

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN AMFOTERİSİN B,
FLUKONAZOL VE VORİKONAZOLE
DUYARLILIKLARININ RESAZURİN MİKROPLAK
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kemal BİLGİN

Samsun
Ağustos - 2005

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN AMFOTERİSİN B,
FLUKONAZOL VE VORİKONAZOLE
DUYARLILIKLARININ RESAZURİN MİKROPLAK
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kemal BİLGİN

Danışman: Doç. Dr. Asuman BİRİNCİ

Samsun
Ağustos - 2005

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana daima yol gösteren, desteğini hep yanımda hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim süresinde desteklerini hiç esirgemeyen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyeleri, Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a, Prof. Dr. Ahmet SANIÇ'e, Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Doç. Dr. Murat HÖKELEK'e, Yrd. Doç. Dr. Çağatay ACUNER'e ve Yrd. Doç. Dr. Özge DARKA'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca her ihtiyaç duyduğumda hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a da teşekkür ederim.

İki yıl boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Hayatım boyunca iyi ve kötü günümde hep yanımda olan, destek ve sabırlarımı benden hiç esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme de sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET**ÇEŞİTLİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN AMFOTERİSİN B, FLUKONAZOL VE VORİKONAZOLE DUYARLILIKLARININ RESAZURİN MİKROPLAK YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ****Kemal BİLGİN, Yüksek Lisans Tezi****Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ağustos 2005**

Candida infeksiyonlarının son yıllardaki artışı ve antifungal ajanlara karşı primer ve sekonder direnç gözlenmesi; tekrarlanabilirliği yüksek, hızlı sonuç verebilen, kolay uygulanabilir ve ucuz olan antifungal duyarlılık testlerine ihtiyacı arttırmıştır.

Bu çalışmanın amacı, NCCLS tarafından önerilen referans mikrodilüsyon yöntemi ve kolorimetrik resazurin mikroplak metodu ile elde edilen MİK değerlerini saptamak ve bu iki yöntemi karşılaştırarak, kolorimetrik resazurin mikroplak metodunun standart yöntem alternatif olup olmayacağını araştırmaktır.

Kan kültürlerinden izole edilen 58 *Candida* kökeninin amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol duyarlılıkları referans yöntem ve kolorimetrik resazurin mikroplak metodu ile araştırıldı.

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin standart klasik yöntemler ve gerekli görüldüğünde kromojenik besiyeri ve ID 32 C maya identifikasyon sistemi ile tür tayini yapılması sonucu %81 *C. albicans*, %19 non-*albicans Candida* olarak saptandı.

C. albicans için amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, MİK 50 ve MİK 90 değerleri referans yöntemde sırasıyla; 0.5-1, 0.25-0.5, ≤ 0.015 - ≤ 0.015 µg/ml, resazurin mikroplak metodu ile sırasıyla; 0.5-0.5, 0.25-0.5, ≤ 0.015 - ≤ 0.015 µg/ml olarak bulundu. Non-*albicans Candida* için amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, MİK 50 ve MİK 90 değerleri referans yöntemde sırasıyla; 0.5-1, 1-2, 0.03-0.06 µg/ml, resazurin mikroplak metodu ile sırasıyla; 0.5-0.5, 0.5-1, ≤ 0.015 -0.06 µg/ml olarak bulundu.

Çalışmamızın sonunda referans mikrodilüsyon yöntemiyle resazurin mikroplak yöntemi arasındaki uyum (± 1 dilüsyonda); *C. albicans*'lar için amfoterisin B'de %91.5, flukonazol'de %97.8, vorikonazol'de %100, non-*albicans Candida*'lar için ise amfoterisin B'de %100, flukonazol'de %100, vorikonazol'de %90.9 olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelime: *Candida* spp., Resazurin, mikroplak, mikrodilüsyon

SUMMARY

EVALUATION OF SUSCEPTIBILITY OF VARIOUS *CANDIDA* STRAINS TO AMPHOTERICIN B , FLUCONAZOLE AND VORICONAZOLE BY RESAZURIN MICRO PLATE METHOD

Kemal BİLGİN, M.Sc Thesis

University of Ondokuz Mayıs Samsun, August 2005

The rise of *Candida* infections and observed resistance to primary and secondary antifungal agents consequently necessitated new antifungal susceptibility testing. These tests must be high repeated, more easy, cheaper and it must allow rapid result .

The aim of this study is the comparison of the colorimetric resazurin microplate method with the reference microdilution method proposed by NCCLS (M27–A2 document) for MIC values and also the evaluation of the colorimetric resazurin microplate method as an alternative to the standard microdilution method.

Susceptibilities of 58 *Candida* spp. isolates from blood cultures to amphotericin B, fluconazole and voriconazole were observed by reference method and colorimetric resazurin microplate method.

By using classical mycological methods 58 *Candida* strains were identified as follows: 81% *C. albicans* and 19% non-*albicans Candida*.

For amphotericin B, fluconazole, voriconazole MIC₅₀ and MIC₉₀ values were; 0.5-1, 0.25-0.5, ≤ 0.015 - ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$ respectively with reference method and 0.5-0.5, 0.25-0.5, ≤ 0.015 - ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$ respectively with resazurin microplate method for *C. albicans* and 0.5-1, 1-2, 0.03-0.06 $\mu\text{g/ml}$ respectively with reference method and 0.5-0.5, 0.5-1, ≤ 0.015 -0.06 $\mu\text{g/ml}$ respectively with resazurin microplate method for non-*albicans Candida*.

In this study; the agreement (± 1 twofold dilution) between colorimetric resazurin microplate method with the reference microdilution method for *C. albicans* against the three antifungal agents was excellent, with the values for amphotericin B, fluconazole, and voriconazole being 91.5, 97.8, 100% respectively, and 100, 100, 90.9% respectively for non-*albicans Candida*.

Key Words: *Candida*, Resazurin, microplate, microdilution

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
LA	: Lateks aglütinasyon
RIA	: Radioimmunoassay
AMB	: Amfoterisin B
FDA	: Food and Drug Administration
EMB	: Eosin-methylene blue
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
C	: <i>Candida</i>
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MİK 50	: Suşları %50'sini inhibe eden konsantrasyon
MİK 90	: Suşları %90'sini inhibe eden konsantrasyon
DMSO	: Dimetil sülfoksit

İÇİNDEKİLER

ÖZET-TÜRKÇE	iv
ÖZET-İNGİLİZCE	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
BÖLÜM I	
GİRİŞ	1
BÖLÜM II	
GENEL BİLGİLER	
II.1. <i>CANDIDA</i> TÜRLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ	4
II.2. <i>CANDIDA</i> 'LARIN PATOGENEZİ	6
II.3. LABORATUVAR TANI	
II.3.1. Kültür	
II.3.1.1. Primer İzolasyon	8
II.3.1.2. İdentifikasyon	8
II.3.2. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri	
II.3.2.1. Serolojik Testler	10
II.3.2.2. Antikorların gösterildiği testler	10
II.3.2.3. Antijenlerin gösterildiği testler	10
II.3.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	11
II.3.2.5. Hayvan Modelleri	11
II.4. ANTİFUNGAL İLAÇLAR	12
II.4.1. Amfoterisin B ve Lipid Formülasyonları	13
II.4.1.1. Amfoterisin B Lipid Kompleks (ABLC)	15
II.4.1.2. Amfoterisin B Kolloidal Dispersiyon (ABCD)	15
II.4.1.3. Lipozomal Amfoterisin B (L-AMB)	15
II.4.2. Azoller	15
II.4.2.1. Flukonazol	16

II.4.2.2. Vorikonazol (UK-109,496)	17
II.5. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	18
II.5.1. Makrodilüsyon Yöntemi	20
II.5.2. Mikrodilüsyon Yöntemi	20
II.5.3. Spektrofotometrik Yöntemler	21
II.5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi	21
II.5.5. Disk Difüzyon Yöntemi	21
II.5.6. E Test	22
II.5.7. Flovritometrik Yöntem	22
II.5.8. Kolorimetrik Yöntemler	22
II.6. RESAZURİN	23
BÖLÜM III	
MATERYAL VE METOD	
III.1. İZOLATLAR	24
III.2. İZOLASYON VE TANIMLAMA	24
III.2.1. Germ Tüp Testi	24
III.2.2. Piriç Ekstresi-Tween 80 Agar	25
III.2.3. Kromojenik Besiyeri	26
III.2.4. ID 32C Maya İdentifikasyon Sistemi	26
III.3. STANDART ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ	26
III.3.1. Besiyerinin Hazırlanması	26
III.3.2. Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	27
III.3.2.1. Amfoterisin B	27
III.3.2.2. Flukonazol	27
III.3.2.3. Vorikonazol	27
III.3.3. Mikroplağın hazırlanması	28
III.3.4. İnokülasyon işlemi	28
III.3.5. MİK Değerlerinin Saptanması	29
III.4. RESAZURİN MİKROPLAK YÖNTEMİYLE ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ	29

III.4.1. Resazurin Mikroplak Yönteminde MİK Değerlerinin Saptanması	30
III.5. VERİ ANALİZİ	30
BÖLÜM IV	
BULGULAR	33
BÖLÜM V	
TARTIŞMA	45
BÖLÜM VI	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	63

BÖLÜM I

GİRİŞ

Candida'lar doğada yaygın olarak bulunabilen mantarlardır. Bunlardan bir bölümü insan ve hayvanlarda kommensal olarak buldukları gibi, bitkisel maddeler ve nemli toprakta da yaşamlarını sürdürebilir, hatta çoğalabilirler (Erbakan, 1989).

