Document For Voriconazole (Oral and Intravenous Formulations) . Newyork, October 4, 2001
77. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM. Comparative in vitro activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of candida species from Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:432-35.
78. İnci R, Hilmioğlu S. Antifungal ilaçların geleceği. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Klinik Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler Kongre Kitabı. İzmir. 1997:141-7.
79. Birinci A. Kandida türlerinin tiplendirilmesinde ve antifungal duyarlılığın belirlenmesinde çeşitli yöntemlerin karşılaştırılması (Tez). Samsun: On Dokuz Mayıs Üniversitesi; 1999:29.
80. Kuştımur S. Antifungal duyarlılık testleri. Ustaçelebi Ş, ed; Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:1159-65.
81. Gülay Z. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçen testler. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyon Toplantısı Kongre Kitabı. İstanbul. 1997:85-100.
82. Yücesoy M. Mayalar için antifungal duyarlılık testleri. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı. İzmir. 1999:191-9.
83. Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi:Current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 1996;34(3): 485-9.
84. Arıkan S. Antifungal duyarlılık testlerini ne zaman ve nasıl yapalım. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. Antalya. 2000:243-6.
85. Göller S. Klinik örneklerden izole edilen kandidaların tiplendirilmesi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları(Tez). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 1999.
86. Van Eldere J, Jouten L, Verhaeghe V, Surmont I. Fluconazole and amphotericin

- B antifungal susceptibility testing by NCCLS broth macrodilution method compared with E test and semiautomated broth microdilution test. J Clin Microbiol 1996;34:842-7.
87. Ernest EJ, Yodoi K, Roling EE, Klepser ME. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(2):578-81.
88. Bal Ç. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması. Flora 1999;4(4):219-229
89. Espinel I, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of candida spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol 2005;43(8): 3884-9.
90. Kaya D, Kaptanoğlu S, Üstüner Z, Ertör O. Nötropenik hasta örneklerinden izole edilen mayaların tiplendirilmesi ve flukonazole karşı direncin araştırılması. Klimik Dergisi 2001; 1 (14):14-6.
91. Yücesoy M. Candida türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı. Konya. 2005: 46-54.
92. Gün H, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baysallar M. Klinik örneklerden patojen etken olarak izole edilen Candida suşlarının sistemik etkili antifungal ajanlara duyarlılıkları. Gaziantep Üniv Tıp Fak Derg 1993; 4: 181-92.
93. Keçeli S, Budak F, Sönmez G, Willke A. Candida türlerinin bazı antifungallere duyarlılıklarının ve fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması. Turkish Journal of Infection 2003; 17 (3): 321-4.
94. Espinel-Ingroff AE, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995: 1405-14.
95. Hawser SP, Norris H, Jessup CJ. Comparison of a 2,3-bis (2 methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5 (phenylamino carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for

- susceptibility for antifungal agents. J Clin Microbiol 1998; 36: 1450-2.
96. Arıkan S, Gür D, Akova M. Klinik önem taşıyan *Candida* türlerinin antifungal ajanlara in vitro duyarlılıkları. ANKEM Derg 1995; 9: 60.
97. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. J Clin Microbiol 2004;42(2):718–21.
98. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol 2007; 45(3):858–64.
99. Kiraz N, Erturan Z, Uzun M, Durmaz G, Us T, Akgün Y, Anç Ö. 300 *Candida albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole duyarlılıklarının araştırılması. Klimik Dergisi 1998; 11(3):116-8.
100. Willke A, Çerikoğlu N, İnci R, Arslan H, Demirkazık A. Kanserli hastalardan izole edilen kandida türlerinin antifungallere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg 1993;23:119-22.
101. Espinel-Ingroff A. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol 1998; 36(1): 198–202.
102. Karakoç E, Kuzucu Malçok H, Aktaş E, Yazgı H. Çeşitli kandida suşlarının flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B'ye karşı antifungal duyarlılıklarının araştırılması. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı. Konya. 2005: 184.
103. Hoban DJ, Zhanel G, Karlowsky JA. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates from blood cultures of neutropenic patients. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(6):1463-4.
104. Çerçioğlu N. İnvaziv mikozların tedavisinde kullanılmakta olan ilaçların İnvitro aktiviteleri ve direnç. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı. Ankara. 2001:184.