



T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CANDIDA ALBİCANS İZOLATLARININ
ANTİFUNGAL DUYARLILIK DURUMLARININ E-TEST
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Nermin BULUT

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ

TOKAT

2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana daima yol gösteren ve tez çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Başkanımız sayın Doç. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ'ye ve öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Yunus Bulut'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dört yıl boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, iyi ve kötü günümde daima yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Son yıllarda, ciddi mantar enfeksiyonları uzun süreli antibiyotik tedavisi, artan organ ve doku nakli ve immünsüpresif ilaç kullanmanın bir sonucu olarak önemli ölçüde artmıştır. İzole edilen etkenler arasında, *Candida albicans* en sık görülen türdür. Antifungallerin rutin profilaktik ve / veya ampirik kullanımı antifungal duyarlılıktaki azalma ile ilişkilendirilmektedir. Birçok rapor *Candida albicans* izolatlarının antifungal duyarlılıklarında azalma olduğunu işaret etmektedir. Bu nedenle patojenik mayaların antifungal duyarlılık testlerinin yapılması, klinik olarak aktif antifungal ilaçların belirlenmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda *Candida albicans* izolatlarına karşı amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafunginin in vitro antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya iki yüz *Candida albicans* izolatu dahil edildi. E test ile antifungal duyarlılık testi yapılırken üretici firmanın önerileri dikkate alınmıştır. Test edilen tüm *Candida albicans* izolatları amfoterisin B, kaspofungin ve anidulafungine karşı duyarlı olarak bulunurken azol grubu antifungallerine karşı yüksek oranlarda dirençli olarak tespit edildi. *Candida albicans* izolatlarının ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol ve posakonazole karşı direnç oranları sırası ile %31, %18, %35, %22 ve %21 idi. Ülkemizde flukonazol *Candida* enfeksiyonların profilaksisi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Yeniantifungaller olan flukonazol ve vorikonazolde gözlenen yüksek MİK değerleri, daha öncesinde flukonazole maruziyet ile ilişkilendirilebilir.

Duyarlılık testlerinin yapılması, direnç gelişiminin izlenmesi açısından çok önemlidir. Direnç paterni hakkında veri elde edebilmek için antifungal sürveyans programları yapılmalıdır. Ek olarak antifungal direnç gelişiminin önlenmesi için antifungallerin uygun olmayan ve yaygın kullanımı sınırlandırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, E-test, antifungal.

ABSTRACT

In recent years, serious fungal infections have increased significantly as a result of prolonged antibiotic therapy, increased organ and tissue transplantation and using immunosuppressive drugs. Among pathogens isolated, *Candida albicans* is the most common species. The routine prophylactic and/or empirical use of antifungals have been correlated with reduced antifungal susceptibility. Many reports have indicated reduced antifungal susceptibility in *Candida albicans* isolates. Therefore antifungal susceptibility testing of pathogenic yeast is important for selecting clinically active antifungal drugs.

The aim of our study was to determine the *in vitro* antifungal susceptibilities of amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and anidulafungin against *Candida albicans* isolates. Two hundred *Candida albicans* isolates were included the study. E test procedure was performed according to the manufacturer's instructions. Although all tested isolates were found to be susceptible to amphotericin B, caspofungin and anidulafungin, we observed high resistance rates among *Candida albicans* isolates to azole drugs. The percentages of *Candida albicans* resistant to ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole and posaconazole were 31, 18, 35, 22 and 21 respectively. In our country fluconazole was widely used for the treatment and prophylaxis of candidal infections. Since voriconazole and posaconazole are new triazole drugs, high MIC values of voriconazole and posaconazole were may be associated with prior exposure to fluconazole.

Performing antifungal susceptibility testing is especially important for screening the development of antifungal resistance. Antifungal surveillance programmes must be performed for providing useful information about resistant trends. In addition, extensive and inappropriate use of antifungals must be restricted for preventing development of antifungal resistance.

Keywords: *Candida albicans*, E-test, antifungal.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Candida Enfeksiyonları	4
2.2. Tarihçe ve Tanım	4
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Patogenez	6
2.4.1. İlişkili Hücre Duvarı Komponentlerinin Patojenitedeki Rolü	7
2.4.2. Konak Ligandları İçin Bağlayıcı Proteinler	9
2.5. Candida Enfeksiyonları	11
2.5.1. Kutanöz Hastalıklar	12
2.5.2. Oral Kandidiazis	12
2.5.3. Gastrointestinal Kandidiazis	13
2.5.4. Vajinal Kandidiazis	13
2.5.5. Üriner Sistem Enfeksiyonu	13
2.5.6. İnvaziv Kandidiazis	13
2.6. Tanı	14
2.6.1. Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirme	14
2.6.2. İzolasyon ve İdentifikasyon	15
2.6.3. Serolojik Testler	18

2.6.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	19
2.6.5. Antifungal Duyarlılık Testleri	19
2.6.6. Antifungal İlaçlar	20
2.6.7. Antifungal Direnç Mekanizmaları	25
2.6.8. Antifungal Dirence Katkıda Bulunan Klinik Faktörler	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. <i>Candida albicans</i> İzolatlarının Tanımlanması	28
3.1.1. Germ Tüp Testi	29
3.1.2. Mısır Unlu Tween 80 Agarda Klamidospor Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi	29
3.1.3. API 20C AUX Tiplendirme Sistemi İle Tanımlama	30
3.2. Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	30
3.2.1. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini	31
3.2.2. İstatiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	44

KISALTMALAR ve SİMGELER

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu)

HIV: Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)

MOPS: Morfolinopropan Sülfonik Asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

MİK 50: Suşları %50'sini inhibe eden konsantrasyon

MİK 90: Suşları %90'nını inhibe eden konsantrasyon

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

SDA: Sabouraud dekstroz agar

FDA: Food and Drug Administration

KOH: Potasyum hidroksit

PLM: Fosfolipomannan

TLR-4: Toll-like receptor-4

ml: Mililitre

gr/l: Gram/litre

°C: Santigrat derece

NaCl: Sodyum klorür

µl: Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. <i>Candida albicans</i> ' a ait gram pozitif psödohif yapıları	15
2. <i>Candida albicans</i> kolonilerinden uzanan ipliksi uzantılar	15
3. Kromojenik besiyerindeki farklı <i>Candida</i> türleri	16
4. Germ tüp yapıları	17
5. <i>Candida albicans</i> 'a ait klamidospore yapıları	17

TABLULAR

Tablo	Sayfa
1. Kandidemi gelişmesinde rol oynayan risk faktörleri	6
2. Sık rastlanan <i>Candida</i> türlerinin karbonhidrat asimilasyon özellikleri	18
3. Amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin için sınır değerleri	32
4. Örneklerin bölümlere göre dağılımı	34
5. <i>Candida albicans</i> izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı	34
6. <i>Candida albicans</i> izolatlarının amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin için MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri	35
7. <i>Candida albicans</i> izolatlarının amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin antifungallerine karşı duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri	36
8. <i>Candida albicans</i> için klinik sınır değerleri	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının insidansı ve prevalansı 1980'lerden bu yana özellikle immünsüprese hasta popülasyonunda ve altta yatan ciddi bir hastalığı olan hospitalize kişilerde artmaktadır. *Candida* türleri başta gastrointestinal sistem olmak üzere tüm mukokütanoz yüzeylerinde normal flora elemanı olarak bulunurlar. Mukokutanöz enfeksiyonlar ile kan dolaşımı enfeksiyonlarına kadar değişebilen birçok hastalıktan sorumludurlar. Bu mayalar sağlıklı kişilerde kommensal yaşarlar ve immün sistemin süprese olduğu durumlarda sistemik enfeksiyonlara neden olabilirler. *Candida* cinsi insanlar için patojen olan 17'den fazla farklı *Candida* türünü içeren heterojen organizma gruplarından oluşmaktadır. Ancak invaziv enfeksiyonların %90'ndan fazlasını *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida krusei* türleri oluşturmaktadırlar (1).

Candida türlerinin patojenitesi konak savunma mekanizmalarından kaçabilmesi, aderans (yapışma) özelliği, medikal cihazlar ile konak dokuda biyofilm oluşturması, proteaz, fosfolipaz ve hemolizin gibi doku hasarı yapan hidrolitik enzimler üretmesi gibi özelliklerine bağlanmaktadır (1).

İnvaziv fungal enfeksiyonlar özellikle yoğun bakım ünitesinde olmak üzere hospitalize hastalarda giderek yaygınlaşan önemli bir sorundur. Antifungal tedavideki gelişmelere rağmen invaziv *Candida* enfeksiyonları kabul edilemez yüksek morbiditeye ve mortaliteye sahiptir (2).

Avrupa'da Yoğun Bakım Ünitesi'ndeki (YBÜ) tüm nazokomial enfeksiyonların %10'undan *Candida* türleri sorumludur. İleri yaş, nötropeni, renal yetmezlik, travma veya yanık, barsak perforasyonu, kemoterapi, diyaliz, santral venöz kateter, antibiyotik kullanımı, parantral nütrisyon, yeni geçirilmiş cerrahi operasyon, YBÜ'de 7 günden fazla kalmış olmak, nazogastrik tüp, gastrik asit inhibisyonu gibi konağa ait faktörler ve tıbbi girişimler invaziv *Candida* enfeksiyonları için risk oluşturmaktadır (2).

Son yıllarda *albicans* dışı *Candida* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyon oranlarındaki artışa rağmen *Candida albicans* en sık izole edilen tür olma özelliğini korumaktadır (3, 4). Mantarların etken olduğu mukoza enfeksiyonlarının %90-100'ü ve kandidemilerin %50-70'i *Candida albicans* tarafından oluşturulmaktadır (5).

Nazokomiyal kan enfeksiyonlarının %10'undan sorumlu olan *Candida* fungemisi ciddi sağaltım sorunları oluşturmaktadır. Kandideminin erken ve etkin antifungalle tedavisinin mortaliteyi ve hastanede kalış sũresini azalttığı bilinmektedir. Enfeksiyon bũlgesinden kũltũr alınması ve sonucunun raporlanabilmesi için gereken sũre, tedavinin başlanmasında gecikmeye dolayısıyla morbidite ve mortalitede artışa sebep olabilmektedir. (5, 4, 2). Bu nedenle en kısa sũrede izolasyon işlemi ve duyarlılık testi sonrası belirlenen uygun antifungal ilaç ile tedaviye başlanmalıdır.

Deoksikolat amfoterisin B çoğu ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisi için altın standart olarak kabul edilmiştir. Amfoterisin B'nin yeni lipid formũlasyonlarının gelişimi ve 1990'ların başlarında azol bileşiklerinin devreye girmesiyle, bu ilaçların gũvenilirliklerinin ve farmakokinetik profillerinin iyi olmasından dolayı mantar enfeksiyonlarının tedavisinde önemli ilerlemeler olmuştur. (6). Kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin olmak ũzere ũ yesi olan ekinokandinler özefagial ve invaziv kandidiazis tedavisinde kullanılmaktadırlar (7). Ayrıca in vitro olarak flukonazol veya amfoterisin B'ye dirençli *Candida* tũrlerine karşı etkilidirler. Bu yeni antifungal ajanların kullanıma girmesi, son on yılda dirençli organizmaların ortaya çıkışı konusunda endişelere yol açan fungal enfeksiyonların profilaksisi ve tedavisi için daha agresif bir yaklaşıma olanak vermiştir (6).

Son zamanlarda dũnya genelinde antifungal ilaçlara dirençli mantarların sayısında bir artış raporlanmaktadır. Bu nedenle *in vitro* laboratuvar testleri uygun tedaviyi seçmede klinisyene oldukça yardımcıdır (1). Farklı coğrafik bũlgelerde ve hastane merkezlerinde yapılan *Candida* tũrlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılık profili ile ilgili çalışmaların yayınlandığı uluslararası raporlarda belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle duyarlılık paternlerindeki değişikliklerin ve grũlme sıklığının izlenebilmesi için, *Candida albicans* izolatlarının mevcut antifungallere karşı duyarlılık durumlarının belirlenmesi gerekmektedir (8).

Antifungal duyarlılık testi için araştırma amaçlı ve/veya rutin kullanılan yöntemler makrodilũsyon, mikrodilũsyon, kolorimetrik mikrodilũsyon, spektrofotometrik mikrodilũsyon, agar makrodilũsyon, agar difũzyon, disk difũzyon

ve E-test olarak sıralanabilir (9-13). E-test yöntemi referans metodlara alternatif, pratik, güvenilir, daha erken sonuç veren, kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (10, 14, 15).

Bu çalışmada Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmiş olan olan 200 adet *Candida albicans* izolatının amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin antifungallerine duyarlılık durumlarının E-test yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Candida Enfeksiyonları

2.2. Tarihçe ve Tanım

Muhtemelen pamukçuk olan oral lezyonlara ait yazılı tanımlamalar Hipokrat ve Galen zamanına dayanmaktadır. Langenbeck 1839 yılında bir hastanın oral lezyonlarında mantar izole etmiştir. 1841'de Berg pamukçuk sebebi olarak mantarı tespit etmiş, 1843'de Robin organizmanın adını *Oidium albicans* olarak belirlemiştir. *Candida albicans* ile eş anlamda 100'den fazla isim mevcuttur. En yaygın olanları 1890 yılında Zopf tarafından kullanılan *Monilia albicans* ve 1923 yılında Berkhout tarafından kullanılan *Candida albicans*'dir. 1861'de derin yerleşimli kandidiazis olgusu ilk defa Zenker tarafından dökümente edilmiştir. Ardından 1940'da bir endokardit olgusundan ilk defa *Candida* izole edilmiştir. *Candida* enfeksiyonları tarihinin en ilgi çekici dönemi antibiyotiklerin yaygın kullanılmaya başlandığı 1940'lı yıllardır. Sonraki dönemde daha önce tanımlanmamış olan *Candida* enfeksiyonlarına ait belirtiler tanımlanmış ve *Candida* enfeksiyonlarının hemen hemen tüm formlarının insidansında ani bir artış olmuştur (16).

Candida cinsi 4-6 µm çapında, tek hücreli, tomurcuklanarak çoğalan, gerçek/yalancı hipler oluşturabilen maya morfolojisinde mantarlar olup, yaklaşık 200 civarında tür barındırır. Türler, *Deuteromycota* (Imperfect mantarlar) içinde *Cryptococcaceae* ailesinde incelenir. Ancak bu yapay bir gruptur. Çeşitli *Candida* türlerinin teleomorfları gösterildikçe aslında farklı cinsler olduğu görülmüştür (*Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Pichia* gibi). Dolayısı ile *Candida* cinsi, ilişkisiz türlerin bir karşımıdır. Doğada yaygın olarak bulunan *Candida* türleri, memelilerde başta gastrointestinal sistem olmak üzere tüm mukokütanoz yüzeylerde normal flora olarak bulunurlar. İnsanlarda oral floranın ve gastrointestinal sistem florasının % 30-50'sini kadınlarda genital sistem florasının % 20'sini oluştururlar. İzole edilen *Candida* türleri arasında en çok izole edilen tür % 60-90'lık oran ile *Candida albicans*'tir (17).