Çok sayıda *Candida* türü bulunmakla beraber insanlarda hastalık yapanlar sınırlıdır. *Candida albicans* en iyi tanımlanmış ve en sık karşımıza çıkan tür olmakla beraber, son yıllarda *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* ile oluşan infeksiyonların sayısı hızla artmaktadır. Bunun yanı sıra, daha seyrek olmakla beraber *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides* hastalık etkeni olarak karşımıza çıkabilir (Tümbay, 1999; Ener, 2003).

Candida türleri kommensal olarak normal insanlarda bulunan mantarlardır (Goodrich ve ark., 1991; Walsh ve Lee, 1993). 1980 yılından sonra immün yetmezlikli hasta sayısındaki artış ile ilişkili olarak invaziv fungal infeksiyon insidansında belirgin artış olmuştur (Jarwis, 1995; Ögünç, 2005). İmmün süpresif ilaçların yanında geniş spektrumlu antibiyotiklerin de yaygın kullanımı, hiperalbuminasyon, santral venöz kateterlerin yaygın kullanımı, organ nakillerinin daha sık yapılması gibi nedenler de fungal infeksiyonlardaki artışın belli başlı nedenleri olarak sıralanabilir (Tümbay, 1999; Ulutan, 2003).

Amfoterisin B ve azol türevleri, özellikle flukonazol ve itrakonazol fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılan ana ilaçlardır (Hay, 1994). Ancak amfoterisin B'nin tedavideki başarı oranının arzu edilen noktada olmaması ve yoğun yan etkileri olması, flukonazol ve itrakonazol gibi triazolün aşırı kullanımları sonucu duyarlı kökenlerde direnç gelişiminin ortaya çıkması; etkinlik spektrumu daha iyi, daha az direnç geliştirebilen ve yan etkileri daha az olan yeni antifungalere gereksinimi de beraberinde getirmiştir (Johnson ve Kauffman, 2003; Tabak, 2005).

Bu bağlamda değişik yeni antifungal maddelerin geliştirilmesi devam etmektedir. Bunlardan yeni klinik kullanıma girmiş olan vorikonazol; flukonazol çekirdeğinde yapılan değişikliklerin sonucunda daha güçlü, daha geniş spektrumlu oral

ve parenteral kullanıma uygun yeni bir ikinci kuşak triazol antifungaldir (Jeu ve ark., 2003; Öztürk, 2005).

Son yıllarda mayalara bağlı infeksiyonlarda artış olması ve özellikle bazı dirençli *Candida* türlerinin daha sık etken olarak karşımıza çıkması yanında, sağaltımda kullanılabilir yeni ajanların üretilmesi ve antifungal direncin bildirilmesi nedeni ile, antifungal duyarlılık testleri hasta sağlığının önemli bir komponenti haline gelmiştir (Fridkin ve Jarwis, 1996; Davey ve ark., 1998). Tedavi seçeneklerini belirlemeye yol gösterebilecek, standartlaştırılmış antifungal duyarlılık deneyleri geliştirilmesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Espinell-Ingroff ve ark., 1998; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2002).

Antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmı “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) tarafından yürütülmüştür. 1982’de NCCLS antifungal duyarlılık deneyleri ile ilgili bir alt komite oluşturmuştur (Espinell-Ingroff ve Pfaller, 1995). Bu komite, 1992 yılında mayalar için ilk referans yöntem olarak makrobüyon dilüsyonu kabul ederek M27-P’yi yayınlamıştır (NCCLS, 1992). Daha sonra, maya mantarları için uygulanacak standart mikrodilüsyon duyarlılık yöntemi 1997 yılında M27-A, 2002 yılında M27-A2 içinde yayınlanmıştır (NCCLS, 1997; NCCLS, 2002).

Yöntem standardizasyonu ile ilgili önemli adımlar atılmış olmasına karşın referans mikrodilüsyon yönteminde önerilen görsel okuma zordur ve bu sorunu ortadan kaldırmak için daha ileri çalışmalar gereklidir (Jahn ve ark., 1995; Gülay, 1997).

Yapılan çalışmalar sonunda spektrofotometrik yöntemler, E test, flovitometrik analiz, kolorimetrik yöntemler gibi alternatif yöntemler geliştirilmiştir (Gülay, 1997; Kuştimur, 1999). Kolorimetrik yöntemlere dahil edilebilecek alternatif yöntemlerden biri olan resazurin mikroplak metodu, daha önce bakterilerde denenmiş olup *Candida*’larda bu konuda yapılmış hiçbir çalışma yoktur (Coban ve ark., 2005).

Bu çalışmanın amacı, NCCLS tarafından önerilen referans mikrodilüsyon metodu ve daha önce *Candida*’larda denenmemiş olan kolorimetrik resazurin mikroplak metodu ile elde edilen MİK değerlerini saptamak ve bu iki yöntemi karşılaştırarak, kolorimetrik resazurin mikroplak metodunun standart yöntem alternatif olup olmayacağını araştırmaktır.

Çalışmada, kan kùltùrlerinden izole edilen *Candida* tùrlerinin konvansiyonel metotlarla ve gerekli olduğunda ticari kitlerle tùr tayini yapıldı. Daha sonra bütùn suşların amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol duyarlılıkları referans mikrodilüsyon metodu ve kolorimetrik resazurin mikropalak metodu ile çalışıldı ve resazurin mikropalak metodu ile standart metodun uyumu araştırıldı.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. CANDIDA TÜRLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Candida'lar ile ilgili bilgiler Hippocrates'e kadar uzanır. Langebeck 1839'da aftan bir mantar izole etmiştir. Ancak bunun tifonun etkeni olduğunu sanmıştır. Pamukçuğun mantar niteliğinde bir etiyojiye bağlı olduğunu ilk olarak Berg 1841'de ve Bennet 1844'de ortaya koymuşlardır. Berg sağlıklı çocuklara aft membranını aktararak onlarda pamukcuk oluşturmuştur. Robin 1853'de pamukçuğun etkeninin sistemik enfeksiyonlar da yapabileceğini gözlemiş ve etkene ilk olarak *Oidium albicans* adını vermiştir. Bunu izleyen yıllarda birçok araştırmacı tarafından deri ve deri altı kandidozları, sistemik kandidozlar, hematojen yayılma, bağırsak ve merkezi sinir sistemi kandidozları bulunmuştur (Erbakan, 1989).

Bugün maya taksonomisinde *Candida*'ların tarif ve kabul edilmiş 220'nin üzerinde türü bulunmaktadır (Kreger-van Rij, 1984). Bunlar içerisinde tıp mikolojisi bakımından önemli bir kısım *Candida* türleri, bunlarla karışabilecek diğer türlerden, 37°C'de üreme, yalancı miçelyum, klamidospore, çimlenme borusu oluşumu, üreaz varlığı, bazı şekerleri fermentleme, bazı karbon ve azot kaynaklarını assimile etme yönleriyle incelenmek suretiyle ayırt edilmektedir (Larone, 1995; Yücel, 1987).

C. albicans, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides* tıbbi önemi olan ve en çok karşılaşılan türlerdir (Tümbay, 1999; Hazen ve Howell, 2003). Ülkemizde *C. albicans*'dan sonra ikinci sırada etken olarak daha çok *C. tropicalis*'in geldiği görülmekle birlikte, bazı merkezlerde bu türün yerini *C. glabrata* veya *C. parapsilosis* almaktadır (Alibey ve Direkel, 1999; Güleç ve ark., 1999; Yücesoy ve Ergon, 2005).

Candida türleri, Sabouraud dekstrozu agar (SDA)'da, krem-sarı renkli koloniler oluştururlar. Koloni oluşumu hızlı olup, 24 saatte görülmeye başlar ve üç günde olgunlaşır. Koloni morfolojisi ile tür düzeyinde ayırım yapmak mümkün değildir (Larone, 1995; Yıldırım, 1999).

Klinik örneklerde ve kültürlerinde *Candida* türleri 3-6 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) olarak görülürler. Ayrıca yalancı hif (psödohif) de oluştururlar. Yalancı hif, arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyumların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları bir hücreler zinciridir. *Candida* türleri arasında *C. albicans* blastokonidyum ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (Tümbay, 1999).

Hücre duvarının en temel komponentleri; karbonhidratlar (%80-90), proteinler (%5-15) ve lipidlerdir (%2-5). Karbonhidratların ise %20-30'u mannopteinler, %50-60'ı beta glukozlar, %0.6-9'u kitinden oluşur. Sitoplazmada ökaryot bir çekirdekte başka yağ, protein ve karbonhidrat tanecikleri, olgun hücrelerde vakuol bulunmaktadır (Erbakan, 1989; Çerikçioğlu, 2002).

Değişik *Candida* türlerinin makroskopik ve mikroskopik görünümüne ait bazı özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir (Erbakan, 1989).