2.3. Epidemiyoloji

Candida albicans hasta örneklerinden halen en fazla izole edilen mantar türüdür. Mukoza enfeksiyonlarının %90-100'ü ve kandidemilerin %50-70'inden sorumludur. *Candida* türlerine bağlı gelişen invaziv enfeksiyonlar çoğunlukla

hastanın kendi florasında kolonize olan *Candida* türleri ile oluşmaktadır (17, 18). İnsan gastrointestinal sisteminden en sık izole edilen türler *Candida albicans* (%50-70), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata*'dır (19).

Patojen mayalar arasında *Candida spp* en yaygın tanımlanan türdür; immünsüpressif ilaçlar ile geniş spektrumlu antibiyotik kullanımındaki artış ve nüfusun yaşlanması ile birlikte *Candida* türlerinin nazokomiyal patojenler arasındaki önemi artmaktadır. Bu türler Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık dördüncü ve yoğun bakım ünitesinde kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık üçüncü nedenidir (20).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarındaki artışın sebepleri kanser hastalığı, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu, kemoterapi uygulamaları ile immünkompromise hasta popülasyonunun, konağın doğal bariyerlerini bozan invaziv işlemlerin ve *Candida* türlerinin kolonizasyonunu arttıran geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaçların kullanımının giderek artması olarak sıralanabilir (Tablo 1). Varsayılan bu faktörler özellikle YBÜ'nde yatan hastalar için geçerlidir (2).

Ülkemizde kandidemilerde *Candida albicans* izolasyon oranı %32-65 arasında değişmektedir (17).

Tablo 1: Kandidemi gelişmesinde rol oynayan risk faktörleri (2, 21)

Konağa ait Faktörler
İleri Yaş
Nötropeni
AIDS
Diyabet
İlaç Bağımlılığı
Renal Yetmezlik
Travma veya Yanık
Barsak Perferasyonu
Tıbbi Girişimler
Kemoterapi
Diyaliz
Santral Venöz Kateter
Antibiyotik Kullanımı (Eklenen Antibiyotiklerin her biri Riski Artırmaktadır)
Parantral Nütrisyon
Yeni Geçirilmiş Cerrahi Operasyon (Özellikle Abdominal)
YBÜ'de > 7 Gün Kalmak
Nazogastrik Tüp
Gastrik Asit İnhibisyonu
<i>Candida</i> Kolonizasyonu

2.4. Patogenez

Candida albicans hücreleri ve memeli konak dokuları arasındaki etkileşimler son derece karmaşıktır. İlk olarak, kolonizasyonu başlatmak için bir epitel yüzeye adezyon gereklidir. Enfeksiyon süreci çoğu olguda yüzeysel kandidiazis olarak sonuçlanan epitelyal yüzeylerin içine penetrasyon sonrası bitmektedir. Mantarlar dolaşım sistemine ulaştıklarında oradaki hücresel savunma sistemi ile yüzleşmek zorundadırlar. İnvaziv enfeksiyonlara neden olabilmesi için *Candida* hücrelerinin endotel yüzeylere penetre olup dokulara ulaşması gerekir (21).

Çoğu virülans faktörlerinin ekspresyonu enfeksiyonun evresi ile konak dokunun özelliklerine göre düzenlenir (21).

Genellikle dimorfizmin (tomurcuklanan maya olarak veya hif olarak büyümeye yeteneği) bir virülans faktörü olduğu ve diğer hücrel morfoloji ile ilişkili virülans faktörleriyle birlikte regüle edildiği kabul edilmektedir. Maya-hifal geçiş ek olarak, *Candida albicans* fenotipik geçiş olarak adlandırılan bir başka tip morfolojik değişim gösterebilir. Kendiliğinden ve geri dönüşümlü olarak farklı morfolojik ve fizyolojik durumların oluşması patojenite ile ilişkili olarak virülans faktörleri, antijenite ve antifungal ilaçlara direnç gibi özellikler sağlar. Bu dimorfik ve fenotipik geçişler *Candida albicans*'a değişen çevre koşullarına karşı daha iyi adaptasyon ve özellikle konağın immun sisteminden kaçma yeteneği kazandırır (21).

Birçok patojen mikroorganizma gibi konak yüzeyine *Candida albicans*'ın adezyonu patojenik süreçte konak dokuların kolonizasyonu için bir ön koşuldur. *Candida albicans*'ın konağa ait epitel-endotel hücrelerine, çözünebilir maddelere, ekstraselüler matrikse ve konak dokudaki yabancı maddelere adezyonu hücre duvarı komponentlerinin rol aldığı çoklu aderens mekanizmaları ile gerçekleşir (21).

Candida albicans hücrelerinin kültür filtratında hidrolitik enzimler bulunmaktadır. Bu filtratta bazı proteinlerin varlığı özellikle salgılanan ürünleri göstermesine rağmen, bazıları da hücre duvarından dökülen ya da spontan hücre lizisi ile açığa çıkan komponentler olabilir. Salgılanan proteinlerin birkaçı virülans faktörleri olarak kabul edilebilir çünkü bu ekstraselüler proteinlerin hidrolitik özellikleri konak dokunun canlılığını ve fonksiyonunu etkileyip enfeksiyonun oluşması ve ilerlemesine katkıda bulunurlar (21).

2.4.1. İlişkili Hücre Duvarı Komponentlerinin Patojenitedeki Rolü

Protein Üretimi: Salgılanan hidrolitik enzimler enfeksiyonun oluşmasına ve gelişmesine katkıda bulunan virülans faktörü olarak kabul edilebilir. Bu proteinlerin ekspresyonu ve intraselüler dağılımı çevresel koşullara bağlıdır (21).

Asit Proteinaz Salınımı: *Candida albicans*'ın hücre dışı proteolitik aktivitesi izolata ve çevre koşullarına bağlı olarak eksprese ettiği bir enzim ailesi olan aspartil proteaz enzimlerine bağlıdır. Çeşitli gözlemler sonucu kandidiyazis patogeneğinde bu proteinlerin önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür:

- Aspartil proteaz enzimleri *in vivo* enfeksiyon sırasında patojenik *Candida*

türleri tarafından salgılanır. *Candida albicans*'ın laboratuvar izolatları ve klinik izolatlarının her ikisinde üretilen proteaz düzeyi ile virülans arasında bir ilişki vardır. Dolayısıyla proteinaz üretimi, mantar hücrelerinin hem konak dokuya penetrasyon ve kolonizasyonunu hem de konak bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğini artırır.

- Bu enzimler immünglobulin ve kompleman gibi konak savunma proteinlerinde azalmaya sebep olabilirler.
- Aspartil proteaz genlerinde eksiklik bulunan genetiği değiştirilmiş izolatlar yaygın kandidiyazisi olan hayvan modelinde düşük bir virülans göstermiştir (21).

Fosfolipaz: *Candida albicans* hücreleri lizofosfolipazın yanısıra fosfolipaz A, B ve C ile lizofosfolipaz transasetilaz aktivitesi göstermektedir. Fosfolipaz aktiviteleri olası virülans faktörü olarak kabul edilmektedir çünkü bu enzimler konak hücre membran hasarı, aderens ve penetrasyonu ile ilişkilendirilmişlerdir. *Candida albicans*'ın hücre duvarı diğer hücre duvarı bileşenlerinin kovalent bağlanmasını sağlayan dallı β -1,3 glukandan oluşan iskelet yapısına sahiptir. Ayrıca farklı hücre duvarı mannoproteinleri arasında disülfid köprüleri şeklinde kovalent bağları da mevcuttur ve bazı mannoproteinler kitine bağlanmıştır. Dolayısıyla *Candida albicans* izolatları tarafından fosfolipaz üretimi fare modelinde virülans ve epitelyal hücrelere adezyon ile sonuçlanır (21).

Hemolitik Faktör: *Candida albicans* glukozdan zengin kanlı agardaki kültüründe hemolitik aktivite sergiler. Bu hemolitik aktivite maninoprotein ile ilişkilendirilmekte ve konak eritrositinin parçalanmasından sonra serbest kalan hemoglobinden demir edinilmesine imkan sağladığı için olası bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu durum *Candida albicans*'ın konak serumunda yaşayabilmesine katkı sağlamaktadır (21).

İmmünsüpresyon ve B Hücre Mitojenik Protein: İmmünsüpresif bir protein olan B hücre mitojenik protein *Candida albicans* tarafından salgılanmaktadır. B-hücresinin aşırı uyarılması ile salgılanır ve patojenin konak içinde hayatta kalabilmesi için çok önemlidir (21).

Diğer Salgılanan Proteinler: *Candida albicans* ayrıca asit fosfataz, trehalaz, glukoamilaz, esteraz, lipaz, hyaluronidaz, kondroitin sülfataz ve metallopeptidaz enzimlerini de indükleyici koşullar altında besiyeri ortamına salgılayabilmektedir. Bu

katalitik mannoproteinlerin bazılarının özellikle asit proteinaz ve fosfolipazlarla beraber etki göstererek *Candida* enfeksiyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (21).

2.4.2. Konak Ligandları İçin Bağlayıcı Proteinler

Candida albicans hücreleri ve konak arasındaki fiziksel etkileşimler hücre duvarındaki aktif radikaller tarafından yönlendirilir. Potansiyel etkileşimler konağa ait çözümlü özellikteki proteinleri, fagositik hücreler yanı sıra hücre dışı matriks proteinlerini ve mantar tarafından enfekte olabilecek herhangi bir konak hücre veya organını içerebilir. Bu etkileşimlerin patogenezdaki rolü karmaşıktır. Çünkü çok çeşitli olan adezyon faktörlerinin varlığı ve virulansa katılımları mantar izolatına, enfekte konak doku tipine ve konağın bağışıklık durumuna bağlıdır (21).

Candida albicans'ın konağa adezyonunda protein ve mannoproteinlerin rolü lipid, glukan ve kitin gibi hücre duvarı bileşenlerinininkinden daha büyüktür.

Adezyon *Candida* hücreleri ve konak arasında moleküler düzeyde farklı etkileşimler içerebilir. Ayrıca plastik yüzeylere yapışmasına ve patogenezinde önemli bir rol oynayabilen mantar hücre yüzeyi hidrofobitesine, hücre duvarı ile ilişkili mannoproteinler aracılık eder (21).

Lektin Benzeri Moleküller: Proteinöz kandidal adhezinler glikozit reseptörleri (glikoprotein ve glikolipid) ile çoğu bakteryal adezyon mekanizmasında tanımlandığı gibi lektine benzer bir şekilde etkileşebilirler. Bu tip bir etkileşim epitel hücrelerine adezyonda en önemli mekanizma olarak görünmektedir. *Candida albicans*'da birkaç lektin-benzeri molekül tanımlanmıştır. Bağlayıcı proteinler mikroorganizma için epitel hücre reseptörleri olarak görev yapan L-fruktoz-, N-asetilgalaktozamin- veya N-asetilglukozamin- içeren glikozitleri tanıyabilirler (21).

Demir alımında *Candida*'ya katkıda bulunabilen mantar hücrelerinin eritrositlere bağlama olayı eritrosit yüzeyindeki şeker ligandları tarafından sağlanır. *Candida*'nın lektin-benzeri reseptörlerinin müsin gibi tükrük proteinlerini tanıması oral kolonizasyona katkıda bulunabilir (21).

Arjinin-glisin-Aspartik Asit Motif İçeren Ligandları Bağlayan Proteinler: *Candida* hücrelerinin arjinin-glisin-aspartik asit motif içeren ligandları bağlayan yüzey proteinleri integrin analogları olarak kabul edilebilir. Bu ligantlar ekstraselüler matriks proteinlerinde bulunur. Komplemanın C3 parçası ve fibrinojen

memeli hücrelerinin ekstraselüler matrikse yapışmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. *Candida albicans* komplemanın C3 parçası için hücre yüzey reseptörleri eksprese etmektedir. Herhangi bir yüzey üzerine (epitelyal endotelial veya plastik) kompleman fragmanlarının birikmesi *Candida albicans*'ın yapışması için potansiyel bir köprü sağlayacaktır. Opsonize olan ve olmayan *Candida albicans* hücrelerinin kompleman reseptörü yardımı ile kümelenmesi mantar hücrelerini fagositozdan koruyabilen agregatların (kümeler) oluşumuna yol açabilir. Ayrıca *Candida albicans* kompleman regülatör faktörlerine bağlanarak alternatif kompleman aktivasyon yolunu düzenleyebilir ve toksik kompleman aktivasyon ürünlerini inaktive edebilir (21).

Candida albicans'ın epitelyal ve endotelial yüzeylere kolonizasyonunu kolaylaştıran ve fungal integrin benzeri reseptörler tarafından düzenlenen laminin, fibronektin ve diğer hücre dışı matriks proteinlerine afinitesinin olduğu bilinmektedir. Bazal membranın majör komponenti olan laminin *Candida albicans*'ın çeşitli yüzey reseptörleri tarafından tanınmaktadır. Endotele adezyon çalışmaları *Candida*'nın adezyonu için en önemli konak ligandının fibronektin olduğunu göstermiştir (21).

Plastik Bağlayan Proteinler: *Candida albicans*'ın plastik tıbbi cihazlara yapışması (tıbbi implant, protez ve kateter) mikroorganizmanın yayılmasını ve biyofilm oluşturmasını sağlar. Ayrıca bu biyofilmlerden kopup yayılan mikroorganizmalar akut diseminasyon hastane enfeksiyonlarının oluşmasına katkıda bulunabilir (21).

Mannan Adhezinler ve Diğer Polisakkaritler: Farklı mannan epitoplarının epitel ve endotel yüzeylere yapışma dahil kandidal adezyonda rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Mannan ayrıca eritrositlere bağlanır ve hemoliz yapar. Bu aktivite mannanın hemoglobin ve demir kullanma yeteneği ile ilişkili olabilir (21)

Mannan adezyon aktivitesi tükrük komponentlerine bağlanmaya ve *Candida*'nın yüzey karbonhidratları ile etkileşen lektin benzeri molekülleri içeren Streptokokal türler dışındaki bakterilerle etkileşime katılmaktadır. Lektin benzeri moleküller makrofaj membranında bulunmuştur. Fosfolipomannan (PLM) fagositik hücrelerin yüzeyindeki toll-like receptor-4 (TLR-4) için ligand görevi görür. Ek

olarak kitin, epitel yüzeylere aderansda bir rol oynayabilir fakat kitinin enfeksiyondaki rolü net değildir (21).

Hücre Duvarı Komponentlerine İmmünolojik Cevap: Mantar hücre duvarı komponentleri *Candida*'ya karşı doğal immün cevabın tetiklenmesi ve düzenlenmesinde temel rol oynar. Hücre duvarındaki fofolipomannan (PLM) TLR 4 için ligand görevi üstlenerek sitokin üretimini stimüle eden kandidal komponent olarak tanımlanmıştır (21).