Tablo 1. Değişik *Candida* türlerinin makroskopik ve mikroskopik görünümüne ait bazı özellikler

Türler	Agardaki kolonileri (a)	Zar (b)	Maya hücresi morfolojisi	Çimlenme borusu	Klamidospor
<i>C. albicans</i>	krem gibi	0	oval	+	+
<i>C. stelloidea</i>	krem gibi	0	oval	+/-	seyrek
<i>C. tropicalis</i>	krem gibi	ince zar	oval	0	0
<i>C. krusei</i>	yassı, mat, kuru	kalın ve tübe tırmanan zar	silindirik çapraz kibrit gibi dizilmiş uzanmış hücreler	0	0
<i>C. pseudotropicalis</i>	yumuşak, düz, beyaz	0	kalaslar gibi paralel uzanan uzanmış hücreler	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	ince, yassı, düzgün ve parlak	0	oval veya silindirik	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	krem gibi	0	oval bazen dev hücreler	0	0

(a): 25°C'de Sabouraud agarda 3 günlük gelişme

(b): 25°C'de dekstrozu Sabouraud buyyonunda 3 günlük gelişme

II.2. CANDIDA'LARIN PATOGENEZİ

Candida'lar vücut, deri yüzeyi, ağız mukozası, bağırsak lümeni ve vajina mukozasında düzenli ve yaygın olarak bulunan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır. Tüm öteki fırsatçı patojenler gibi belirli hazırlayıcı faktörlerin yardımı ile hafiften en ağır sistematik infeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler (Erbakan, 1989).

Candida türleri genellikle genel durumu bozuk, birden fazla predispoze faktörü olan hastalarda hastalık oluştururlar ve hastalığın oluşması için konak faktörleri son derece önemlidir (Erbakan, 1989; Tümbay, 1999; Ener, 2004). Kandidozun gelişmesinde söz konusu predispozan faktörlerden bazıları Tablo 2'de görülmektedir (Tümbay, 1999).

Tablo 2. Kandidozlarda predispozan faktörler

-
- Derinin maserasyonu (örneğin, nem ile)
 - Diabetes mellitus
 - Hücresel immun yetmezlikler
 - Geniş etki alanlı antibiyotikler
 - Kortikosteroidler ve başka immunosupresif ilaçlar
 - Nötropeni (malignite veya malignitenin tedavisi nedeniyle)
 - Bazı ameliyatlara (organ transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal kanal ameliyatlara)
 - Ciddi yanıklar
 - Damar kateterleri
 - AIDS
 - Kronik yatağa bağlayıcı hastalıklar
 - Damardan narkotik kullanımı
-

Brezilya'da bir üniversite hastanesinde gerçekleştirilen çalışmada 100 hasta retrospektif olarak değerlendirilmiş ve kandidüri gelişiminde rol oynayan major risk faktörleri; önceden uygulanan antibiyotik tedavisi (%93), idrar sondası (%83), son 60 gün içinde cerrahi girişim (%48), böbrek yetmezliği (%32), bakteriyel bir infeksiyonun

eşlik etmesi (%28), kortikosteroid (%20) ve diğer immunsupressif ilaçların kullanımı (%10) olarak bildirilmiştir (de Oliveira ve ark., 2001).

Candida türleri deri ve mukozaların tutulduğu yüzeysel infeksiyonlardan, kandidemi, artrit, osteomyelit, endoftalmit, endokardit, miyokardit, menenjit, peritonit ayrıca, karaciğer, dalak, böbrek, akciğer, gastrointestinal kanal tutulumu ile seyreden yaygın infeksiyonlara neden olabilmektedir (Pfaller, 1994; Kuştimur, 2003).

Kandidozlar, yüzeysel ve derin infeksiyonlar olarak iki grupta incelenebilirler. Yüzeysel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin infeksiyonlarıdır. Yüzeysel kandidozlarda *Candida* deri veya mukozadaki bir çatlaktan yalancı hifleri ile doku içine girer; yalancı hifler ve bunlardan tomurcuklanma ile oluşan blastokonidyumları ile dokuya yayılır. Derin veya sistemik kandidozlarda çoğu kez önce gastrointestinal kanalda bir kolonizasyon vardır. Gastrointestinal mukozayı geçerek veya başka yolla kana ulaşan mantar, fagositik etkinliği yetersiz olan hastalarda kanda çoğalıp hemen hemen her organ veya sisteme yerleşebilir (Tümbay, 1999).

Kandidoz baskın olarak endojen kaynaklı olsa da çapraz infeksiyonlarda görüldüğü ve bulaşın hasta yakınlarının veya sağlık çalışanlarının elleri ile, başta kateterler olmak üzere kullanılan çeşitli aletlerle, tıbbi tedavi ve beslenme amaçlı kullanılan sıvılar ile olduğu bildirilmektedir (Ener, 1998; Munoz ve ark., 2001). Yaygın kandidozda tutulan organlar ile infeksiyon kaynağı arasında yakın bir paralellik söz konusudur. İnfeksiyon GİS kaynaklı ise karaciğer ve dalak, santral venöz katater ile ilişkili ise endokardit ve renal tutulum daha olasıdır (Bodey, 1988; Anaissie ve Bodey, 1989).

Hematojen kandidoz olgularının kliniklerine göre dağılımına bakıldığında; olguların yaklaşık %25'i cerrahi yoğun bakım ünitesinden, %25'i kemik iliği transplantasyon ünitesinden, %20'si dahili yoğun bakım ünitelerinden, %10'u hematoloji-onkoloji ünitelerinden ve geri kalan %20'si de diğer kliniklerden bildirilmiştir (Wenzel, 1995).

Candida türleriyle gelişen nozokomiyal fungeminin hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzattığı ve tek başına %38 mortaliteye neden olduğu gösterilmiştir (Wey ve ark., 1988). *Candida* cinsi içinde *C. albicans* infeksiyonlardan en sık izole edilen tür olmakla birlikte son yıllarda *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C.*

lusitaniae, *C. glabrata*'nın neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlar ön plana çıkmıştır (Abi-Said ve ark., 1997; Girmenia ve Martino, 1998; Hawkins ve Baddour, 2003).

Candida infeksiyonlarının patogenezi açıklanırken *Candida*'ya ait virülans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir. Özellikle konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon, germ tüp oluşturma ve proteinaz enziminin üretimi major virülans faktörleridir. Ayrıca fosfolipaz enzimi, toksinler, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite gibi faktörler de virülans ve patogeneizde rol oynamaktadırlar (Ghannoum ve Abu-Elteen, 1990; Gale ve ark., 1998).

II.3. LABORATUVAR TANI

II.3.1. Kültür

II.3.1.1. Primer İzolasyon

Yüzeysel kandidoz tanısı için incelenecek klinik örnekler; deri kazıntısı, tırnak kazıntısı ve mukozalardan alınan sürüntü ve/veya kazıntı örnekleridir. Derin/sistemik kandidoz kuşkusunda kan, beyin-omurilik sıvısı (BOS), balgam, idrar, eksüdatlar, doku biyopsileri, ameliyatla çıkarılan doku parçaları, damar içi kateter uçları gibi örnekler incelenir (Tümbay, 1999).

Kandidemi, en az bir kan kültüründe bir *Candida* türünün izole edilmesi olarak tanımlanır (Uzun, 2001; Akkurt, 2004). Bunun için *Candida*'ların iyi üreyebildiği çeşitli besiyerleri kullanılmaktadır. Bunların içinde mantarların iyi üreyebildiği litik sentrifugal ya da bifazik özellikteki BACTEC ve benzeri kan kültürü sistemleri kandan izolasyonda çok daha iyi başarı sağlamaktadır (Wilson ve ark., 1992).

Primer izolasyon besiyeri olarak en sık SDA kullanılmakla beraber, patates dekstroza agar ve Mycosel veya Mycobiotic agar gibi besiyerleride kullanılabilir (Koneman ve ark., 1997; Yıldırım, 1999; Sutton, 2003).

II.3.1.2. İdentifikasyon

Germ Tüp Testi:

Candida'ların konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonu uzun sürmektedir. Bu nedenle çabuk sonuç veren yöntemlere gereksinim vardır. Germ tüp testi çabuk, kolay ve ucuz bir testtir. *Candida* suşları insan veya tavşan serumu içeren tüplerde 2 saat 37°C'de bekletilerek germ tüp oluşumu yönünden incelenebilir. Maya hücresinden

direkt ve kısa bir hif başlangıcı şeklinde, septumlarında boğumlanmasının olmadığı germ tüpler oluşturulur. *C. albicans* germ tüp pozitif olmakla beraber *C. tropicalis* yalancı pozitiflik verebilir (Helvacı ve ark., 1992; Yıldiran, 1999).

Mikroskopik Morfoloji:

Hif, pseudohif, blastospor ve klamidospor üretme özelliklerinin mikroskopik olarak değerlendirilmesi için mısır unlu (cornmeal)-Tween 80 agar, pirinç ekstresi-Tween 80 agar, Oxgall agar, Wolin Bevis agar veya Czapek Dox- Tween 80 agara çizgi ekimi yapılarak üzeri lamelle kapatılır. 26-27°C'de 24-72 saat inkübe edilir. Kapatılan lamel ortamın oksijenini azaltarak, Tween 80 ise yüzey gerilimini düşürerek klamidospor ve pseudohif yapımını artırır (Koneman ve ark., 1997; Yıldiran, 1999).