TLR ailesinin bir üyesi fagosit hücreleri yüzeyindeki ana tanıma reseptörleridir. Bu reseptörler immün cevabı başlatır. *Candida albicans* hücrelerinin fagositozu konak reseptörleri tarafından fungal reseptörlerin tanınması ile olur. *Candida albicans*'ın hücre duvarı ile ilişkili komponentler veya salgıladığı proteinler immün sistemi uyarıcı antikor cevabını başlatan antijenlerdir. İmmünodominant komponentler arasında glikolitik enzimler (enolaz, GAPDH, PGK, ADH), ısı şok proteinleri (HSP90 ve 47 kDa ısıya yıkım ürünü ve Hsp70 aile üyeleri) ve virülans faktörleri olarak değerlendirilen diğer mannopteinler (SAP, ISM P43) vardır. Ayrıca mannan, β -1, 2-bağlantılı oligo mannozidler ve gluklan gibi protein-olmayan komponentler antijenik ve immüno-modülatör özellikler göstermektedirler. *Candida albicans* enfeksiyonlarına karşı savunmada hücrel immün cevabın önemi bilinmesine rağmen şu ana kadar yalnız birkaç hedef antijen tanımlanmıştır. Bunlar adezyon özellikleri de olan enolaz ve bir dizi mannopteindir (21).

2.5. *Candida* Enfeksiyonları

Lokalize veya sistemik enfeksiyonlara neden olabilen *Candida albicans*, normal floranın bozulması, mukokutanöz bariyerin ihlali veya hücrel bağışıklık sisteminin zayıflaması sonrasında fırsatçı enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahiptir (22).

İnvaziv enfeksiyonların büyük çoğunluğu hastada kolonize olan *Candida* izolatları tarafından oluşturulmaktadır. Enfeksiyon vasküler kateter yolu ile olduğu zaman mayanın kaynağı çoğunlukla hastanın derisindeki kolonizasyondur. Ancak sağlık çalışanlarının ellerinde kolonize olarak oluşan sekonder kandidemi salgınları da raporlanmıştır. Kritik hastalıklara, kullanılan kemoterapötik ajanlara ve parenteral beslenmeye bağlı olarak mukozal bariyerin bozulması gastrointestinal sistemin

Candida türleri için giriş kapısı olmasına sebep olmaktadır. Nadiren abse ve pyelonefrit gibi lokal enfeksiyonlara sekonder kandidemiler de bildirilmiştir (2).

Candida albicans'ın hastalık etkeni olarak sık görülme nedeni, normal florada bulunmasıdır. Ayrıca bazı virülans faktörlerine de sahip olması enfeksiyon oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır.

Bu virülans faktörleri:

- Kan dolaşımından dokuya geçtiğinde oldukça hızlı bir şekilde üreyebilme yeteneği
- Fenotipik değişiklik gösterebilme yeteneği (maya-hif)
- Antijenik değişkenlik
- Hidrofobisitesi
- Süperoksit dismutaz, katalaz ve hidrolitik enzimlerin (fosfolipaz, lipaz, aspartil proteinazlar vb.) sekresyonu
- Hücre dışı matriks proteinlerine yapışmayı sağlayan yüzey integrin benzeri moleküllerin varlığı,
- Kompleman proteinlerini bağlayıcı reseptör varlığı
- Isı-şok proteinleri varlığı olarak sayılabilir (23, 24).

2.5.1. Kutanöz Enfeksiyonlar

Kutanöz enfeksiyonlar *Candida* türlerinin en sık neden olduğu enfeksiyonlardır. Deride krem rengi, beyaz akıntısı olan eritematöz lezyon şeklinde ortaya çıkar. Aksilla, el ve ayak parmak araları, kasık ve kadınlarda meme altı gibi nemli bölgeler *Candida* enfeksiyonu için riskli alanlardır. Uzun süre elleri suda kalacak şekilde çalışan işçiler tırnak (onikomikoz) ya da tırnak yatağı (paronişi) enfeksiyonu açısından risk taşımaktadırlar (20).

2.5.2. Oral Kandidiazis

Oral kandidiyazis eritemli bukkal mukozayı örten kremi beyaz lekeler şeklinde (pamukçuk) görünürler. Belirtiler genellikle hafif olmasına rağmen ağır enfeksiyonlarda disfaji görülebilir. Ağız köşelerinde oluşan çatlaklar yaygındır ve enfeksiyonun ilk bulgusu olabilir. Oral kandidiyazis HIV'li hastalarda sıklıkla ilk enfeksiyondur ve genelde immün yetmezliğin göstergesidir (20).

2.5.3. Gastrointestinal Kandidiazis

Gastrointestinal kandidiazis en sık özofajit ve daha az sıklıkta gastrit olarak görülür. Distal özofagusta ve midedeki eroziv lezyonlar yutma sırasında artan substernal ağrıya neden olur. Endoskopi ile bakıldığında lezyonların üzerinde beyaz plakların bulunduğu gözlemlenir. Bu durumda *Herpes Simplex virüs* enfeksiyonu ile ayırıcı tanı yapılmalıdır. Özofagus kandidiyazisi öncelikle HIV ile enfekte kişilerde sık görülen fırsatçı enfeksiyon olarak tanımlanmıştır ama uygun antiretroviral tedavi kullanımı bu hastalığın prevalansında çarpıcı bir düşüşe yol açmıştır (20).

2.5.4. Vajinal Kandidiazis

Vajinal kandidiyazis daha çok postpubertal kadınları etkiler; diyabet, antibiyotik tedavisi, gebelik ve cinsel aktivite risk faktörleridir. Vajinal yanma, kaşıntı, disparoni ve klasik lor benzeri bir akıntının varlığı akut veya kronik olabilen bir enfeksiyon ile ilişkilidir (20).

2.5.5. Üriner Sistem Enfeksiyonu

Candida türlerinin neden olduğu idrar yolu tutulumu, asemptomatik mesane kolonizasyonundan hematojen yayılıma bağlı böbrek abselerine kadar değişebilir. Kalıcı mesane kateteri, diyabet, idrar yolu tıkanıklığı, üriner girişimler mesanede *Candida* kolonizasyonuna neden olabilir. Bu gibi durumlarda üretrit ve/ veya sistit de görülebilir. *Candidaların* böbreğe hematojen yolla yayılımı böbrek apsesi, papiller nekroz veya üreter ya da renal pelviste mantar topu oluşumuna neden olabilir (25).

Candida türleri ile oluşan idrar yolu enfeksiyonlarının tanısını koymak zordur çünkü bu mayalar sıklıkla vajinal bulaş sonucu veya kateter takılı ve sistemik antibiyotik tedavisi alan hastaların mesanelerinde kolonize olarak idrarı kontamine edebilirler. Kantitatif kültürler idrar yollarındaki *Candida* türlerinin önemini değerlendirmek için faydalı değildir. (20).

2.5.6. İnvaziv Kandidiazis

İnvaziv kandidiazis genellikle deri ya da mukoza dışındaki alanları kapsamaktadır. *Candida* türleri tarafından oluşturulan invaziv enfeksiyonların büyük çoğunluğu organizmanın kan dolaşımına geçmesi ve hematojen yayılımı ile oluşur. Kandidemi hematojen yolla bir veya daha fazla organa mayaların yayılması sonucu *Candida* türlerinin en az bir kan kültüründen izolasyonu ile tanımlanır (20).

Tek bir iç organın nonhematojen *Candida* enfeksiyonu yaygın değildir. Genellikle mevcut hastalığın klinik bulguları tek bir organa hematojen yayılımı düşündürür. Primer lokalize invaziv enfeksiyonlar normalde karın cerrahisi ve peritoneal kavitenin *Candida* ile kontaminasyonuna yol açan bağırsak perforasyonu sonrası görülmektedir. Derin yerleşimli enfeksiyonların diğer formları endoftalmi, menenjit, pnömoni, osteomyelit ve hepatit şeklinde sıralanabilir. Dolaşım sistemi enfeksiyonu sonrası fungal endokardit yaygın değildir fakat oluştuğunda genelde etken *Candida* türleridir. Bu enfeksiyon için risk faktörleri prostetik kapak cerrahisi, önceden var olan kalp kapak hastalığı, immünsüpresyon, intravenöz kateter ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı olarak sıralanabilir (20).

2.6. Tanı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları örneklerin olası mantar enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesinde, tipik olarak bakterilere ilişkin kriterleri kullanmaktadırlar. Bunun bir örneği, sayıca baskın olmayan mayaların (bakterilerden fazla değilse) rapor edilmemesidir. Bu yaklaşımla ilgili birkaç sorun vardır. Birincisi, normal mikroflorada mayalar bakterilere göre sayıca daha az olduğundan, mayalarda göreceli bir artış maya enfeksiyonunun işareti olabilir. Mayalardan kabaca 10 kat fazla sayıdaki bakteri miktarı, mayalarla aynı doku hacmini işgal edebilirler. İkincisi, antibakteryal tedavi gören bir hastadan alınan örnekte, daha fazla sayıda maya bulunabilir; bu bulgunun rapor edilmesi hastanın hekimini mayaların anlamı konusunda yanlış yönlendirebilir. Üçüncüsü, maya sayısı yetersiz bulunup daha ileri araştırmalara gerek görülmediği zaman maya türü rapor edilmeyebilir. Bu durum beklenmedik sonuçlara yol açabilir. Çünkü *Candida tropicalis* gibi bazı mayalar, immün yetmezlikli hastalarda özellikle saldırgan bir tutum sergilerler (23).

2.6.1. Makroskobik ve Mikroskobik Değerlendirme

Candida enfeksiyonu ön tanısı ile gönderilen numunelerden hazırlanan preparatlar boyalı ve/veya boyasız mikroskobik inceleme ile değerlendirilir. Doku, saç, tırnak ve deriye gömülü olan mantar elemanlarını belirlemek için %10 -%20'lik KOH solüsyonu kullanılır. Lam üzerine konulmuş bir damla KOH solüsyonunun içine tırnak kazıntısı, saç ve ince bir deri veya doku kesiti konulur ve üzerine lamel yerleştirilir. Hazırlanan preparat hafifçe ısıtılır ve 15 dakika soğumaya bırakılır. KOH deri tabakalarını ve keratini eriterek mantara ait yapıların daha kolay

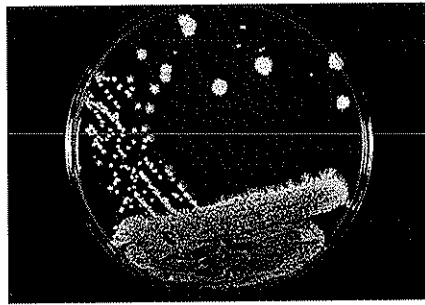
görünmesini sağlar. Mikroskopik inceleme ile psödohif yapılarının görülmesi özellikle mukokutanöz *Candida* enfeksiyonlarının tanısında değerlidir (26, 27).

Çoğu maya hücresi kısmen veya tamamen gram pozitif boyanır ve bakterilerden daha büyük olmaları, tomurcuklanan hücrelerin varlığı ile bakterilerden ayrıt edilir (*Şekil 1*) (20).



Şekil 1: Candida albicans 'a ait gram pozitif psödohif yapıları (20)

Koloniler beyazdan kreme kadar değişen renklerde veya açık kahverengindedirler. Başlangıçta krema görünümünde olup zamanla zarımsı veya girintili çıkıntılı bir hal alırlar. Bazen *Candida albicans* kolonileri sabouraud dekstroz agardaki ilk izolasyonlarında buruşuk veya pürüzlü olsa da, daha sonraki pasajlarında düzgün kolonilere dönüşürler. Birçok *Candida albicans* kökeni kanlı agarda kenarlarında kısa uzantılar olan “ayaklı koloniler” oluştururken, diğer mayaların çoğu ise bu tip koloni yapmazlar ve bu kolonilerin varlığı psödohif üretiminin varlığının mikroskopik göstergesidir (*Şekil 2*) (20, 23).



Şekil 2: Candida albicans kolonilerinden uzanan ipliksi uzantılar (20)

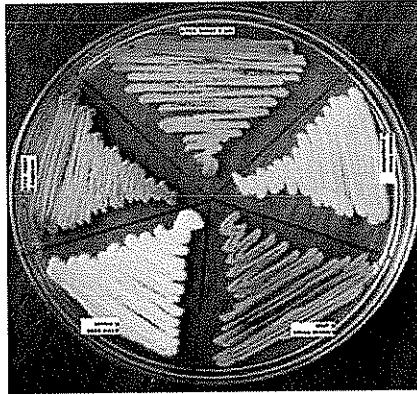
2.6.2. İzolasyon ve İdentifikasyon

Candida türleri hemen her türlü besiyerinde 48-72 saat içinde üreyebilirler. Ancak bakterilerin üremelerini engelleyen besiyerlerinin kullanılması kolaylık sağlar. Pratikte, çeşitli antibiyotikler eklenmiş Sabouraud dekstroz agar (SDA) primer izolasyon amacı ile kullanılmaktadır. Tekli ya da kombine olarak;

kloramfenikol (<16 µg/ml), gentamisin (5-100 µg/ml), penisilin (20 U/ml), streptomisin (40 µg/ml) ve siprofloksasin (5 µg/ml) en fazla eklenen antibiyotiklerdir. Ayrıca ökaryot hücrede protein sentezi inhibitörü olan siklohekzimid de besiyerlerine eklenebilir. Siklohekzimidin birçok *Aspergillus* ve *Zygomycetes* türlerini inhibe etmesi nedeniyle besiyerine eklenmesi *Candida* izolasyonu açısından fayda sağlayabilir. Ancak bazı *Candida* türlerinin de siklohekzimide duyarlı olduğu unutulmamalıdır. Dolayısıyla ekim işlemi hem siklohekzimid içeren hem de içermeyen sabouraud dekstroz agar besiyerlerine yapılmalıdır (17, 28). Sabouraud dekstroz agar besiyerinin içeriğinde dekstroz, pepton, su ve agar bulunmaktadır (29).

Candida türlerinin çoğu aerobik koşullarda 25-30 °C'de iyi üreme gösterirken bir çoğu da 37 °C ve üzerindeki ısılarda üreyebilmektedirler (23).

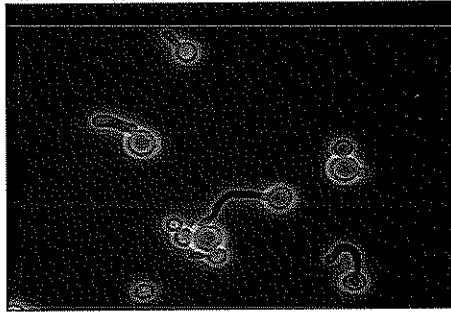
Kromojenik besiyeri *Candida* izolasyonunda kullanılan diğer bir besiyeridir. Kromojenik besiyerlerinde *Candida* türlerinin koloni morfolojilerine ve renklerine göre ayrımları yapılmaktadır. *Candida albicans* yeşil, *Candida tropicalis* mavi, *Candida glabrata* mor, *Candida krusei* toz pembe ve *Candida parapsilosis* parlak beyaz renkte koloniler oluşturur (Şekil 3) (30). Bu besiyeri, *Candida* türleri tarafından üretilen enzimlerin etkileşime girmesi ile farklı renklere dönüşen kolonilerin elde edildiği kromojenik substratlar içerir (31).