Biyokimyasal Özellikler:

a) Karbonhidrat asimilasyon testi:

Mayaların karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanma yetenekleri değerlendirilir. Klasik olarak mayaların karbonhidrat kullanma özellikleri Wickerham'ın asimilasyon ve fermentasyon yöntemleriyle incelenir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini API 20 C, ID 32 C ve Uni-Yeast-Tek gibi hazır ticari test sistemleri almıştır. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlar API sistemleridir (Yıldiran,1999).

b) Üreaz testi:

Candida türlerini diğer mayalardan ayırmaktadır. *Candida* cinsi içerisinde hem üreaz pozitif hem de negatif türler bulunmaktadır; ancak klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz-negatiftir. Christensen'in üre agarının rengi pembeye dönüşürse pozitif, renk değişimi olmadan orijinal sarı renginde kalırsa negatif reaksiyon olarak değerlendirilir. Mayadaki üreaz enzimiyle üreden açığa çıkan amonyağın neden olduğu alkali pH, renk indikatörünü pembeye dönüştürür (Yıldiran,1999).

Kromojenik Besiyerleri:

İzolasyon ve identifikasyon amaçlı olarak çeşitli kromojenik besiyerleri kullanılmaktadır. Özellikle karışık türler ile olan infeksiyonlarda CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris) mayaların seçici olarak izolasyonunu ve *C. albicans*, *C. tropicalis*

ve *C. krusei*'nin identifikasyonunu sağlamaktadır. Albicans ID agar, *Candida* ID agar da ticari kromojenik besiyerlerindedir (Pfaller ve ark., 1996; Özkütük ve ark., 2000).

II.3.2. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

II.3.2.1. Serolojik Testler

İnvaziv mantar infeksiyonlarında ayırt edici klinik bulguların yetersizliği, mevcut yöntemlerin zaman zaman etken mantar izolasyonundaki başarı oranının çok yüksek olmayışı, serolojik testlere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Mantarlar, bakteriler ile karşılaştırıldıklarında; zayıf antijenik yapıya sahip olsalar da serumda sirküle olan antijen ve antikorların saptanması, uygulanan deri testleri ile mikolojik tanıya yardımcı olurlar veya çeşitli mikotik infeksiyonlarda tedaviye yanıtın belirlenmesi için hastalık prognozunun izlenmesi gibi önemli işlevleri üstlenirler (Çerikçioğlu, 1999; Yeğenoğlu, 2001).

II.3.2.2. Antikorların gösterildiği testler

Candida'ya karşı oluşan antikorlar tüm hücre aglütinasyonu, LA (Lateks aglütinasyon), indirekt immünfloresans ve RIA (radioimmunoassay) ile araştırılabilir. Ancak antikor aranmasının tanısız değeri hayal kırıcı olmuştur (Verweij ve Meis, 2000). Çünkü, immün sistemi baskılanmış kişilerde antikor oluşmaması, pozitif antikor varlığının kolonizasyon ve infeksiyonu ayıramaması, nötralizan antikorların bulunabilmesi, antijen ile antikorların uzaklaştırılabilmesi, mannan antikorunun dalak ve karaciğer tarafından hızla kandan uzaklaştırılması nedeniyle antikor aranması testlerinin duyarlılığı düşüktür (McLintock ve Jones, 2004).

II.3.2.3. Antijenlerin gösterildiği testler

İnvaziv kandidozda tanı göstergeleri ısıya duyarlı antijen, mannan, D-arabinitol ve enolazdır. Mannan kandan hızla temizlenir, sık örnekleme gerekir. Duyarlılığı %31-90 arasındadır. Isıya duyarlı antijen duyarlılığı %6-71 arasındadır. D-arabinitol bir metabolittir, serumda dolaşır ve idrarda toplanır. Duyarlılığı %50'dir. Enolaz duyarlılığı %54-75 arasındadır (McLintock ve Jones, 2004).

II.3.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Fungal infeksiyonlar çok kısa sürede hayatı tehdit eden klinik tablolara dönüşebildikleri için patojen mikroorganizma en kısa sürede tanımlanmalı ve tedaviye başlanmalıdır (Costa ve ark., 2000). Geçen yüzyılda tanısal yaklaşımlar daha çok mikroorganizmanın biyokimyasal veya morfolojik fenotipinin belirlenmesine dayalı olarak gerçekleştirilmekte iken, moleküler yöntemlerin son yıllarda yaygınlaştığı dikkati çekmektedir. Moleküler tanısal uygulamalar etiyolojik tanıda hız, duyarlılık ve bazı durumlarda da özgüllük artışına sebep olmuştur (Ahmad, 2002; Saraçlı, 2005).

Kandidozlar konusundaki moleküler çalışmalar üç ana hedefe yönelik olarak gerçekleştirilmektedir (Hopfer, 1995; Saraçlı, 2005).

- i. Klinik örneklerden *Candida* türlerinin erken ve çabuk saptanması
- ii. Doğrudan klinik örnek veya kültür ortamında cins veya tür düzeyinde hızlı tanımlama
- iii. Antifungal duyarlılığın ve tedaviye yanıtın ortaya konması

Maaroufi ve ark. yaptıkları bir çalışma sonucunda, PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi ile kan örneğinde 5 CFU/ml maya hücrelerinin bile saptanabildiği ifade edilmektedirler. *C. albicans*'ın PCR (Polymerase chain reaction) temelli tanısının geleneksel kan kültüründen çok daha duyarlı (%100), özgün (%97) ve tekrarlanabilir (%96-99) olduğu gösterilmiştir (Maaroufi ve ark., 2003). Bu sebeple fungal yükün çok az olması sebebiyle kültür ve serolojik tanının henüz yetersiz olduğu evrede, PCR temelli tanı çok etkindir. Ancak DNA saptamaya yönelik teknikler henüz deneysel düzeydedir ve ticari olarak mevcut değildir (Maaroufi ve ark., 2003; Saraçlı, 2005).

II.3.2.5. Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılığını ölçmede bize yardımcı olmaktadır. Bu tanı yöntemleri insanlardan alınan klinik örneklerle uygulanmadan önce deneysel olarak infekte edilmiş hayvanlardan alınan örneklerde incelenmekte ve güvenli tanı konulabilecek en düşük organizma miktarları saptanmaktadır (Hurst ve ark., 2000).

II.4. ANTİFUNGAL İLAÇLAR

Bağışık özürü hastalarda yaşamı tehdit eden mantar infeksiyonlarında artış görölmesi, antifungal sağaltım konusunda yenilikleri ve sorunları da beraberinde getirmiştir. Mantar hücrelerinin memeli hücreleri gibi ökaryot yapıda olması; protein, DNA veya RNA biyosentezini inhibe eden antifungal ilaçların insanlar için toksik özellikte olmasına ve sonuç olarak bu alandaki ilerlemelerin yavaşlamasına yol açmaktadır (Hay, 1994).

Yirminci yüzyılın başında mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek etkin antifungaller yoktu. 1951 yılında hem oral hem de topikal etkili bir poliyen antibiyotik olan nistatin bulunduktan sonra, 1956'da yine poliyen bir antibiyotik olan amfoterisin B'nin bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur (İnci, 1999). Antifungal ilaçların yıllara göre gelişimi Tablo 3'de gösterilmektedir (Neely ve Ghannoum, 2000).

Tablo 3. Antifungal ilaçların yıllara göre gelişimi

• 1950'ler Amfoterisin B, Nistatin
• 1960'lar Griseofulvin
• 1970'ler Flusitozin, Klotrimazol, Mikonazol
• 1980'ler Ketokonazol, Flukonazol, Itrakonazol
• 1990'lar Lipid Amfoterisin B, Terbinafin
• 2000'ler Ekinokandinlerden; Mikafungin (FK 463), Kaspofungin
Azollerden; Vorikonazol, Posakonazol, Ravukonazol
Polienlerden; Lipozomal Nistatin, Nanosferik Amfoterisin B ve
Sordarinler, Nikomisinler, Pradimisinler

Amfoterisin B ve azol türevleri, özellikle flukonazol ve itrakonazol antifungal kemoterapinin başlıca dayanağını oluşturmaktadır (Hay, 1994). Genel durumu bozuk olan hastalarda her zaman tedaviye altın standart ilaç olan amfoterisin B ile başlanır, durumu stabilizeşen hastalarda azol türevleri önerilir (İnci, 1999).

Sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılabilecek antifungal ilaçlarda antibakteriyel ilaçlarda olduğu kadar çeşitlenmenin olmaması yanında kullanıla gelen

antifungallerin bazı türlerde etkili olamaması, antibakteriyellere olduğu gibi bazı mantar türlerinin de kullanılan antifungallere direnç geliştirmesi tedavide sorun oluşturabilmektedir (Hay, 1994; Ulutan, 2003).

Son 10 yılda amfoterisin B'nin lipid formülasyonları, yeni azol türevleri ve mantar hücre duvarı biyosentezini hedef alan yeni antifungal ilaçlar da geliştirilmiştir. Ayrıca antifungal ilaçların toksik etkilerini en aza indirmek ve direnç gelişimini önlemek için kombine sağaltımın etkinliği üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır. Ancak antifungal kemoterapi alanında güncel sorunlar hala giderilememiştir (Bryskier, 1998; Sürücüoğlu, 1999).