Şekil 3: Kromojenik besiyerindeki farklı *Candida* türleri (31)

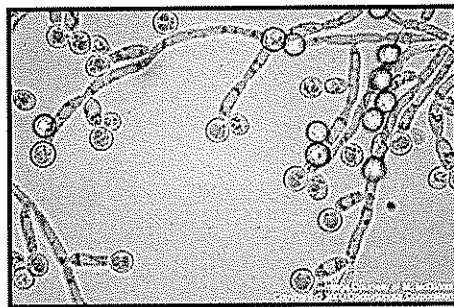
Germ tüp ve klamidosporların görülmesi de *Candida albicans* identifikasyonuna yardımcı olur (23). *Candida* türlerinin ayırımında öncelikle hızlı sonuç veren ve uygulaması kolay olan germ tüp testi yapılmaktadır. Bu test *Candida albicans*'ın albicans dışı *Candida* türlerinden ayırımında kullanılmaktadır. Germ tüp maya hücresinden parmak benzeri çıkıntı şeklinde uzayan gerçek hiftir. Bu yapı

yalancı hiften germ tüp ile maya hücresinin birleştiği yerde daralma olmaması ve germ tüpün duvarlarının birbirine paralel olması ile ayrılabilir (Şekil 4). Germ tüp testi yaklaşık olarak 0,5 ml serum (insan serumu) içeren test tüpüne birkaç maya kolonisi eklenerek elde edilen süspansiyonun 35°C'de 3 saat inkübe edilmesi ile yapılır. Süspansiyondan hazırlanan lam-lamel arası preparat mikroskopun 40X büyütmesinde germ tüp varlığı açısından değerlendirilir. *Candida albicans* dışında *Candida stellatoidea* ve *Candida dubliniensis*'de germ tüp oluştururken *Candida tropicalis*, *Candida kefyri*, *Candida krusei*'de psödogerme tüp oluşturmaktadır (20, 23, 27).



Şekil 4: Germ tüp yapıları (32)

Germ tüp testi pozitif ise sorumlu klinisyene etkenin *Candida albicans/dubliniensis* olabileceği konusunda ön bilgi verilebilir (20). *Candida albicans/dubliniensis* germ tüp pozitifdir ve büyük ölçüde fenotipik benzerlik göstermektedirler. Bu nedenle bu iki türü ayırt etmek zordur. Mantarın 42°C'de büyüme sonrası bolca klamidospore üretmesi bu iki türün ayrımında kullanılabilir (20). Bu amaçla tween 80 mısır unlu besiyeri kullanılmaktadır (33). Bu besiyerinin içeriğinde agar, saf su, tween 80 ve mısır unu özütü bulunmaktadır (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Bu besiyerinde uç kısımlarında geniş, kalın duvarlı, klamidosporeların ve septalarında yuvarlak blastokonidia kümelerinin bulunduğu psödohifler (bazen gerçek hif) oluşur (Şekil 5) (34).



Şekil 5: *Candida albicans*'a ait klamidospore yapıları (35)

Germ tüp ve klamidospore varlığı gösterilemediğinde, artrospore yok ve yalnızca hif varsa yalnızca bir ön tanımlama yapılabilir. Bu koşullar altında türlerin tanımlanması asimilasyon testlerinin kullanımını gerektirir (20).

Biyokimyasal testler mayalar için tiplendirmede kullanılan en temel testlerdir. Mayaların biyokimyasal karakterizasyonu fermentasyon veya asimilasyon testleri ile ortaya konulabilir. Karbonhidrat asimilasyon testinde, mayaların oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak çeşitli karbonhidratları kullanabilme özelliği, karbonhidrat fermentasyon testinde ise mayaların farklı karbonhidratları fermente ederek gaz oluşturup oluşturmadıkları araştırılmaktadır. Farklı inkübasyon sürelerine sahip (4-72 saat) çok sayıda ticari tanımlama sistemleri mevcuttur ve mayaların tanımlanmasında temel yöntem haline gelmişlerdir. Bu sistemler şunlardır; API 20C AUX sistem (BioMérieux), VITEK 2 sistem (BioMérieux), the mikroScan sistem (Siemens Healthcare Diagnostics), UniYeastTek sistem (Remel Laboratories) ve RapID Yeast Plus Sistem (Innovative Diagnostics Systems) (20, 36).

Sık rastlanan *Candida* türlerinden bazılarının karbonhidrat asimilasyon özellikleri *Tablo 2'*de gösterilmiştir (19).

Tablo 2: Sık rastlanan *Candida* türlerinin karbonhidrat asimilasyon özellikleri

Türler	Glu	Mal	Sük	Tre	Gal	Ksi	Raf	Lak
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-

Glu: Glikoz, Mal: Maltoz, Sük: Sükröz, Tre: Trehaloz, Gal: Galaktoz,

Ksi: Ksiloz, Raf: Rafinoz, Lak: Laktoz, Üre: Üreaz

2.6.3. Serolojik Testler

Serumda antikor ve/veya antijen titrelerinin saptanması mantar enfeksiyonlarının tanısında yararlı olabilir. Seri olarak yapıldıklarında, antikor/antijen titreleri hastalığın seyri ve hastalığın tedaviye yanıtının izlenmesi açısından da bilgi vermektedirler (25).

Serumda ve diğ er vücut sıvılarında mantar hücre duvarı bileş enleri, stoplazmik antijenler ve metabolitlerin saptanması, invaziv mantar enfeksiyonunun serolojik tanısı için kullanılabilir. *Candida*'nın hücre duvarı bileş eni olan mananın proteininin saptanması için günümüzde testler bulunmaktadır. Ancak bu testlerin klinik değ eri henüz belirgin değ ildir. *Candida* ile enfekte olmuş hastaların serumlarında diğ er bir hücre duvarı bileş eni olan 1,3-β-glukan da bakılabilir. Mantarların varlığını gösteren, fakat enfeksiyona yol aç an organizmayı tanımlamayan 1,3-β-glukan testi ile ilgili ç alış malar, oldukça seç kin belirli hasta gruplarında ümit vericidir (25).

Mantar metabolitlerinin saptanması kandidozda hızlı tanı potansiyeline sahiptir. Serumda D-arabinitol saptanması hematojen yayılım gösteren bir kandidozun göstergesidir. Ticari bir testin bulunmamasına ve yönteme bağı lı olarak duyarlılık ve özgülükte ortaya ç ıkan değ iş ikliklerle ilgili problemler yaş anmasına bağı lı olarak metabolit saptanmasının tanı amaçlı kullanımı belirsizliğini korumaktadır (25).

2.6.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Candida albicans'ın gen sekansının 2004 yılında tanımlanması ile moleküler tanı yöntemleri kullanılmaya baş lanmıştır. Moleküler tanı yöntemleri direkt klinik materyalden (kan, serum, plazma, steril vücut sıvıları ve doku örnekleri) kandidiyaz tanısının koyulabilmesine olanak sağ larken; pahalı olması, standardizasyonun olmaması nedeni ile rutin laboratuvarlarda tercih edilmemektedir (36) .

Moleküler tanıda kullanılan Real-time PCR, floresan ile iş aretlenmiş türe spesifik problemlerin kullanıldığı yeni bir testtir. Bu test kısa sürede sonuç vermesi, kontaminasyon riskinin az olması ve tür düzeyinde identifikasyon yapabilmesi yönleri ile avantajlıdır (37).

2.6.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

In vitro antifungal duyarlılık testleri, epidemiyolojik ç alış malarda ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık olarak kullanılmaktadır. Direnç oranlarındaki artış, antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyon ç alış malarına olan gereksinimi arttırmıştır (38).

Antifungal duyarlık testi için kullanılan yöntemler sıvı makrodilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, spektrofotometrik mikrodilüsyon, agar makrodilüsyon, agar difüzyon, disk difüzyon ve E-test olarak sıralanabilir (9-13).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'in antifungal duyarlılık alt komitesi 1982 yılından beri *Candida* türlerinde standardizasyon çalışmalarını sürdürmektedir. Bu komite 1992'de M27, 1995'de M27-T, 1997'de M27-A, 2002'de M27-A2 ve son olarak 2008'de M27-A3 dokümanında antifungal duyarlılık testi olarak mikrodilüsyon yönteminin kriterlerini yayınlamıştır (39- 44). Maya mantarlarının antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek üzere standardize edilmiş olan mikrodilüsyon yönteminin son versiyonu M27-A3 dokümanıdır (13).

Tüm dünyada anti bakteriyel duyarlılık testleri için en sık kullanılan yöntem disk difüzyon yöntemidir. CLSI M44-A2 dokümanında *Candida* türlerinin flukonazole, posakonazol, kaspofungin ve vorikonazole duyarlılığını belirlemek için kullanılan disk difüzyon yöntemi standardize edilmiştir (45).

E-test yöntemi pahalı fakat uygulaması kolay, tekrarlanabilir, ek malzemelere ihtiyaç olmadan MİK değerlerinin saptanabildiği bir yöntemdir (10, 14, 15). E-test bir antifungal sabit gradienti olan 15 farklı konsantrasyonda içeren ve bu antifungalın MİK değerini belirlemek için kullanılan plastik bir şerittir. Bu antifungal duyarlılık yöntemi, difüzyon temeline dayanmaktadır. Ticari olarak amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin, anidulafungin ve 5-flusitozin, E-test şeritleri mevcuttur. Çalışmalar mayaların *in vitro* duyarlılıklarını belirlemek için kullanılan E-test yönteminin broth mikrodilüsyon metodu kadar güvenilir olduğunu göstermiştir (9- 11, 20, 38, 46-48).

In vitro antifungal duyarlılık testleri, ilaç geliştirme çalışmalarına ve epidemiyolojik çalışmalarda antifungal direnç gelişiminin izlemesine yardımcı olarak tedaviyi yönlendirmede giderek daha önemli bir rol oynamaktadır (49- 51).

2.6.6. Antifungal İlaçlar

Antifungal ilaçların çoğunun ciddi yan etkiler, dar antifungal spektrum, dokulara kötü penetrasyon ve dirençli mantarları seçme gibi birçok olumsuz özellikleri vardır. Umut verici yeni ilaçlar geliştirilmekte ve bunların bir kısmı klinik uygulamalarda denenmektedir. Mantar hücrelerinin insan hücreleri gibi ökaryot yapıda olmalarının yanısıra hücresel ve moleküler süreçlerinin çoğunun benzer

olması ve hatta genler ile proteinler arasında oldukça fazla özdeşlik bulunması, uygun bir antifungal hedef bulunmasını zorlaştırmaktadır (52).

Candida enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungaller dört gruba ayrılırlar.

Polyen Grubu Antifungal İlaçlar

Polyen grubu antifungallerden olan amfoterisin B ve nistatin hücre zarı ergosterolüne bağlanırlar.

Amfoterisin B

En önemli polyen antibiyotik amfoterisin B olup bir streptomiset metabolitidir. Diğer bir polyen olan nistatin topikal bir ilaçtır. Amfoterisin B ciddi sistemik mikozlarda en etkili ilaçtır. Geniş bir etki spektrumu olan bu antifungale direnç gelişimi nadirdir. Mantar hücre membranında ergosterol ile kompleks oluşturup yeni iyon kanallarının oluşumuna neden olarak membran bütünlüğünün bozulup hücrenin ölmesine neden olur. Amfoterisin B'nin ergosterole olan afinitesi memeli hücre zarında bulunan kolesterole karşı olandan daha fazladır. Klinik çalışmalarda, amfoterisin B'yi lipozomlar ve lipid emülsiyonlar içine paketlemenin daha başarılı sonuçlar oluşturduğu gösterilmiştir. Lipit preparatlar daha az toksiktir. Daha yüksek konsantrasyonlarda amfoterisin B kullanımına olanak sağlarlar. Amfoterisin B'ye cevap doz ve veriliş yolundan, mikotik enfeksiyonun yerinden, hastanın immün durumundan ve patojenin duyarlılığından etkilenmektedir (8, 52, 53).

Amphoterisin B ergosterole bağlanır. Bu etkileşim aköz porların (sulu gözeneklerin) oluşumuna neden olur. Bu oluşum sayesinde amphoterisin B fosfolipid etkileşimlerinden kurtulur. Polyen direncinin potansiyel moleküler mekanizmaları, hücrenin toplam ergosterol konsantrasyonundaki azalma, polyen bağlayıcı sterollerin bir kısmının veya tamamının değiştirilmesi ve mevcut ergosterolün maskelenmesi ya da reoryantasyonu şeklindedir. Hücre zarındaki sterollerde meydana gelen niteliksel ve niceliksel değişiklikler nedeniyle polyen dirençli mantarların ortaya çıktığı raporlanmıştır. Polyen dirençli bir dizi *Candida albicans* izolatlarının ergosterol içeriğinde % 74 ila % 85 oranında bir azalma kaydedilmiştir (6).

Azol Grubu Antifungaller

Tüm azol bileşikleri, 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek antifungal etki gösterir. Yapısal olarak imidazoller ve triazoller olmak üzere ikiye ayrılır. İmidazoller arasında yalnızca ketokonazolün sistemik etkinliği vardır. Triazollerin tümü sistemik etkinliğe sahiptir. Bu grupta flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol bulunmaktadır. Azoller *Candida* türlerine karşı fungistatik aktivite gösterirler (25).

Pek çok mikozda oral alınabildikleri ve daha az toksik oldukları için amfoterisin B'nin yerini almışlardır (52).

Moleküler düzeyde, azol direncinin kazanılması için farklı mekanizmalar tarif edilmiştir. Bunlar artmış eflüks pompasına bağlı ilacın azalmış birikimi, hedef enzim olan lanosterol 14 α - demetilaz üzerindeki etkilerinin engellenmesi, ergosterol biyosentezindeki diğer enzimlerde meydana gelen değişiklikler ve mantar membranının ilaca olan geçirgenliğindeki azalmadır. Muhtemelen azollere karşı en önemli direnç mekanizmaların biri ilacın multidrug eflüks taşıyıcı genlerinin up-regülasyonu sonucu hücre içinde ilacın birikimine izin verilmemesidir (6).

Ketokonazol

Lipofiliktir ve oral yoldan emilim gösterir. Proteine yüksek oranda bağlandığı için santral sinir sistemine geçişi zayıftır. Mide, karaciğer toksisitesi, döküntü gibi yan etkileri vardır. Daha etkili ve daha az toksik ilaçların elde bulunması nedeni ile ketokonazol kullanımına yönelik klinik endikasyonlar oldukça sınırlıdır (25).

Flukonazol

Candida enfeksiyonlarının proflaksi ve tedavisinde en sık kullanılan geniş spektrumlu bir azol grubudur. Oral biyoyararlanımı mükemmel ve toksisitesi düşüktür. Flukonazolün proflaksi veya tedavi amacıyla yaygın kullanımı sonucu *Candida* türlerinde flukonazole karşı direnç gelişimi çeşitli araştırmalarda klinik bir sorun olarak ortaya konmuştur. Albicans dışı *Candida* türlerinden özellikle *Candida krusei*, flukonazole doğal dirençli iken *Candida glabrata* izolatları flukonazole genellikle dirençli veya doza bağlı duyarlıdır. Flukonazol oral ya da intravenöz yoldan uygulanabilir. Santral sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm organ ve dokulara yayılır (53- 55).

Flukonazol 1990'ların başında oro-özofageal kandidiyazis tedavisinde ve profilaksisinde tercih edilen antifungal ajan haline gelmiştir. Sonraki yıllarda hastalarda % 41'e kadar varan flukonazol direnci tespit edilmiştir (6).

Itrakonazol

Intravenöz formülasyonu olan itrakonazol iyi bir biyoyararlanıma sahiptir. Bu ajan daha çok mukozal *Candida* enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Kandidemi ve invaziv kandidiazis tedavisindeki rolü ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Flukonazole karşı dirençli *Candida krusei* ve *Candida glabrata* kökenlerinin tümüne olmasa da bir kısmına karşı etkinliği vardır. (8, 53).

Vorikonazol

Flukonazolden türetilmiş sentetik bir triazol olan vorikonazol, *Candida* türlerine karşı güçlü aktiviteye sahip bir antifungaldir. Mukozal ve sistemik kandidiazis tedavisi için onaylı olan bu ilacın santral sinir sistemine geçişi iyidir. Hepatosplenik kandidiyazis dahil yaygın *Candida* enfeksiyonlarında vorikonazol ile çok başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Vorikonazol direnci nispeten nadir olmakla birlikte yüksek MİK ile ilişkili tedavide başarısız olunan olgular raporlanmıştır (56-58).

Vorikonazol, faz 3 çalışmalarının yapıldığı Avrupa ve Amerika'daki araştırmalarda avantajlı bir konumdadır. *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus*'un 14- α - demetilaz enzimini flukonazole göre sırası ile 1,6 ve 160 kat daha güçlü bir şekilde inhibe eder. Flukonazolden farklı olarak vorikonazol bazı mayaların ve filamentöz mantarların 24 metilen dihidro lanosterol demetilaz enziminin demetilasyonunu da engeller. Bu da vorikonazolün flukonazole cevap vermeyen mikozlara karşı neden etkili olduğunu açıklamaktadır. Bu nedenle vorikonazol flukonazolden daha geniş antifungal etki spektrumuna sahiptir. Bu antifungal farmakokinetik özellikleri açısından itrakonazole göre daha üstündür. Çünkü oral yolla daha iyi absorbe olur ve gastrik pH'dan etkilenmez. Vorikonazol çapraz dirençli izolatlar rapor edilmiş olmasına rağmen *in vitro* olarak flukonazol duyarlı veya dirençli *Candida* türlerine karşı aktiftir. *Candida* türlerine karşı fungistatiktir. *In vitro* olarak flukonazolden 16 kata kadar daha aktif olmasının yanısıra azol duyarlı ve dirençli *Candida* türlerine karşı da amfoterisin B'den daha etkilidir (6).

Posakonazol

İkinci kuşak bir triazol olan posakonazol yapısal olarak itrakonazol analogu olup etki spektrumu açısından vorikonazole benzemektedir. Mayalara ve dimorfik mantarlara karşı yüksek etkinliğe sahiptir. Kandidemi tedavisinde sık kullanılmamaktadır. Bu durumun başlıca nedeni yalnızca oral formülasyonunun bulunmasıdır (53, 56). İtrakonazolden 10 kat daha güçlü bir şekilde *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus flavus* küflerinin lanosterol demetilaz enzimlerini inhibe etmektedir. Mayalara karşı daha az etkili gözükmeyle birlikte *in vitro* olarak vorikonazole benzer bir etki spektrumuna sahiptir (6).

Posakonazolün 2006 yılında hematopoietik kök hücre trasplant alıcılarında gelişebilecek invaziv fungal enfeksiyon profilaksisinde, orofaringeal kandidiazisin tedavisinde ve ayrıca Avrupa'da koksidioidomikozis, miçetoma, kromoblastomikozis, fusariozis ve aspergillozisi içeren dirençli fungal enfeksiyonlarda kullanımı onaylanmıştır (56- 58).

Hücre Duvarına Etkili Ajanlar (Ekinokandinler)

Ekinokandinler mantar hücre duvarındaki β -(1,3)-D-glukan sentezini inhibe ederek üreyen mantar hücrelerinin parçalanmasına yol açan lipopeptid bir antifungal ajandır. Çoğu *Candida* türüne karşı doza bağımlı fungisidal aktivite gösterir. Kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin olmak üzere üç üyesi olan ekinokandinler invaziv kandidiazis ile özefagial kandidiazis tedavisinde kullanılmaktadır (7). Ekinokandinler intravenöz olarak uygulanmaktadır. Proteine bağlanma oranları yüksektir. Beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyonları düşük olmakla birlikte tüm ana organlara yayılırlar. Çok iyi tolere edilen bu antifungallerin diğer ilaçlarla etkileşimleri çok azdır (25).

Ekinokandinler (1,3)- β -D-glukan sentaz enzimini nonkompetitif bir şekilde inhibe ederek mantar hücre duvarının sentezini bloke eder. Bu durum zayıf bir duvar oluşumu sonrası hücrenin lizisine yol açar. Ekinokandinler *in vitro* olarak flukonazol veya amfoterisin B'ye dirençli olanlar dahil *Candida* türlerine, *Aspergillus terreus* dahil *Aspergillus* türlerine, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, bazı az bilinen dimorfik ve ipliksi mantarlar ile *Sporothrix schenckii*'ye etkilidir. *Cryptococcus neoformans* veya *Mucor* türlerine karşı ise etkili değildirler (6).

Kasporfungin

Kasporfungin oral biyoyararlanımı zayıf olan ve suda-çözünen yarı-sentetik bir ekinokandindir (6). Bu antifungal kandidemi dahil invaziv kandidozlar için 2003 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Kasporfunginin orofaringeal ya da özefageal kandidiyaz tedavisinde kullanıldığında hem amfoterisin B deoksikolat, hem de flukonazol kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Kasporfungin, flukonazol dirençli özefageal kandidiyazisli hastaların %72'sinde etkili bulunmuştur. Tüm *Candida* türlerine karşı etkili olmakla beraber *Candida parapsilosis* ve *Candida guilliermondii* gibi bazı izolatlarla karşı MİK değerleri oldukça yüksektir. (23, 53, 56).

Anidulafungin

Anidulafungin *Candida* türlerine karşı fungisidal etkilidir (25). Bu antifungal özofageal kandidiyazis ve kandidemi gibi ciddi mantar enfeksiyonları ile diğer *Candida* enfeksiyonlarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (60).

İnvaziv kandidiyazisin tedavisinde flukonazol ile anidulafunginin karşılaştırıldığı randomize, çift-kör, çok merkezli bir çalışmada anidulafunginin en az flukonazol kadar etkili olduğu gösterilmiştir (61). Bir başka çalışmada özofageal kandidiyaziste HIV pozitif hastalarda %80 yanıt elde edilmiş ve ciddi yan etki bildirilmemiştir (56).

Nükleik Asit Sentez İnhibitörleri

Flusitozin florlanmış bir pirimidin olup antimetabolit olarak etki gösterir. Oral formu mevcuttur. Mantar hücreindeki protein, DNA ve RNA sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir (23).

Flusitozinin antifungal spektrumu, *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* türleri, *Sacharomyces cerevisiae* ve bazı esmer küflere sınırlıdır. Sekonder direnç gelişme eğilimi nedeniyle amfoterisin B veya flukonazolle kombine edilerek kullanılır (25).

2.6.7. Antifungal Direnç Mekanizmaları

Antifungallere direnç mekanizmalarının anlaşılmasında en büyük rolü, invaziv mikozların en sık etkeni olması nedeni ile *Candida* türleri oynamaktadır. *Candida* türlerinin direnç kazanma amacıyla antifungal ilaçlarda değişiklik oluşturma özelliklerinin olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca antifungal

direnç genleri hücreden hücreye aktarılmaz. Bu nedenle antifungal direnç antibakteryal dirence göre daha yavaş gelişir. Dirençte rol oynayan mekanizmalar dışı atım pompaları, hedef değişiklikleri ve ilacın hedef bölgeye girişinin azaltılması olarak sıralanabilir (25).

Polyenler

Amfoterisin B'ye karşı direnç uzun süredir kullanılmakta olmasına rağmen yaygın değildir. Amfoterisin B'ye duyarlılığın azalması *Candida lusitanae*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* ve *Candida guilliermondii* izolalarında bildirilmiştir. Bu ilaca dirençli *Candida* hücrelerinde ergosterol içeriğinin azalmış olduğu, ergosterollerin polyene daha az bağlanan fekosterollerle yer değiştirdiği, sterik ve termodinamik faktörlerle hücre membranındaki ergosterolün maskelenerek polyenlere bağlanmanın engellendiği gösterilmiştir. Dirençli *Candida* türlerinin sterol analizleri C-8 sterol izomeraz enzimini kodlayan ERG2 veya C-5 sterol desaturaz enzimini kodlayan ERG3 genlerinin kusurlu olduğunu düşündürmektedir (25).

Azoller

Flukonazol başta olmak üzere azollerin hem tedavi hem de profilakside yaygın kullanımı bu ilaçlara karşı dirençte artışa neden olmuştur. *Candida krusei*'nin bu ilaca intrinsek dirençli olduğu düşünülmektedir. Vorikonazol ve posakonazol, dirençli *Candida* türlerine karşı flukonazolden daha güçlü etki göstermesine rağmen bu ilaçlarının etkinlikleri arasında kısmen çapraz direnci düşündüren güçlü bir pozitif korelasyon bulunmaktadır (25).

Candida türlerinin azollere karşı gösterdiği dirençte, ilacın hedefindeki enzimlerin miktar ve kalitesindeki değişiklikler ile ilacın hedef bölgeye girişindeki azalma rol oynayabilir. Hedef enzim olan lanosterol 14 α -demetilazı kodlayan gendeki (ERG11) nokta mutasyonları, hedef değişikliğine yol açarak azollere olan afiniteyi azaltır. Bu genin aşırı ekspresyonu enzimin aşırı üretilmesi ile inaktivasyon için ihtiyaç olan ilaç konsantrasyonunun artmasına neden olur. Dışarı atım pompalarını fazla çalışması da hedef bölgedeki ilaç konsantrasyonunun azalmasına neden olur (25).

Ekinokandinler

Ekinokandinlere karşı azalmış duyarlılık *Candida* türlerinde çok nadirdir. Glukan sentezi enzim kompleksinin katalitik alt ünitesi olan integral membran proteinini kodlayan FSK1 geninde nokta mutasyonu meydana gelmesi izolatların, ekinokandinlerin tümüne karşı direnç kazanmasına neden olur (25).

Flusitozin

Candida türlerinde, tedavide tek başına kullanıldığında flusitozine karşı direnç geliştiği gösterilmiştir. Bu direnç ilaç alımının azalmasına, flusitozini 5-Florourasil (sitozin deaminaz) ve 5- florüridilik aside (FUMP pirofosforilaz) dönüştürmek için gerekli olan enzimatik aktivitenin kaybına bağlı olarak gelişebilir. 5-florourasilmonofosfat oluşumunda gerekli olan urasil fosforibozil transferaz aktivitesinin kaybı da direnç gelişimine neden olur (25).

2.6.8. Antifungal Dirence Katkıda Bulunan Klinik Faktörler

Antifungal ilacın *Candida* türlerine karşı etkili olması, klinik başarı için yeterli değildir. Konak, ilaç ve etken patojenin birbirleri ile etkileşimleri, konağın bağışık durumu, enfeksiyonun yeri ve şiddeti, yabancı cisim varlığı, enfeksiyon bölgesinde ilacın etkinliği, tedavinin dozu ve süresi ile antifungal rejime hastanın uyumundan etkilenmektedir (25).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Mayıs 2006-Ocak 2012 tarihleri arasında, hastanemizin çeşitli bölümlerinden (Tablo 4) mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve farklı örneklerden (Tablo 5) enfeksiyon etkeni olarak izole edilen, her hastaya ait tek bir izolat olmak üzere *Candida albicans* olarak tanımlanan 200 izolat çalışma kapsamına alındı.

3.1. *Candida albicans* İzolatlarının Tanımlanması

Enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş olan *Candida albicans* izolatları tanımlanırken gram boyama ve germ tüp testi yapıldı. Sonrasında tween 80 mısır unlu besiyerinde klamidospore oluşturma yeteneğine bakılıp API 20C AUX (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) ticari kiti ile karbonhidrat asimilasyon testi yapıldı. *Candida albicans* olarak tanımlanan izolatlar antifungal testler uygulanana dek -70 °C'de, %20 gliserol içeren stok besiyerinde saklandı. -70 °C'den çıkarılan izolatlar oda sıcaklığına getirildikten sonra sabouraud dekstroze agar besiyerine pasaj alındı. Pasajlar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen maya kolonilerine tekrar gram boyama ve germ tüp testi yapıldı. Bu işlemler sonrası *Candida albicans* olduğu belirlenen izolatlara E-test yöntemi ile antifungal duyarlılık testi uygulandı.

Sabouraud dekstroze agar

Besiyerinin içeriği (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England):

- ✓ D-Glikoz 40 gr/l (gram/litre)
- ✓ Pepton 10 gr/l
- ✓ Agar-agar 15 gr/l
- ✓ Siklohegzimid 500 mg
- ✓ Kloramfenikol 50 mg

Hazırlanışı:

- ✓ Toz halindeki besiyeri karışımının 65 gramı 1000 ml distile su içerisinde eritildi.
- ✓ Otoklavda 121 °C 15 dakika sterilize edildi.
- ✓ 500 mg siklohegzimid 10 ml aseton da eritildi.
- ✓ 50 mg kloramfenikol 10 ml %95'lik alkolde eritildi.
- ✓ Antibiyotikleri steril edilmiş olan besiyerine eklendi.
- ✓ Steril cam petri plaklarına 4-6 mm (milimetre) kalınlığında döküldü.