II.4.1. Amfoterisin B ve Lipid Formülasyonları

Toprakta bulunan *Streptomyces nodosus* cinsi mikroorganizmadan elde edilen Amfoterisin B (AMB) halen en geniş spektrumlu polyen grubu bir antifungaldir. AMB hayatı tehdit eden pek çok sistemik fungal infeksiyonlarda altın standart olarak kabul edilen polyen grubu bir antifungaldir (Gallis ve ark., 1990; Uzun, 1998; Stevens ve Bennett, 2000). Amfoterik özellikte olup asit ve bazik ortamda çözülebilen tuzlar yapar ve pH 2-11 arasında suda erimez. Bu nedenle sodyum deoksikolat ile kararlı kolloidal bir süspansiyon oluşturularak suda çözünebilirliği artırılmıştır (Stevens ve Bennett, 2000).

Polyen grubu antifungaller membran sterollerini ile kompleksler yaparlar. Mantarların sitoplazmik membranının temel sterolu olan ergosterole affinitesi memeli hücre membranının sterolu olan kolesterole göre daha fazladır. Fungus hücre membranında ergosterol ile etkileşen AMB'in membranda delikler oluşturup permeabiliteyi artırarak hücre ölümüne neden olduğuna inanılmaktadır (Kayaalp, 1995; İnci, 1999; Stevens ve Bennett, 2000). Ayrıca lipid peroksidasyonu, membran enzimlerinin inhibisyonu, endositoz ve immun situmulasyonun bloke edilmesi öne sürülen diğer etki mekanizmalarıdır. Etki hızlı başlar ve üreme oranı ile ilişkili değildir. AMB'ye orta derecede direnç gelişir. Direnç gelişiminde sterol yapısının değişmesi, üreme oranının azalması ve azalmış virülans etkilidir (Stevens ve Bennett, 2000).

Fungusidal etkili olan AMB'nin etki spektrumunu oldukça genişletir. *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporotrichum spp.*, *Cryptococcus neoformans* ve *Candida lusitaniae* dışında *Candida* cinsi mantarlar oldukça duyarlıdır

(Stevens ve Bennett, 2000; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2002). Ancak bazı kandida suşları dirençli veya toleran olabilir. *Aspergillus* cinsi ve *Zygomycetes* cinsi mantarlara aktivitesi değişken olabilir. *Fusarium* cinsi, *Trichosporon* cinsi, *Pseudallescheria boydii*, *Malassezia furfur* ve kromoblastomikoza yol açan mantarlar AMB'ye dirençlidir. Bu kadar geniş spektrum ile AMB klinikte pek çok sistemik fungal infeksiyonda ilk kullanılacak ilaçtır (Denning ve ark., 1997; Stevens ve Bennett, 2000).

Oral kullanımı gastrointestinal absorpsiyonu iyi olmadığı için yoktur. Topikal ve intravenöz olarak kullanılır (Kayaalp, 1995). Genellikle doz aralığı 0,5-1,5 mg/kg/gün şeklinde, 10-14 gündür (İnci, 1999; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2002). AMB %90'dan fazla plazma proteinlerine bağlanır ve intravenöz verilmesinden yaklaşık 12 saat sonra sadece %10'u kanda kalır. Dokularda özellikle karaciğer ve dalakta konsantrasyonu yüksektir. Karaciğer ve diğer organlarda depolanır ve daha sonra yavaş olarak kana tekrar geçer. Normal veya inflame meninkslere, tükürük, bronşiyal sekresyon, beyin, pankreas, kas, kemik ve normal amniyotik sıvıya geçişi zayıftır. AMB serum düzeyleri karaciğer ve böbrek yetmezliklerinden etkilenmez (Denning ve ark., 1997; Dix, 1998).

AMB alan hastaların bir kısmında ilk infüzyondan 30-45 dakika sonra sonra görülen akut başlayan ateş, titreme, hipotansiyon, takipne ve taşikardi gelişir. Bu etkiler 2-4 saat sonra yatıştır. İnfüzyona bağlı yan etkilerin monosit ve makrofajların salgıladığı TNF alfa, IL-1 ve IL-6 ile ilişkili olduğu öne sürülür. Daha az olarak bulantı, kusma, baş ağrısı, artralji, myalji, hipotermi, bronkospazm gibi erken toksik belirtiler çıkabilir. Uzun süreli kürlerde kemik iliği depresyonuna işaret eden ilerleyici normokromik anemi beklenebilir (Dix, 1998; İnci, 1999; Stevens ve Bennett, 2000; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2002). Anafilaksi çok nadirdir (Dix, 1998; Stevens ve Bennett, 2000).

AMB'nin dar terapötik aralığı ve önemli yan etkileri sistemik fungal infeksiyonlarda yeni antifungallerin geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmuştur. Bu amaçla geliştirilen azol gurubu antifungaller spektrumunun çok geniş olmaması ve direnç gelişmesi gibi sorunlar yüzünden AMB'nin yerini tam olarak alamamıştır. Bunun üzerine lipozomal teknolojiden yararlanarak AMB'nin üstünlüklerinden de vazgeçmeden AMB'nin lipid formülasyonlarının yapılması gündeme gelmiştir (Wasan ve Lopez-Berestein, 1996).

Bugün kullanımda olan ve Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay alan 3 lipid formülasyonlu AMB vardır. Bu AMB lipid formülasyonları FDA'dan

onay alınma sırasına göre; 1995’de AMB lipid kompleks (ABLC-Abelcet), 1996’da AMB koloidal dispersiyon (ABCD-Amphocil) ve 1997’de lipozomal AMB (L-AMB-Ambisome) şeklindedir (Wong-Beringer ve ark., 1998).

II.4.1.1. Amfoterisin B Lipid Kompleks (ABLC)

Lopez-Berstein tarafından geliştirilen molekül 7:3 molar oranda dimiristoyl-fosfatidil kolin ve dimiristoyl-fosfatidil gliserolün oluşturduğu şerit şeklinde kompleks yapılarıdır. Bu kompleksde lipozomal ve lipozomal olmayan çift tabakalı lipid yapılar bulunur. ABLC’nin partikül çapı 1.6-11 µm’dir. En önemli dezavantajı partiküllerin eşit miktarda ilaç içermemesidir (Dix, 1998; Wong-Beringer ve ark., 1998).

II.4.1.2. Amfoterisin B Kolloidal Dispersiyon (ABCD)

ABCD amfoterisin B ile sodyum kolesteril sülfatın 1:1 oranda birleşmesi ile oluşturulmuş bir lipid formülasyonlu AMB’dir. Çapı 122 nm, kalınlığı 4 nm olan disk şeklinde multilamellar bir yapıya sahiptir (Wong-Beringer ve ark., 1998).

II.4.1.3. Lipozomal Amfoterisin B (L-AMB)

L-AMB uniform, sferik, 60-70 nm boyutunda unilamellar lipid veziküllerinden oluşur. Bu çift katlı lipid tabakası kolesterol ile stabilize edilmiş distearoyl-fosfatidilgliserol ve hidrojenlenmiş soy fosfatidilkolin ile AMB’nin kombine edilmesinden oluşur. Bir molekül amfoterisin B’ye karşı 9 molekül lipid içerir (Wong-Beringer ve ark., 1998).

II.4.2. Azoller

Azol grubu antifungal ajanlar hem yüzeysel hem de derin mikozların tedavisinde başarıyla kullanılmakta olan ilaçlardır (Sheehan ve ark., 1999). Azollerin antifungal etkisi mantar hücre membranının asıl sterolu olan ergosterol sentezini hedef alır. Azoller lanosterolün ergosterole dönüşümü için gerekli olan sitokrom P-450 enzimine bağımlı C-14 alfa demetilaz enzimini inhibe ederek etki gösterirler. Ergosterol yerine metillenmiş sterollerin birikimi hücre zarına bağlı hücre işlevlerini bozar. Azollerin diğer antifungal etkileri; endojen respirasyonun inhibisyonu, membran fosfolipitleri ile toksik etkileşim ve mayaların miçel forma dönüşümünün inhibisyonudur. Azollerin en

önemli dezavantajı insan hücrelerindeki sitokrom P-450 enzimi ile etkileşime girerek bazı metabolik olaylarda bozulmaya yol açabilmesidir (Como ve Dismukes, 1994; Viviani ve ark., 1998).

Klinik kullanımdaki azoller, azol halkasında iki ya da üç nitrojen bulunmasına göre imidazoller (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol, ekonazol) ve triazoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) olarak sınıflandırılır (Sheehan ve ark., 1999).

Genel bir yaklaşım yapmak gerekirse, imidazoller daha çok yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılırken triazoller özellikle sistemik mikozların tedavisinde önemli bir etkiye sahiptirler (Sheehan ve ark., 1999).

II.4.2.1. Flukonazol

İlk defa 1981'de sentezlenen geniş spektrumlu bir bis-triazol türevidir. Flukonazol molekülü tasarlanırken imidazol grubunun yerine bir triazol grubunun kullanılması, metabolik degradasyon bölgelerinden birini ortadan kaldırmış ve ilacın mantarlardaki demetilaz enzimine karşı olan spesifitesini arttırmıştır. İkinci bir triazol grubunun eklenmesi ise antifungal aktivitenin daha da artmasını sağlamıştır (Como ve Dismukes, 1994; Or ve Dokuzeylül, 2005).