3.1.1. Germ Tüp Testi

Yaklaşık olarak 0,5 ml serum (insan serumu) içeren 12x75 mm boyutlarındaki test tüpüne birkaç maya kolonisi eklenerek süspansiyon vortekslendi. Tüp 35°C'de 3 saate kadar inkübe edildi. Süspansiyondan hazırlanan lam-lamel arası preparat mikroskopun 40x büyütmesinde germ tüp varlığı açısından değerlendirildi. İncelemede ana hücreden orijin alan, başlangıç noktasında boğumlanma yapmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık göstermeyen filament şeklindeki uzantılar germ tüp olarak değerlendirildi (Şekil 4) (20, 26).

3.1.2. Tween 80 Mısır Unlu Besiyerinde Klamidospor Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi

Tween 80 mısır unlu besiyerinin ortasına saf maya kolonilerinden bir çizgi ekim ve onu kesecek şekilde üç çizgi ekim yapıldı. Ekim çizgilerinin üzerine, çizgilerin plak dışına bakan bölümünün yarısını kapatacak şekilde alevden geçirilerek steril edilip soğutulan lamel yerleştirildi. Plaklar etrafı parafilm ile kapatılarak 26°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekimler ışık mikroskopunda diyafram kapalı olarak 10x ve 40x büyütmede incelendi. Klamidosporlar ile psödohiflerin varlığı *Candida albicans* veya *Candida dubliniensis* olarak değerlendirildi (20, 26).

Tween 80'li Mısır Unlu Besiyerinin Hazırlanması

Besiyerinin içeriği (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England):

- ✓ Mısır unu: 40gr
- ✓ Agar: 20gr
- ✓ Tween 80: 10ml
- ✓ Distile su: 1000ml

Hazırlanışı:

- ✓ Mısır unu tartılarak distile su içinde eritildi.
- ✓ Karışıma agar ve tween 80 eklendi.
- ✓ Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.
- ✓ Steril cam petri plaklarına 4 mm kalınlığında döküldü.

3.1.3.1. API 20C AUX Tiplendirme Sistemi ile Tanımlama

API 20C AUX (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) ticari kiti 19 karbonhidrat asimilasyon testinin hazırlandığı 20 mikrokuyucuk içermektedir. Test edilen karbonhidratlar: glikoz, gliserol, 2-keto-D-glukonat, L-arabinoz, D-ksiloz, adonitol, ksilitol, galaktoz, inositol, sorbitol, α -metil-D-glikozit, asetil-D-glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sükroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur.

Testin Uygulanması:

Stripin hazırlanması: İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu.

İnokülasyon: Sabouraud dekstroz agar besiyerinde üreyen *Candida albicans* kolonileri ile 2 ml %0,85'lik NaCl solüsyonu kullanılarak yoğunluğu 2 McFarland olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Maya süspansiyonu kitin içindeki ampullerde hazır olarak bulunan sıvılara 100'er μ l aktarıldı. Daha sonra stripteiki mikrokuyucuklara dağıtıldı ve 35°C etüvde 48 saat inkübe edildikten sonra üretici firmanın talimatlarına uygun olarak okundu.

3.1. Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Candida albicans izolatlarının antifungal duyarlılıkları RPMI 1640 besiyeri kullanılarak E-test yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla:

- ✓ Amfoterisin B - (0.002-32 μ g/ml)
- ✓ Ketakonazol - (0,002-32 μ g/ml)
- ✓ Flukonazol - (0.016-256 μ g/ml)
- ✓ İtrakonazol - (0,002-32 μ g/ml)
- ✓ Vorikonazol - (0.002-32 μ g/ml)
- ✓ Posakonazol - (0,002-32 μ g/ml)
- ✓ Kaspofungin - (0.002-32 μ g/ml)
- ✓ Anidulafungin - (0,002-32 μ g/ml)

E test şeritleri kullanıldı (AB BIODISK, Sweden ve LIOFILCHEM s.r.l., Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy).

İnokülümün Hazırlanması: Saf maya kolonilerinden bir miktar alınıp 5 ml steril serum fizyolojik içinde CrystalSpec (BD, USA) cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.

RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması

Besiyerinin içeriği (L-glutaminli, Sigma, USA):

- ✓ RPMI 1640: 10,4 gr
- ✓ MOPS: 34,53 gr
- ✓ D-Glikoz: 20 gr
- ✓ Agar: 15 gr
- ✓ 1 M NaOH: 80-90 ml
- ✓ Distile su: 1000 ml

Hazırlanışı:

- ✓ Steril cam balon içinde MOPS (3-(N-morpholino) propansulfonik asit) ve RPMI 1640, 450 ml steril distile ile çözüldü.
- ✓ Çözelti 50 ml'lik enjektör yardımı ile 0,2 µm'lik filtreden pozitif basınç yolu ile geçirilerek sterilize edildi.
- ✓ Glikoz ve agar 450 ml distile suda çözümlenerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi.
- ✓ Ardından 45-50 °C'ye soğutuldu.
- ✓ Hazırlanan her iki solüsyon karıştırıldı.
- ✓ 1 M NaOH ilave edilerek pH 7,0 ± 0,1 olarak ayarlandı.
- ✓ Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı.
- ✓ Besiyeri, plaktaki kalınlığı 4,0 ± 0,5 mm olacak şekilde 90 mm'lik petrilere 25 ml, 150 mm'lik petrilere 60 ml olacak şekilde döküldü.

3.2.1. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonlar RPMI 1640 besiyeri içeren plaklara steril eküvyonla yayıldı. Oda ısısına gelmeleri için 15-20 dakika bekletilmiş olan E-test şeritleri steril edilmiş pens yardımı ile her petride iki tane olacak şekilde, birbirinin tersi yönünde plaklara yerleştirildi. 35°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında minimum inhibitör konsantrasyon (MİK µg/ml) değerleri belirlendi. Eliptik inhibisyon bölgesinin E-test şeridiyle kesiştiği nokta MİK değeri olarak okundu. İnhibisyon elipsleri değerlendirilirken, üretici firma ve CLSI önerileri doğrultusunda amfoterisin B için üremenin tam inhibe olduğu (%100 inhibisyon) değer, azoller ve ekinokandinler için ise üremenin %80 inhibe olduğu değer, o ilaç için MİK değeri kabul edildi (40).

Direnç oranları flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, anidulafungin ve kaspofungin için Clinical and Laboratory Standards Institute tarafından önerilen sınır değerleri göz önüne alınarak belirlendi. Buna göre anidulafunfin için ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), > 2 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı değil, kaspofungin için ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), > 2 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı değil, flukonazol için ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), 16 - 32 $\mu\text{g/ml}$: orta derecede duyarlı, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$: dirençli (R), itrakonazol için $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$: doza bağlı duyarlı (S-DD), ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ dirençli (R), vorikonazol için ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), 2 $\mu\text{g/ml}$ doza bağlı duyarlı (S-DD), ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$: dirençli (R), amfoterisin B için ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı (S), ≥ 2 dirençli olarak kabul edildi (3, 13, 24, 40, 62, 63). Posakonazol ve ketakonazol için ise sınır değerleri sırası ile ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$: duyarlı, 2 $\mu\text{g/ml}$: doza bağlı duyarlı, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$: dirençli (64) ve ≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 0,25-0,5 $\mu\text{g/ml}$ doza bağlı duyarlı, ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ dirençli olarak kabul edildi (Tablo 3) (65).

Tablo 3: Amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin için sınır değerleri

Antifungal	Sınır Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)			
	Duyarlı	Doza Bağımlı Duyarlılık	Orta Derecede Duyarlı	Dirençli
Amfoterisin B	≤ 1	-	-	≥ 2
Ketakonazol	≤ 0.125	0,25-0,5	-	≥ 1
Flukonazol	≤ 8		16 - 32	≥ 64
İtrakonazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	-	≥ 1
Vorikonazol	≤ 1	2	-	≥ 4
Posakonazol	≤ 1	2	-	≥ 4
Kaspofungin*	≤ 2	-	-	
Anidulafungin*	≤ 2	-	-	

*: >2 Duyarlı Değil

3.2.2. İstatiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi "SPSS 15.0 (Statistics Package for Social Science) bilgisayar programı yardımıyla ki kare testi ile yapıldı. *P* değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlarda gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi. İzolatların MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Microsoft Excel 2010 bilgisayar programı kullanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

İzolatların elde edildiği hasta örneklerinin, gönderildikleri bölümlere göre dağılımları *Tablo 4*'de gösterilmektedir. Buna göre *Candida albicans* izolatlarının en çok cerrahi bölümlerden gönderildiği belirlendi.

Tablo 4: Örneklerin bölümlere göre dağılımı

Bölümün Adı	Örnek Sayısı (n)	Oran (%)
Yoğun Bakım	44	22
Dahili Bölüm	62	31
Cerrahi Bölüm	94	47
Toplam	200	100

İzolatların elde edildiği örnekler *Tablo 5*'de gösterilmektedir. *Candida albicans* % 43'lük oran ile en çok idrar örneğinden izole edildi.

Tablo 5: *Candida albicans* izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı (n)	Oran (%)
Apse-Pü-Yara Yeri Sürüntüsü	14	7
Balgam-Trakeal Aspirat	29	14,5
Vajinal Sürüntü	53	26,5
İdrar	86	43
Kateter Ucu	2	1
Kan Kültürü	16	8
Toplam	200	100

MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri amfoterisin B için; 0,003 - 0,25 µg/ml, 0,016 µg/ml, 0,064 µg/ml, ketakonazol için; 0,002 - > 32, 0,016 µg/ml, 6 µg/ml, flukonazol için; 0,064 - > 256 µg/ml, 1 µg/ml, > 256 µg/ml, itrakonazol için; 0,004 - > 32 µg/ml, 0,016 µg/ml, > 32 µg/ml, vorikonazol için; 0,002 - > 256 µg/ml, 0,016 µg/ml, >32 µg/ml, posakonazol için; 0,004 - > 32 µg/ml, 0,047 µg/ml, > 32

$\mu\text{g/ml}$, kaspofungin için; 0,012 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 0,19 $\mu\text{g/ml}$, 0,38 $\mu\text{g/ml}$ ve anidulafungin için; < 0,002 - 0,006 $\mu\text{g/ml}$, < 0,002 $\mu\text{g/ml}$, 0,002 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6: *Candida albicans* izolatlarının amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

Antifungal	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
Amfoterisin B	0,003 - 0,25	0,016	0,064
Ketakonazol	0,002 - > 32	0,016	6
Flukonazol	0,064 - > 256	1	>256
İtrakonazol	0,004 - > 32	0,016	>32
Vorikonazol	0,002 - > 256	0,016	>32
Posakonazol	0,004 - > 32	0,047	>32
Kaspofungin	0,012 - 0,5	0,19	0,38
Anidulafungin	< 0,002 - 0,006	< 0,002	0,002

MİK₅₀: Test popülasyonunun \geq %50'sinin inhibe edildiği MİK değeri

MİK₉₀: Test popülasyonunun \geq %90'ının inhibe edildiği MİK değeri

Anidulafungin, kaspofungin ve amfoterisin B antifungallerine karşı *Candida albicans* izolatlarının hepsi duyarlı bulunurken posakonazol, flukonazol ve vorikonazole karşı duyarlılık yüzdeleri sırası ile %79, %65, %78 idi. Ketokonazolün %68'i duyarlı iken %1'i doza bağımlı duyarlı ve itrakonazolün %79'u duyarlı iken %3'ü doza bağımlı duyarlı olarak belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7: *Candida albicans* izolatlarının amfoterisin B, ketakonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin antifungallerine karşı duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri

Antifungal	Duyarlı		SDD		Dirençli	
	N (sayı)	%	N (sayı)	%	N (sayı)	%
Amfoterisin B	200	100			0	0
Ketakonazol	136	68	2	1	62	31
Flukonazol	130	65			70	35
İtrakonazol	158	79	6	3	36	18
Vorikonazol	156	78			44	22
Posakonazol	158	79			42	21
Kaspofungin	200	100			0	0
Anidulafungin	200	100			0	0

SDD: Doza bağımlı duyarlı

5. TARTIŞMA

Yakın zamana kadar invaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan mevcut antifungaller etki spektrumu, direnç gelişimi, ilaç etkileşimi ve tolere edilebilme özellikleri yönünden yetersiz kalmışlardır. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi sorunlar yaşanmaktadır. Son zamanlarda yeni ajanlar fungal enfeksiyonların sistemik ve topikal tedavisi için önemli hale gelmiştir (66, 67).

Bu çalışmada enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmiş olan 200 *Candida albicans* izolatının amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, kaspofungin ve anidulafungin antifungallerine karşı duyarlılık durumları, MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri E-test yöntemi ile belirlendi.

Çalışmamızda 200 *C. albicans* izolatının ketokonazol için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 0,002 - > 32 µg/ml, 0,016 µg/ml, 6 µg/ml olarak belirlendi. Benzer olarak Badiie ve ark. (68) MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırası ile 0,002-16 µg/ml, 0,064 µg/ml, 4,00 µg/ml olarak rapor etmişlerdir. Lu ve ark.'nda (80) 50 *C. albicans* izolatıyla yaptıkları çalışmalarında bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Zhanel ve ark. (69) 99 *C. albicans* izolatını kapsayan çalışmalarında ketokonazol için elde ettikleri MİK₅₀ (\leq 0,003 µg/ml) ve MİK₉₀ (0,06 µg/ml) değerleri bizim sonuçlarımızdan daha düşük, Nguyen ve ark.'nın (70) çalışmasında elde edilen MİK₅₀ (8 µg/ml) ve MİK₉₀ (16 µg/ml) değerleri ise daha yüksektir. Çalışmamızda ketokonazole karşı izolatların %68'i duyarlı, %1'i doza bağımlı duyarlı ve %31'i dirençli olarak belirlendi. Benzer olarak Dota ve ark. (71) 58 *Candida albicans* izolatında ketokonazol direncini %25,8'ni, Rathod ve ark. (72) %39 olarak bildirmişlerdir. Diğer yandan Özçelik ve ark. (73), Koç ve ark. (81) ile Brito ve ark. (75) yaptıkları çalışmalarda *C.albicans* izolatlarında ketokonazol dirençli izolat tespit etmemişlerdir.

Ketokonazol hepatotoksiste, gastrik toksisite ve endokrinolojik yan etkileri ile toksik bir bileşiktir. Daha etkili ve daha az toksik antifungal ilaçların klinik kullanımda olması, ketokonazol kullanımına yönelik endikasyonları oldukça sınırlamıştır (23).

Bu çalışmada *C. albicans* izolatlarının %79'u itrakonazole duyarlı, %3'ü doza bağımlı duyarlı ve %18'i dirençli olarak bulundu. Benzer olarak Gualco ve ark. (82) 293 *C. albicans* izolatında itrakonazol duyarlılığını %84,1 tespit etmişlerdir. Badiie ve ark. (68) yapmış oldukları çalışmalarında *C. albicans* izolatlarında itrakonazol direncini % 33,7 olarak belirlerken; Koç ve ark. (81) %5, Shokohi ve ark. (63) %5,4, Hamza ve ark. (83) %4 olarak rapor etmişlerdir. Barchiesi ve ark. (84) çalışmalarında flukonazol MİK değerleri yüksek olan izolatların itrakonazol MİK değerlerinin de oransal olarak daha yüksek olduğunu göstermişler ve bu durumun çapraz direnci işaret edebileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da flukonazol dirençli bulunan izolatların %51,4'ünde itrakonazol MİK değerleri yüksek bulundu ($p<0,001$).

Daha etkin antifungal ajanların gelişimi ile itrakonazol invaziv fungal enfeksiyonların tedavisi ve profilaksi amaçlı olarak daha az tercih edilmeye başlamıştır (85).

Bu çalışmada yer alan *C. albicans* izolatlarının flukonazol için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,064 - > 256 µg/ml, 1µg/ml, >256 µg/ml olarak gözlemlendi. Benzer sonuçlar Nguyen ve ark. (70) ve Lu ve ark. (80) tarafından da bildirilmiştir.

C. albicans izolatlarının flukonazole karşı %35'i dirençli, %65'i duyarlı bulundu. Doza bağımlı duyarlı izolat tespit edilmedi. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda *C. albicans* izolatlarında flukonazol direncini Badiie ve ark. (68) %10,5, Evcı ve ark. (76) %13,9, Özkan ve ark. %65,7 olarak rapor etmişlerdir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak Özçelik ve ark. (77), Bourgeois ve ark. (47), Mokaddas ve ark. (62), Matar ve ark. (14), ile Pfaller ve ark. (64) sırasıyla %2,8, %1,2, %3,8, %3,5 ve %0,1 olan düşük direnç oranları tespit ederlerken Gökahmetoğlu ve ark. (86), Koç ve ark. (81), Fleck ve ark. (15), Karuppaiyl ve ark. (72) ile Dota ve ark. (71) yaptıkları çalışmalardaki tüm izolatları duyarlı bulmuşlardır.

Flukonazol, etki spektrumunun genişliği, Amfoterisin B' ye göre toksisitesinin az olması, farmakokinetik profilinin uygunluğu ve oral ve parenteral formülasyonlarının bulunması sebebiyle yaygın kullanım alanına sahip bir antifungal ajandır (18, 87). İnvaziv kandidiazisde ampirik veya profilaktik olarak çok sık kullanılmaktadır (2). Tüm mantar türlerinde olduğu gibi *C. albicans*' da ergosterol

sentezi için gerekli 14- α sterol demetilaz enzimi, ERG 11 geni tarafından kodlanır. Azol türevi antifungal ilaçlara karşı oluşan direnç ERG 11 geninin fazla ekspresyonu ve/veya bu gende oluşan nokta mutasyonu ya da alternatif ergosterol biyosentezi ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda *C. albicans* izolatlarında; azol türevi antifungallere maruz kalmanın ardından ERG 11 geninin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ERG 11 geninde meydana gelen nokta mutasyonları da flukonazol ve diğer azollere karşı oluşan dirençle ilişkilidir (87).

Flukonazol duyarlı ve dirençli *C. albicans* izolatlarının hücre duvarlarının incelendiği *in vitro* çalışmalarda hücre duvarının glukanla ilgili proteinlerinin dağılımının değiştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar flukonazol tedavisinin fungal hücre duvarı yapısı ve metabolizmasını etkilediğini düşündürmektedir (88).

Çalışmamızda *Candida albicans* izolatlarının %21' i posakonazole dirençli olarak bulundu. Gültekin ve ark. (24), Gonzalez ve ark. (3) ile Pfaller ve ark. (64) yaptıkları çalışmalarda tüm izolatları duyarlı bulmuşlardır.

Bu çalışmadaki *Candida albicans* izolatlarının %78'i vorikonazole duyarlı, %22'si dirençli bulundu. Atalay ve ark. (78), Gültekin ve ark. (24), Bourgeois ve ark. (47), Fleck ve ark.(15) ile Mokaddas ve ark. (62) yaptıkları çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı olarak tüm *Candida albicans* izolatlarını vorikonazole duyarlı bulmuşlardır. Gonzalez ve ark. (3) ile Pfaller ve ark. (64) sırasıyla %0,78 ve %<0,1 olan düşük direnç oranları tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda *Candida albicans* izolatlarının vorikonazol için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,002 - > 256 μ g/ml, 0,016 μ g/ml ve >32 μ g/ml olarak belirlendi. Pfaller ve ark. (58) 8615 *Candida albicans* izolatı ile yaptıkları çalışmalarında vorikonazol için MİK aralığını, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla 0.007–1 μ g/ml, 0.007 μ g/ml, 0.007 μ g/ml olarak rapor etmişlerdir. Johnson ve ark. (79) 906 *Candida albicans* izolatını kapsayan çalışmalarında vorikonazol MİK aralığını, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla 0.003–16 μ g/ml, 0.008 μ g/ml, 0.25 μ g/ml olarak tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda bulduğumuz yüksek vorikonazol MİK değerleri flukonazolün hem profilaksi hem de tedavi amacıyla yaygın kullanımına bağlı olabilir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda flukonazolle diğer azoller arasında çapraz

direnç olduğu ileri sürülmüştür (66, 89-94). Bu çapraz direnç çoğunlukla CDR pompası diye adlandırılan ATP bağlayıcı kaset efluks taşıyıcıları kodlayan genlerin upregülasyonuna bağlıdır (95-101). Klinik olarak azol çapraz direnci varlığını destekleyen olgu sunumları da bulunmaktadır. İmmün yetmezliği olan hastalarda yüksek düzeyde azol kullanımından sonra klinik olarak önemli vorikonazol direnci ortaya çıktığı rapor edilmiştir (102). Ayrıca *C. albicans* izolatlarında flukonazol ve vorikonazol duyarlılıklarında azalmanın yanı sıra itrakonazol, ravukonazol, posakonazol gibi diğer azol duyarlılıklarında azalma olduğunu bildiren raporlar bulunmaktadır (105-108). Çalışmamızda 200 *Candida albicans* izolatının % 11'nin test edilen azol grubu antifungallerin tümüne dirençli olduğu belirlendi.

Çalışmamızda vorikonazol dirençli izolatların %95,4'ünde flukonazol MİK değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$). Nguyen ve Yu (70) yaptıkları çalışmada flukonazol MİK değerleri ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ olan *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatlarının ketokonazol MİK değerlerinin ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, itrakonazol MİK değerlerinin ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ ve vorikonazol MİK değerlerinin ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olduğunu bildirmişlerdir.

Geniş bir etki spektrumu olan amfoterisin B'ye karşı direnç gelişimi oldukça nadirdir (18, 52). Bu çalışmada *Candida albicans* izolatlarında amfoterisin B direncine rastlanmadı. Benzer olarak Gültekin ve ark. (24), Evcı ve ark. (76), Koç ve ark. (81), Fleck ve ark. (15), Mokaddas ve ark. (62), Gonzales ve ark. (3), ile Koga-İto ve ark. (103) yaptıkları çalışmalarda amfoterisin B direnci bildirmemişlerdir. Yaklaşık 30 yılı aşkın süredir klinik kullanımda olmasına rağmen, amfoterisin B direnci nadiren ve genellikle az görülen *Candida* türlerinde rapor edilmiştir (80).

Bu çalışmada 200 *C. albicans* izolatının tümü kaspofungin ve anidulafungine duyarlı bulundu. Anidulafungin için MİK aralığı $< 0,002 - 0,006$ $\mu\text{g/ml}$; kaspofungin için MİK aralığı $0,012 - 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi. Bu bulgular daha önce bildirilen birçok çalışma ile uyumludur. Diğer yandan Arendrup ve ark. (104) 20 *Candida albicans* izolatının %5'ini, Espinel-Ingroff ve ark. (48) 33 izolatın %3'ünü anidulafungin dirençli olarak rapor etmişlerdir.

Ekinokandinler çok güvenli, iyi tolere edilebilir ve çoğu *Candida* türlerine karşı mükemmel etkiye sahip antifungallerdir (2). Flukonazol ve diğer triazollere artan direnç ekinokandinlerin önemini artırmıştır. Ciddi immünsüpresyon ve uzun süre hastanede kalış öyküsü gibi triazoller için direnç beklenen durumlarda

antifungal duyarlılık test sonuçlarını beklerken ampirik olarak ekinokandinler tedavide kullanılmaktadır. Ekinokandinlerin amfoterisin B ile karşılaştırıldığında toksisiteleri daha azdır (53). Ekinokandinler içinde Avrupa'da ilk klinik kullanıma giren kaspofungindir. Orofaringeal ve özefagial kandidiazis, invaziv kandidiazis ve invaziv aspergillozis tedavilerinde başarıyla kullanılmaktadır (109). *C. albicans* ve albicans dışı *Candida* izolatlarında azalmış kaspofungin duyarlılığı bildirilmektedir (110, 111). Ayrıca çok sayıda *Candida* izolatı ile yapılan çalışmalarda yüksek kaspofungin MİK değerlerine sahip izolatların mikafungin ve anidulafungin MİK değerlerinin de yükseldiği rapor edilmiştir (89).

CLSI antifungal test alt komitesi en yaygın görülen 5 *Candida* türünün (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, ve *C. krusei*) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile triazol (flukonazol ve vorikonazol) ve ekinokandinlere (anidulafungin, kaspofungin, ve mikafungin) karşı duyarlılık testi için tür spesifik klinik sınır değerlerini belirlemiştir. Bu klinik sınır değerleri her bir antifungal ajanın ve *Candida* türünün MİK dağılımlarına ek olarak en güncel ve kapsamlı, aynı zamanda MİK değerleri ile ilişkili olan klinik, farmakodinamik, biyokimyasal ve moleküler veriler dikkate alınarak tespit edilmiştir (7, 58-59, 112-114).

Bu çalışmada elde edilen MİK değerleri *Candida albicans*'a ait tür spesifik klinik sınır değerlerine göre yorumlandığında anidulafungin, vorikonazol ve itrakonazol için duyarlılık paterninde bir değişiklik gözlenmedi.

Kaspofungine karşı izolatların hepsi duyarlı iken %85'i (n: 170) duyarlı ve %2'si (n:4) orta derecede duyarlı bulundu. İzolatların %13'ünün (n: 26) MİK değerleri (0,38) duyarlı ile orta derecede duyarlı sınır değerleri arasında idi.

Flukonazole karşı izolatların %63'ü (n: 126) duyarlı, %35'i (n: 70) dirençli bulundu. İzolatlardan 2'si doza bağımlı duyarlı iken 2 (%1) izolatın MİK değerleri duyarlılık ile doza bağımlı duyarlılık sınır değerleri arasında idi (Tablo 5).

Tablo 5: Candida albicans için klinik sınır değerleri (7, 58-59, 112-114).

Antifungal	Klinik Sınır Değer (µg/ml)			
	Duyarlı	Doza Bağımlı Duyarlılık	Orta Derecede Duyarlı	Dirençli
Kaspofungin	≤0,25	-	0,5	≥1
Anidulafungin	≤0,25	-	0,5	≥1
Flukonazol	≤2,0	4,0	-	≥8
İtrakonazol	≤0,12	0,25-0,5	-	≥1
Vorikonazol	≤0,12	-	0,25-0,5	≥1

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak anidulafungin, kaspofungin ve amfoterisin B antifungallerine karşı *Candida albicans* izolatlarının hepsi duyarlı bulunurken; %68'i ketokonazole, %79'u itrakonazole, %65'i flukonazole, %78'i vorikonazole, %79'u posakonazole duyarlıydı. Diğer yandan çalışmamızdaki *C. albicans* izolatlarının, %1'i ketokonazole, %3'ü itrakonazole doza bağımlı duyarlı olarak belirlendi.

Azol grubu antifungal ajanlar diğer antifungallere göre tedavi ve profilaksi amacıyla daha yaygın kullanılmaktadır (53). Bu durum yüksek direnç yüzdelerinin görülmesinin en önemli sebebidir. Çalışmamızda *C. albicans* izolatların % 11'inin (n:22) test edilen azol grubu antifungallerin tümüne dirençli olduğu belirlendi.

C. albicans normal ve immün süprese hastalarda lokalize, invaziv veya dissemine enfeksiyonlara en sık neden olan patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir (67). Kandidemiye bağlı mortalite oranı %10-49 arasında olup, ortalama %35 olarak bildirilmektedir. Kan kültürü pozitifliğinden sonra uygun antifungal tedaviye başlamada gecikmenin mortalite oranını artıran bir faktör olduğu gösterilmiştir (18). Antifungal tedavide en uygun ajanı seçmek ve antifungal direnç paternlerindeki değişiklikleri izlenmek için enfeksiyon etkeni olan *Candida* türlerine antifungal duyarlılık testlerinin rutin olarak uygulanması gerekmektedir (62).

Profilaksi kullanımı için önerilen invaziv kandidiazis riskinin en az %10 olmasıdır (2). Antifungal ilaçların yanlış endikasyonlarda ve uygun olmayan dozlarda kullanımı ilaçtan yararlanma olasılığı en yüksek olan hastaları kapsayacak şekilde sınırlandırılmalıdır. Ayrıca bu ilaçların kullanımı için belirlenen kriterlere uyulması sağlanmalıdır.

Duyarlılık azalışı gösteren izolatların klinik önemini ve sıklığını daha iyi anlamak için; antifungallere karşı duyarlılık durumlarının izlenmesinin yanı sıra bu izolatların direnç mekanizmalarının moleküler analizi de yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T ve ark. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62: 10-24.
2. Smith JA, Kauffman CA. Recognition and prevention of nosocomial invasive fungal infections in the intensive care unit. *Critical care medicine* 2010; 38(8 Suppl): 380-387.
3. Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of Candida collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(9): 2902-2905.
4. Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Current opinion in infectious diseases* 2009; 22(6):568-573.
5. Cheng MF, Yang YL, Yao TJ ve ark. Risk factors for fatal candidemia caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. *BMC infectious diseases* 2005; 5: 22.
6. Canuto MM, Rodero FF. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 550-563
7. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D ve ark. Clinical breakpoints for the echinocandins and Candida revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resistance Updates* 2011; 14: 164-176.
8. Panizo MM, Reviakina V, Dolande M ve ark. Candida spp. in vitro Susceptibility Profile to Four Antifungal Agents: Resistance Surveillance Study in Venezuelan Strains. *Medical Mycology* 2009; 47: 137-143.
9. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson A ve ark. Evaluation of the Etest Method for Determining Fluconazole Susceptibilities of 402 Clinical Yeast Isolates by Using Three Different Agar Media. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (9): 2586-2589.
10. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME ve ark. Interlaboratory Evaluation of Etest Method for Testing Antifungal Susceptibilities of Pathogenic Yeasts to Five

- Antifungal Agents by Using Casitone Agar and Solidified RPMI 1640 Medium with 2% Glucose. *J. Clin. Microbiol* 1996; 34(4): 848-852.
11. Chryssanthou E ve Cuenca-Estrella M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing Proposed Standard and the E-Test with the NCCLS Broth Microdilution Method for Voriconazole and Caspofungin Susceptibility Testing of Yeast Species. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3841-3844.
 12. Koç AN. Antifungal duyarlılık testleri ve klinik önemi. *ANKEM Derg* 2012; 26 (Ek 2) : 270-276.
 13. Rex JH, Alexander BD, Andes D ve ark. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute; Third Edition. M27-A3. Wayne, PA. 2008, 28(14).
 14. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL ve ark. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(5): 1647-1651.
 15. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007; 59(4): 767-771.
 16. John E, Edwards JR: *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7. ed., Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010; 3225.
 17. Ener B. *Candida* Enfeksiyonlarında Epidemiyoloji Ve Laboratuvar Tanı. *ANKEM Derg* 2008; 22(Ek 2): 264-269.
 18. İris NE, Arat ME, Şimşek F ve ark. Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalardan İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. *Klinik Dergisi* 2008; 21(2): 61-64.
 19. Howell SA, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Versalovic J (Ed.), Carroll KC, Funke G ve ark. *Manual of Clinical Microbiology*. 10. ed., Washington, DC.: ASM Press, 2011: 1797.