Flukonazol sudaki çözünürlüğünün çok iyi olması ile itrakonazolden farklılık gösterir. Bu özelliği intravenöz kullanımına olanak sağladığı gibi oral alımından sonra emiliminin iyi olmasına, mükemmel doku dağılımına ve ilaç etkileşiminin diğer azollerden daha az olmasına da olanak sağlar. Ancak bu avantajlarına karşın bazı maya türlerinde direnç gelişmesi etki alanının sınırlı kalmasına neden olmaktadır (Como ve Dismukes, 1994; Viviani ve ark., 1998).

Candida türleri (*C. glabrata* karşısında azalmış etki ve *C. krusei* karşısında etkisiz) ve *Cryptococcus neoformans*'a etkilidir. Sistemik kandidiyazda 200-400 mg/gün, 6-8 hafta önerilmektedir (İnci, 1999; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2002).

İnsanlarda en sık görülen yan etkileri bulantı, baş ağrısı, karın ağrısı olmakla birlikte karaciğer fonksiyonlarında klinik bakımdan anlamlı bir değişiklik yapmaz (İnci, 1999; Or ve Dokuzeylül, 2005).

II.4.2.2. Vorikonazol (UK-109,496)

Sistemik mantar infeksiyonlarının ciddi seyri ve yüksek mortalitesi, mevcut antifungaller ile tedavide yaşanan güçlükler (itrakonazolde emilim sorunları, flukonazolde sınırlı aktivite), yıllardır altın standart olarak kalan amfoterisin B'ye bağlı yan etkiler (nefrotoksisite, ateş, titreme ve hipokalemi başta olmak üzere) ve amfoterisin B'nin hem oral hem de parenteral formlarının olmaması, flukonazol başta olmak üzere azollerin ve amfoterisin B'nin yeterince etkin olmaması yeni antifungal ajanlara gereksinimi de beraberinde getirmiştir (Johnson ve Kauffman, 2003; Öztürk, 2005; Tabak, 2005).

Yeni geliştirilip klinik kullanıma girmiş olan antifungallerden biri vorikonazoldür. Vorikonazol, flukonazol çekirdeğinde yapılan değişikliklerin sonucunda daha güçlü, daha geniş spektrumlu oral ve parenteral kullanıma uygun yeni bir ikinci kuşak triazol antifungaldir. Vorikonazole ilgili klinik çalışmalar (faz 1) Avrupa'da 1991 yılında başlatılmış; ampirik tedavi protokolü 1997 yılında kabul edilmiş, nihayet Mayıs 2002 tarihinde "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından onay almıştır (Jeu ve ark. 2003; Johnson ve Kauffman, 2003; Öztürk, 2005; Tabak, 2005).

Oral ve intravenöz formlar halinde hazırlanmıştır. Vorikonazol, diğer azollerde olduğu gibi sterol sentezinde kritik noktalarda inhibisyona yol açarak etkisini gösterir. Vorikonazol, sitokrom P450 14- α -demetilaz enzimini inhibe eder (Jeu ve ark. 2003; Öztürk, 2005).

Vorikonazol, oral formülasyonunun bulunması nedeniyle uzamış, ardışık tedavide uygun bir seçenek olacaktır. Ayrıca itrakonazol ve flukonazolün aksine emilimi mide içi pH değişikliklerinden etkilenmemektedir (Johnson ve Kauffman, 2003; Tabak, 2005).

Vorikonazol *Candida* ve *Cryptococcus* türlerine, *Aspergillus* türlerine, dimorfik mantarlara ve diğer küflere etkilidir. *C. krusei* gibi flukonazole dirençli türlere etkili olması yanında *Aspergillus* türlerine itrakonazolden daha etkili olması, amfoterisin B'ye dirençli *Aspergillus terreus*'a etkili olması vorikonazola önemli üstünlükler sağlamaktadır (Herbrecht ve ark., 2002).

Vorikonazol tedavisi sırasında en sık gözlenen yan etki geçici, dozla ilişkili görme bozukluğudur. Görülebilen diğer yan etkiler; ateş, döküntü, kusma, ishal, bulantı,

sepsis, baş ağrısı, solunum bozuklukları ve periferik ödem şeklinde sıralanabilir (Johnson ve Kauffman, 2003; Tabak, 2005).

II.5. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Son yıllarda önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilen invaziv fungal infeksiyonların insidansındaki artış, antifungal sağaltımdaki farklı seçenekler, fungal etkenlerin spektrumundaki değişim ve fungal patojenler arasında antifungal ilaçlara direncin yaygınlaşması, antifungal duyarlılık testlerine gereksinimi arttırmıştır (Konntoyiannis ve Lewis, 2002).

Antifungal duyarlılık testlerinin derin bölgelerden soyutlanan, invaziv kandidoz tablolarından üretilen *Candida* spp. (özellikle non albicans türler) suşlarına ve AIDS'li olgularda izlenen rekürren orofaringeal kandidoz gibi özel klinik tablolardan soyutlanan *Candida* izolatlarına, ayrıca da standart sağaltıma yanıt alınamayan durumlarda uygulanması önerilmektedir (Pfaller ve Yu, 2001). Rex ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmaya göre, antifungal duyarlılık testlerinin en fazla oranda *albicans* dışı *Candida* türleri ile oluşan infeksiyonlarda yararlı olduğunu vurgulamıştır (Rex ve ark., 2000).

Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması gereken durumları maddeler halinde özetlersek (Kuştımur, 1999);

- i. Etken mikroorganizmaya karşı etkili olduğu bilinen antifungal ilaç ile tedaviye yanıt alınmadığı durumlarda
- ii. Alternatif ilaçların araştırılmasının gerektiği ve özellikle seçilen ilaca karşı mantarın direnci olduğu bilinen durumlarda
- iii. Flusitozin ile tedavi varsa (direnc sıklıkla görülmektedir)
- iv. Yeni ilaçların kullanıldığı durumlarda
- v. Ağır immun sistem yetmezliği bulunan hastalarda sistemik infeksiyon geliştiği zaman
- vi. *In vitro* ve *in vivo* uyumun belirlenmesini amaçlayan durumlarda

İdeal olarak *in vitro* duyarlılık testleri (Kuştımur, 1999);

- İki ya da daha fazla ilacın aktivitesinin güvenilir olarak ölçülmesini
- İlaçların *in vivo* aktiviteleri ile uyumlu ve tedavi sonuçlarını ölçebilmeyi

- Normal olarak duyarlı organizma topluluğu içindeki direncin gelişmesinin izlenmesini
- Yeni geliştirilen deneysel ilaçların tedavi edici güçlerini ölçebilmeyi sağlamalıdır.

Bu özelliklerin yanında testin, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin yüksek, hızlı sonuç verebilen, kolay uygulanabilir ve ucuz olması gerekmektedir (Konntoyiannis ve Lewis, 2002).

ABD’de NCCLS tarafından 1982 yılında kurulan alt komite *in vitro* antifungal duyarlılık testleri çalışmalarına başlamış, on yıl süren yoğun çalışmalar sonunda mayalar için buyyon makrodilüsyon yöntemini öneren ilk belge 1992’de M27-P adıyla yayımlanmıştır. Makrodilüsyon yönteminin zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle 1995 yılında NCCLS M27-T belgesi ile yayımlanan mikrodilüsyon yöntemi geliştirilmiştir. Bazı yeniliklerle 1997’de M27-A ve 2002’de son olarak bu gün kullanılan M27-A2 yayımlanmıştır. Küfler için antifungal duyarlılık testini sunan ilk belge 1998’de M38-P adıyla ve onun geliştirilmesiyle 2002’de bugün kullanılan M38-A yayımlanmıştır (NCCLS 1992; NCCLS, 1997; NCCLS, 2002).

Candida türlerinin amfoterisin B için direnç sınır değerleri konusunda fikir birliğine varılamamıştır (Neeley ve Ghannoum, 2000; Rex ve ark., 2000). Bununla birlikte flukonazol, itrakonazol ve 5-flusitozin için duyarlılık ve direnç sınırları belirlenmiştir. Bu antifungallerin duyarlılık ve direnç sınırları Tablo 4’de gösterilmektedir (NCCLS, 1997; Rex ve ark., 2001; Rex ve Pfaller, 2002).

Tablo 4. NCCLS’in *Candida* türleri için önerdiği duyarlılık ve direnç sınırları ($\mu\text{g/ml}$)

Antifungal ajan	Duyarlı (S)	Doza bağımlı duyarlı (S-DD)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)
Flukonazol*	≤ 8	$>8-\leq 32$	>32	>32
Itrakonazol	≤ 0.125	$>0.125-\leq 0.50$	>0.5	>0.5
5-Flusitozin	≤ 4	-	$>4-\leq 16$	>16

*: *C. krusei* intrinsek olarak dirençli kabul edildiğinden bu mantarın flukonazol sonuçları bu tabloya göre değerlendirilmemelidir.

Belirtilen referans yöntemlerin yanında, bunlar ile değişen oranlarda uyumları bildirilen bir çok teknik geliştirilmiştir (Rex ve ark., 2001; Pfaller ve Yu, 2001). Bu yöntemler Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Antifungal duyarlılık testleri

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

*: NCCLS'in referans kabul ettiği yöntemler

II.5.1. Makrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntem yalnızca *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için standardize edilmiştir. Dimorfik mantarların maya şekillerinde ve filamantöz mantarlarda uygulanmamıştır. Buyon makrodilüsyon testi, mantar izolatlarına karşı tüm antifungallerin test edilmesi için yeterli bir yöntemdir. Ancak çalışılacak örnek sayıları az olan küçük laboratuvarlar için uygundur (NCCLS, 1992).

II.5.2. Mikrodilüsyon Yöntemi

Daha önce referans olarak önerilen yöntemin uygulama zorluğu, zaman alması ve fazla malzeme kullanma gerekliliği gibi dezavantajları söz konusudur. Mikrobuyon dilüsyon yönteminin referans makrobuyon dilüsyon sonuçları ile uyumlu bulunması ve mikrobuyon dilüsyon yönteminin hızlı, ekonomik, otomatize edilebilir olması gibi avantajlarının da gözönüne alınması sonucu; NCCLS bu yöntemi de referans olarak kabul etmiştir (NCCLS, 1997). Ancak referans mikrodilüsyon yönteminde önerilen görsel okuma zordur ve kuyucuklardaki bulanıklığın değerlendirilmesi ancak ayna kullanarak yapılabilmektedir (Jahn ve ark., 1995; Gülay, 1997)

M27-A2’de mayalar için standart mikrodilüsyon yöntemine ilişkin parametreler Tablo 6’da sunulmuştur (NCCLS, 2002).

Tablo 6. NCCLS M27-A2 mayalar için standart mikrodilüsyon yönteminin temel prensipleri

Besiyeri	RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, fenol kırmızılı, MOPS ile tamponlanmış, pH 7
İnokulum	0.5-2.5 x 10 ³
İnkübasyon ısısı	35°C
İnkübasyon süresi	48 saat (<i>Candida</i>), 72 saat (<i>Cryptococcus neoformans</i>)
MİK değeri	Amfoterisin B için “0” (üremenin tam inhibisyonu) Azoller ve flusitozin için skor “2” (üremenin %50 inhibisyonu)
Öneri	Mikroplağın okunmadan önce çalkalanması

II.5.3. Spektrofotometrik Yöntemler

MİK değerlendirilmesinde antifungal içeren kuyucukların spektrofotometrede absorbansları alınarak kontrol kuyucuğununki ile karşılaştırılır (Rodriguez-Tudela ve ark., 1996).

II.5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi

Yöntem ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte standartlar söz konusu olmadığından sonuçlar farklılıklar göstermiştir (Xu ve ark., 1998).

Xu ve arkadaşları agar dilüsyon temeline dayalı bir yöntem geliştirmiştir. Buna göre, farklı flukonazol konsantrasyonları içeren besiyerlerine ekilen kolonilerin çevresi 24 saat sonra saptanarak, ilaçsız besiyerindeki ortalama ile karşılaştırılır ve kontrole göre koloni çevresinde önemli miktarda azalma saptanan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak belirlenir. Bu basit, hızlı, ucuz ve ek alet gerektirmeyen yöntemin referans yöntemine uygun sonuç verdiği bildirilmiştir (Xu ve ark., 1998).

II.5.5. Disk Difüzyon Yöntemi

Kolay uygulanabilir ve basit olan bu yöntemin özellikle 24 saat sonraki değerlendirmelerde referans yöntem ile çok iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu

yöntemin tek dezavantajı olarak doza bağımlı duyarlı suşlar ile gerçek dirençli suşları ayırt edememesidir (Barry ve Brown, 1996).

II.5.6. E Test

Plastik strip üzerine çeşitli konsantrasyonları emdirilen antifungal ilacın agarlı besiyerine geçişi ile gerçekleştirilen ve MİK değerini saptayabilen bir difüzyon yöntemidir. Bu yöntem pahalı olmasına karşın, disk difüzyon gibi kolayca uygulanabilmesi, ek malzeme gerektirmemesi nedeniyle son yıllarda önem kazanmıştır (Kuştimur, 1999).

II.5.7. Flovritometrik Yöntem

Test, propidyum iyodürün DNA'ya bağlanmasını takiben FA Scan Flow Cytometer cihazında floresans ölçümüne dayanır. Bu yöntemin avantajları olarak; kısa sürede sonuç vermesi, çok hücre incelenmesi nedeniyle hata payını azaltması ve antifungallerin etki mekanizmalarının ayırımına olanak vermesi sayılabilir (Ramani ve Chaturvedi, 2000).

II.5.8. Kolorimetrik Yöntemler

Alamar mavisi ve XTT (2,3 bis 2-metoksi. 4-nitro-5 sulfafenil-5-fenilamino karbonil 2H-tetrazolium hidroksi) ile MTT (3-[4,5- dimetil tiyazol-2yl]-2,5 difenil tetrazolium bromit) gibi tetrazolium tuzları indikatör olarak kullanılarak daha kolay ve objektif bir değerlendirme sağlanmaya çalışılmıştır (Kuştimur, 1999)

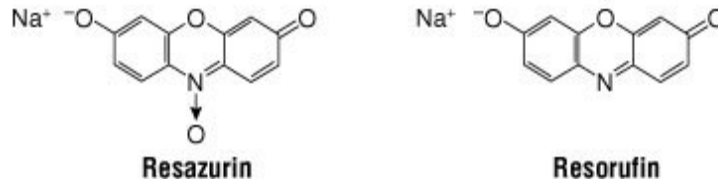
Alamar mavisi bir kolorimetrik oksidasyon-redüksiyon indikatörüdür ve normalde mavi olan bu ayıraç üreme varlığında pembeye dönüşmektedir. Bu yöntemde, pembe renge değişme göstermeyen ilk mavi renkli kuyucuk MİK değeri olarak belirlenmektedir (Kuştimur, 1999).

XTT ve MTT, hücresel dehidrogenazlar tarafından indirgenerek mor renkli formazana dönüştürülmektedir. Bu kristaller eritildikten sonra oluşan renk yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılı olmaktadır (Gülay ve Yuluğ, 1995).

II.6. RESAZURİN

Resazurin geleneksel olarak süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojik özelliklerini değerlendirmek için kullanılan bir redoks boyadır. Resazurinin redüksiyonu renk değişikliği ile karakterize olduğu için ve resazurin redüksiyon ara formu (resorufin) güçlü bir florojenik redoks indikatör olduğu için resazurin konsantrasyonundaki küçük değişiklikler fotometrik veya florometrik metodlarla tespit edilebilir (Wang ve ark., 1998).

Resazurin, oksidasyon-redüksiyon indikatörü olarak resazurin mikroplak metodu (RMM) kullanılır ve aynı zamanda hücre proliferasyonu ve mikrobiyal büyümeyi değerlendirmek için kullanılabilir. Mavi renkli non-floresan boya canlı hücrelerdeki oksido-redüktaz enzimi ile pembe renkli floresan görülen resorufin'e indirgenir (Coban ve ark., 2005).



Şekil 1. Resazurin ve resorufin'in kimyasal formülleri

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

III.1. İZOLATLAR

Çalışmaya kan örneklerinden izole edilmiş 58 *Candida* suşu dahil edildi. Bu *Candida* suşları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, değişik servislerde yatan hastalardan izole edildi. Klinik suşların yanında standart suş olarak *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 çalışmada kullanıldı.

III.2. İZOLASYON VE TANIMLAMA

Hastalardan alınan kan örnekleri BD BACTEC PLUS (Becton Dickinson&Company, Shannon, Ireland) otomatize kan kültür sistemi şişelerine ekildi. Üreme tespit edilen şişelerden kanlı agar (bioMerieux sa, Marcy l'Etoile, France) ve EMB (Eosin-methylene blue) agara (bioMerieux sa, Marcy l'Etoile, France) pasaj yapılarak, kültürler 36°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerden gram boyası yapıldı. Maya olduğu görülen kolonilerden SDA (MERCK, Darmstadt, Germany)'ya pasaj yapılarak 24-48 saat 36°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda krem-sarı renkli, hamurumsu-mukoit yapıdaki saf olduğundan emin olunan kolonilerden %15 gliserinli buyyon içeren ependorflara ekim yapıldı ve -20°C'de saklandı. Saklamada bulunan suşlar kullanılacakları zaman, iki kez SDA'ya pasajlanarak saf olduklarından emin olunduğunda çalışmaya dahil edildi.

III.2.1. Germ Tüp Testi

0.5-1 ml insan serumu içine küçük bir maya kolonisi karıştırıldı. Bu karışım 2-2.5 saat 37°C'de inkübe edildi. Sürenin sonunda lam lamel arasında alarak x400 büyütmede incelendi. Maya hücresinden direkt ve kısa bir hif başlangıcı şeklinde, septumlarında boğumlanmasının olmadığı yapılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp pozitif olan suşlar *C. albicans* olarak değerlendirildi (Helvacı ve ark., 1992; Yıldırım, 1999).