20. Iwen PC. Mycotic Diseases. In: McPherson: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. vol. 61 Chapter. An Imprint of Elsevier. W.B. Saunders, 2011: 1164-1168.
21. Mıshra NN, Prasad T, Sharma N ve ark. Pathogenicity and Drug Resistance in *Candida Albicans* and Other Yeast Species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2007; 54 (3): 201-235.
22. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003; 67(3): 400-428.
23. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT ve ark. (2009)."Mantarlar". *Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology, Eds. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH ve ark. 9th. Ed., Washington, D.C., ASM Press, 2007: Bölüm 8: 1721-1792.*
24. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y ve ark. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Suşlarında Antifungal Duyarlılığın ve Bazı Virülans Faktörlerinin Araştırılması ve RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 306-317.
25. Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M ve ark. "Mantar Hastalıklarının Laboratuvar Tanısı". *Tıbbi Mikrobiyoloji (Medical Microbiology, Patrick R. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 6th. Ed., Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010), Bölüm 7:699. Ankem Dergisi* 2008, 22(2): 264-269.
26. Fothergill AW. Medically significant fungi. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuseelis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology. 3. Ed., St. Louis: Saunders Elsevier, 2007: 750-756.*
27. Tümbay E. *Candida, Cryptococcus ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mayalar. In Klinik Mikrobiyoloji. Başustaoğlu A (çeviren). 9. Baskı, Ankara: Atlas kitapçılık, 2009; 1762-1788.*
28. Rodriguez-Tudela JL ve Martinez-Suarez JV. Improved Medium for Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38(1): 45-48.
29. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji. 3. baskı, İzmir, Şafak matbaacılık, 2002: 693.*

30. Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. CHROMagar Candida as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and as a Source Medium for the Rapid-Assimilation-of-Trehalose Test. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(3):1210-1212.
31. Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K ve ark. Use of CHROMagar in the Differentiation of Common Species of Candida. *Mycopathologia* 2009; 167: 47-49.
32. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Candida 08.04.2013.
33. Koneman EW, Auren SD, Janda WM ve ark. Mycology. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Sixth edition. Sixth edition edn. New York; 2006: 1218-1219.
34. Larone D. In *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* 2nd Edition, ASM Press, 1993: 54.
35. www.doctorfungus.org/thefungi/candida_spp.php 08.04.2013.
36. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43(5): 65-84.
37. Hsiue HC, Huang YT, Kuo YL ve ark. Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 16(5):493-500.
38. Arıkan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology* 2007; 45(7): 569-587.
39. Pfaller MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A ve ark. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute; Approved Standard M27-A2*. Wayne, PA. 2002; 22(15).
40. Rex JH, Alexander BD, Andes D ve ark. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. *Clinical and Laboratory Standards Institute; Third Informational Supplement M27-S3*. Wayne, PA. 2008, 28(15): 9.
41. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. *NCCLS Document M27-A*, Wayne, 1997.

42. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Proposed Standard. CLSI document M27. Villanova, PA: CLSI, 1992.
43. 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.
44. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert review of anti-infective therapy* 2009; 7(1): 107-119.
45. Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone Diameter Interpretive Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Breakpoints and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Informational supplement, 2nd ed, CLSI document M44-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008.
46. Gülay Z. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *Toraks Dergisi* 2002; 3(1): 75-88.
47. Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S ve ark. Antifungal Susceptibility of 205 *Candida* spp. Isolated Primarily During Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(1): 154-161.
48. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J ve ark. Comparison of Anidulafungin MICs Determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 document) and Etest for *Candida* Species Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54(3): 1347-1350.
49. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive Breakpoints for Fluconazole and *Candida* Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(2): 435-447.
50. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46(1): 120-128.
51. Rex JH, Pfaller MA. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age?. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35(15): 982-989.

52. J, Brooks GF, Carroll KC, Butel JS ve ark. Jawetz, Tenen ve Adelsberg'in Tıbbi Mikrobiyoloji. Yeniden OŞ (Çeviri Ed.) 24 baskı, İstanbul: Nobel, 2010.
53. Giri S, Kindo AJ. A Review of Candida species Causing Blood Stream Infection. *Indian J Med Mikrobiol* 2012; 30: 270-278.
54. Sümer Z, Kaya S, Çetin A ve ark. Candida albicans Üzerine Omeprazolün in vitro Antifungal Etkisinin Flukonazol ile Karşılaştırmalı Çalışması. *C Ü Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 27(2): 74 - 78.
55. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R ve ark. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Candida isolates in Quebec: Report on 453 Cases Between 2003 and 2005. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 2008; 19(1): 55.
56. Kebudi R. Yeni Antifungaller. *Ankem Dergisi* 2007; 21(2): 210-215.
57. Özcan SK, Mutlu B, Dündar D ve ark. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida spp. Suşlarının Antifungal İlaçlara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Buyyon Mikrodilüsyon ile E-Test Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010; 44: 263-271.
58. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC ve ark. Clinical Breakpoints for Voriconazole and Candida spp. Revisited: Review of Microbiologic, Molecular, Pharmacodynamic, and Clinical Data as They Pertain to the Development of Species-Specific Interpretive Criteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70: 330-343.
59. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ ve ark. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and Candida spp. *Journal of clinical microbiology* 2010; 48(1): 52-56.
60. Perlman DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* 2007; 10(3): 121-130.
61. Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG ve ark. Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. *N ENGL J MED* 2007, 356(24): 1272-1279.
62. Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of Candida bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *Journal of medical microbiology* 2007; 56(Pt 2): 255-259.

63. Shokohi T, Bandalizadeh Z, Hedayati MT ve ark. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. *Jundishapur J Microbiol* 2011; 4(1): 19-26.
64. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L ve ark. Selection of a Surrogate Agent (Fluconazole or Voriconazole) for Initial Susceptibility Testing of Posaconazole against *Candida* spp.: Results from a Global Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol* 2008; 46(2): 551-559.
65. Asticcioli S, Sacco L, Daturi R ve ark. Trends in frequency and in vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from women attending the STD outpatients clinic of a tertiary care hospital in Northern Italy during the years 2002-2007. *New Microbiologica* 2009; 32(2): 199-204.
66. Sabatelli F, Patel R, Mann PA ve ark. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006; 50(6): 2009-2015.
67. Adwan G, Salameh Y, Adwan K. Susceptibility of *Candida albicans* isolates to Terbinafine and Ketoconazole. *IUG Journal of Natural and Engineering Studies* 2012; 20(2): 45-53.
68. Badiee P, Alborzi A. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. *Iran. J. Microbiol* 2011; 3 (4): 183-188.
69. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GAJ ve ark. In Vitro Activity of a New Semisynthetic Echinocandin, LY-303366, against Systemic Isolates of *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Aspergillus* Species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(4): 863-865.
70. Nguyen MH, Yu CY. Voriconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Candida* isolates: in-vitro efficacy compared with that of itraconazole and ketocanazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 253-256.
71. Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE ve ark. Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal

- Candidiasis. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: 201953. Epub 2011 Mar 9.
72. Rathod VS, Raut JS, Karuppayil SM. Antifungal Drug Susceptibility Of Candida albicans Isolates from Pulmonary Tüberculosis Patients. Int J Pharm Pharm Sci 2012; 4(5): 323-326.
73. Özçelik B, Aksaray N, Cesur S ve ark. In Vitro Susceptibility of Candida Spp Isolated From Clinical Specimens Againts Some Antifungal Agents. Turkish J Pharm Sci 2006; 3(1): 1-6.
74. Koç, AN. Antifungal Duyarlılık Testleri ve Klinik Önemi. ANKEM Derg 2012; 26 (Ek 2): 270-276.
75. Brito GNB, Inocêncio AC, Querido SMR ve ark. In vitro antifungal susceptibility of Candida spp. oral isolates from HIVpositive patients and control individuals. Braz Oral Res 2010; 25(1): 28-33.
76. Evci C, Ener B, Göral G, Akçağlar S. Comparative evaluation of the antifungal susceptibility of Candida isolates from blood specimens: results of a study in a tertiary care hospital in Bursa, Turkey. Turk J Med Sci 2010; 40(1): 141-149.
77. Özkan S, Kaynak F, Kalkanci A ve ark. Slime production and proteinase activity of Candida species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2005; 100(3): 319-324.
78. Atalay MA, Koç AN, Sav H ve ark. İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türleri ve Antifungal Duyarlılıkları. Ankem Derg 2012; 26(1): 1.
79. Johnsona E, Espinel-IngroffA, Szekelya A ve ark. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. International Journal of Antimicrobial Agents 2008; 32: 511-514.
80. Lu JJ, Lee SY ve Chiueh TS. In vitro antifungal susceptibility testing of Candida blood isolates and evaluation of the E-test method. J Microbiol Immunol Infect 2004; 37: 335-342.
81. Koç AN, Gökahmetoğlu S ve Oğuzkaya M. Comparison of Etest with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. Mycoses 2000; 43: 293-297.

82. Gualco L, Debbia EA, Bandettini R ve ark. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007;29: 179-184.
83. Hamza OJM, Matee MIN, Moshi MJ ve ark.: Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC microbiology* 2008, 8(1): 135.
84. Barchiesi F, Colombo AL, Mcgough DA ve ark. In Vitro Activity of Itraconazole against Fluconazole-Susceptible and Resistant *Candida albicans* Isolates from Oral Cavities of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38(7): 1530-1533.
85. David IM, Antonio P, Christopher CK ve ark. Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2011;155: 318-327.
86. Gökahmetoğlu S, Koç AN, Patiroğlu T. Antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *Blackwell Publishing Ltd Mycoses* 2003, 46: 289-293.
87. Casalnuovo IA, Di Francesco P ve Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004; 8(2): 69-77.
88. Angiolella L, Micocci MM D'Alessio S, Girolamo A ve ark. Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1688-1694.
89. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG ve ark. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003, 47(10): 3149-3154.
90. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L ve ark. Cross-Resistance between Fluconazole and Ravuconazole and the Use of Fluconazole as a Surrogate Marker To Predict Susceptibility and Resistance to Ravuconazole among 12,796 Clinical Isolates of *Candida* spp. *J. CLIN. MICROBIOL.* 2004; 42(7): 3137-3141.
91. Pfaller MA, Boyken L, Hollis J ve ark. In Vitro Susceptibilities of Clinical Isolates of *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* Species

- to Itraconazole: Global Survey of 9,359 Isolates Tested by Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods. *J. CLIN. MICROBIOL.* 2005; 43(8): 3807–3810.
92. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L ve ark. Use of Fluconazole as a Surrogate Marker To Predict Susceptibility and Resistance to Voriconazole among 13,338 Clinical Isolates of *Candida* spp. Tested by Clinical and Laboratory Standards Institute-Recommended Broth Microdilution Methods. *J. CLIN. MICROBIOL.* 2007; 45(1): 70–75.
93. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL ve ark. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(6): 1735–1745.
94. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L ve ark. Selection of a Surrogate Agent (Fluconazole or Voriconazole) for Initial Susceptibility Testing of Posaconazole against *Candida* spp.: Results from a Global Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(2): 551–559.
95. Borst A, Raimer MT, Warnock DW ve ark. Rapid Acquisition of Stable Azole Resistance by *Candida glabrata* Isolates Obtained before the Clinical Introduction of Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(2): 783–787.
96. MacCallum DM, Coste A, Ischer F ve ark. Genetic Dissection of Azole Resistance Mechanisms in *Candida albicans* and Their Validation in a Mouse Model of Disseminated Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(4): 1476–1483.
97. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F ve ark. Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Isolates from AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(11): 2378–2386.
98. Sanglard D, Ischer F, Monod M ve ark. Susceptibilities of *Candida albicans* Multidrug Transporter Mutants to Various Antifungal Agents and Other Metabolic Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40(10): 2300–2305.

99. Sanglard D, Ischer F, Monod M ve ark. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 1997; 143: 405-416.
100. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D ve ark. The ATP Binding Cassette Transporter Gene CgCDR1 from *Candida glabrata* Is Involved in the Resistance of Clinical Isolates to Azole Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43(11): 2753-2765.
101. Sanglard D, Ischer F, Bille J ve ark. Role of ATP-Binding-Cassette Transporter Genes in High-Frequency Acquisition of Resistance to Azole Antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(4): 1174-1183.
102. Pfaller MA ve Diekema DJ. Azole antifungal drug cross-resistance: mechanism epidemiology, and clinical significance. *J. Invasive Fungal Infect.* 2007; 1: 74-92.
103. Koga-Ito CY, Lyon JP, Resende MA. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2008, 50(1): 7-10.
104. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C ve ark. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010, 54(1): 426-439.
105. Laverdière M, Lalonde RG, Baril JG ve ark. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 57: 705-708.
106. Shelley S, Magill SS, Shields C, Sears CL ve ark. Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. *Journal OF Clinical Microbiology* 2006; 44(2): 529-535.
107. Moudgal V, Little T, Boikov D ve ark. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for

- Prosthetic Valve Endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49(2): 767–769.
108. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF ve ark. Clinical Significance of Azole Antifungal Drug Cross-Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 44(5): 1740–1743.
109. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362: 1142–51.
110. Steve Hernandez S, Lo'pez-Ribot JL, Najvar LK. Caspofungin Resistance in *Candida albicans*: Correlating Clinical Outcome with Laboratory Susceptibility Testing of Three Isogenic Isolates Serially Obtained from a Patient with Progressive *Candida* Esophagitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(4): 1382–1383.
111. Santosh Katiyar S, Pfaller MA ve Edlind T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates Exhibiting Reduced Echinocandin Susceptibility. 2006; 50(8): 2892–2894.
112. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ ve ark. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates* 2010, 13(6): 180-195.
113. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ ve ark. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(5): 1592-1599.
114. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E ve ark. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50(6): 2040-2046.