III.2.2. Piriç Ekstresi-Tween 80 Agar

Tween 80 (MERCK Schuchardt, Hohenbrunn, Germany) içeren piriç ekstresinin hazırlanışı şu şekilde yapıldı: 50 gr piriç, 300 ml distile su içinde kaynatılıp birkaç kat gazlı bezden süzöldü ve buna 20 gr agar, 20 gr glukoz, 10 ml Tween 80 eklenip distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Bu karışım 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril petrilere dököldü.

SDA da üretilen kolonilerden iğne uçlu öze ile alınarak Piriç ekstresi-Tween 80 agar üzerine birbirine paralel üç çizgi halinde ekim yapıldı. Ekim alanının üzerine alevde steril edilip havada soğutulmuş bir lamel kapatıldı ve 26°C'de 48-72 saat inkübasyona alındı. İnkübasyon sonunda ışık mikroskobunun x400 büyütmede *Candida* türlerinin oluşturduğu mikromorfolojiler incelendi.

Bazı önemli *Candida* türlerinin mikromorfolojilerini değerlendirilmesinde dikkate alınan kriterler (Tümbay, 1999);

- *C. albicans*: Yalancı ve gerçek hifler, yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler oluşturmuş yuvarlak blastokonidiyumlar ve hif uçlarında türe özgü kalın duvarlı, tek veya birkaç tane klamidospör.
- *C. tropicalis*: Yalancı hif boyunca tek tek veya küçük kümeler oluşturmuş yuvarlağımsı blastokonidiyumlar; bazen yalancı hif uçlarında klamidospora benzer ancak ince duvarlı yuvarlak veya armut şeklinde hücreler.
- *C. guilliermondii*: Az sayıda kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastosporların oluşturduğu kümeler
- *C. parapsilosis*: Yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidiyumlar, arada iri hifler.
- *C. krusei*: Yalancı hifler ve uzun "ağaca benzer" dizilim gösteren blastokonidiyumlar.
- *C. glabrata*: Küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan blastokonidiyumlar. Yalancı hif oluşturmaz.
- *C. kefyr*: Yalancı hifler ve uzun blastokonidiyumlar. Blastokonidiyumlar çoğu kez yalancı hiften ayrılıp birbirine koşut bir dizilim gösterirler.

III.2.3. Kromojenik Besiyeri

MAST ID-CHROMagar Candida (Mast Diagnostics, Merseyside, United Kingdom) kromojenik besiyeri olarak kullanıldı. Besiyeri; 10gr/l pepton, 22 gr/l kromojenik substrat, 0.5 gr/l kloramfenikol ve 15 gr/l agar içermektedir. İçerik 100 ml distile su içinde kaynama derecesinde tamamen çözülünceye kadar karıştırıldı. Çözüldükten sonra 50°C'ye kadar soğutulup steril petrilere döküldü.

Candida'lar agar üzerine öze ile ekildi ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerdeki renk değişimleri izlendi. Yeşil renkli koloniler *C. albicans*, mavi renkli koloniler *C. tropicalis* ve açık pembe renkli koloniler *C. krusei* olarak değerlendirildi.

III.2.4. ID 32C Maya İdentifikasyon Sistemi

ID 32C (bioMerieux sa, Marcy l'Etoile, France) kullanılarak biyokimyasal özelliklerine göre tanımlama yapıldı. ID 32C kitleri, her birinde bir dehidrate karbonhidrat substratı bulunan 32 mikrokuyucuk içerir. Mayalar inoküle edildikleri kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorlarsa besiyerinde üreme gözlenir.

Kültürden bir miktar maya alınarak 2 McFarland bulanıklılığında olacak şekilde Süspansiyon Medium (2 ml distile su) içine karıştırıldı. Bu karışımdan 250 µl alınarak C-Medium içine eklendi. 32 kuyucuklu kitin her kuyucuğuna C-Medium'dan 135'er µl eklendi. 30°C'de 48 saat nemli bir ortamda inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki üreme ATB Expression cihazında okutuldu.

III.3. STANDART ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ

Çalışılan *Candida* türlerinin duyarlılık durumları NCCLS'in M27-A2'de tanımladığı kriterlere göre buyyon mikrodilüsyon testi ile belirlendi (NCCLS, 2002).

Her *Candida* suşu amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için iki kez çalışıldı.

III.3.1. Besiyerinin Hazırlanması

Duyarlılık testi için besiyeri olarak RPMI 1640 (bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) kullanıldı. 800 ml distile suda 10.4 gr toz besiyeri eritildi ve 34.53 gr 0.165 M MOPS [3-(N-morfolino)

propansülfonik asit] (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) eklendi. Karışımın homojenizasyonu sağlandıktan sonra, oda ısısında 1 M NaOH ile besiyerinin pH 7'ye ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml oluncaya kadar distile su eklendikten sonra karışım 0.22 µm'lik filtrelerle steril şişelere süzülerek steril edildi ve kullanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

III.3.2. Antifungal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Antifungal etken madde olarak; amfoterisin B (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), flukonazol (Pfizer İlaçları LTD. ŞTİ., İstanbul, Türkiye) ve vorikonazol (Pfizer İlaçları LTD. ŞTİ., İstanbul, Türkiye) kullanıldı.

Antifungal ilaç miktarı aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı (NCCLS, 2002).

Formül 1. Antifungal ilaç miktarını hesaplama formül

$$Ağırlık (mg) = [Hacim (ml) \times Konsantrasyon (\mu g/ml)] / Potens (\mu g/mg)$$

III.3.2.1. Amfoterisin B

Potensi %80 (800 µg/mg) olan toz halindeki amfoterisin B'den 16 mg tartılarak 10 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Sonuç olarak konsantrasyonu 1280 µg/ml olan stok elde edildi. Steril ependorflara 1'er ml koyuldu ve ışıktan korunacak şekilde kaplandı. Kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

III.3.2.2. Flukonazol

Potensi %100 (1000 µg/mg) olan toz halindeki flukonazol'den 25.6 mg tartılarak 20 ml distile su içinde çözüldü. Sonuç olarak konsantrasyonu 1280 µg/ml olan stok elde edildi. Steril ependorflara 1'er ml koyuldu. Kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

III.3.2.3. Vorikonazol

Potensi %99,2 (992µg/mg) olan toz halindeki vorikonazol'den 25.8 mg tartılarak 20 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Sonuç olarak konsantrasyonu 1280 µg/ml olan stok elde edildi. Steril ependorflara 1'er ml koyuldu. Kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

III.3.3. Mikroplağın hazırlanması

U tabanlı, 96 kuyucuklu, steril mikroplağın her yatay sırasına, ilk kuyucuğu boş bırakıp 11. kuyucuğu kadar üreme kontrolü olarak 50 µl RPMI ve 12. kuyucuğa besiyeri sterilite kontrolü olarak 100 µl RPMI koyuldu.

Çalışmaya başlamadan önce -80°C'den çıkarılarak erimesi sağlanan ilaç stok solüsyonları RPMI ile sulandırılarak 2xfinal konsantrasyonları hazırlandı. Amfoterisin B stok solüsyonundan; 8-0.015 µg/ml son konsantrasyonları olması için 16-0.03 µg/ml, flukonazol stok solüsyonundan; 64-0.125 µg/ml son konsantrasyonları olması için 128-0.25 µg/ml, vorikonazol stok solüsyonundan; 8-0.015 µg/ml son konsantrasyonları olması için 16-0.03 µg/ml olacak şekilde çift kat dilüsyonlar hazırlandı. Bunun için, boş bırakılan her sıranın 1. kuyucuklarına 2xfinal konsantrasyonlu antifungallerden 100 µl eklendi. Birinci kuyucuktaki 2xfinal konsantrasyonlu antifungallerden 50 µl alınarak 10. kuyucuğa kadar otomatik pipetle dilüsyon yapıldı. Bu sayede ilaç konsantrasyonunun 1. kuyucukta en yüksek, 10. kuyucukta en düşük olması sağlandı.

İnokülumlar hemen eklenmeyecekse mikroplaklar alüminyum folyoya sarılarak -80°C'de saklandı.

III.3.4. İnokülasyon işlemi

Stok *Candida* kökenlerinin SDA'da 24 saatlik inkübasyonları sonucu elde edilen saf kolonilerden alınarak 2 ml steril serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığında ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyon vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra 0.25 ml alınarak 4.75 ml RPMI içine koyuldu. Bu sayede 1/20 dilüsyon sağlanmış oldu. Bu süspansiyonda vortekslenerek homojenize edildikten sonra 0.1 ml alınarak 4.9 ml RPMI içine koyuldu. Bu sayede de 1/50 dilüsyon sağlandı. Toplamda $1/20 \times 1/50 = 1/1000$ sulandırılmış oldu.

Mikroplak kuyucuklarında 2xfinal konsantrasyonda bulunan 50 µl antifungal solüsyonu üzerine, mikroplak hazırlanırken 100 µl RPMI koyulan 12. kuyucuklar hariç tüm kuyucuklara 1/1000 oranında sulandırılmış maya süspansiyonundan 50'şer µl otomatik pipetle dağıtıldı. Bu sayede ilaç konsantrasyonu final değere ulaştı. Maya süspansiyonunun toplam sulandırımında $1/1000 \times 1/2 = 1/2000$ olmuş oldu ($0.5-2.5 \times 10^3$ hücre/ml).

Mikroplaklar alüminyum folyoya sarılarak 35°C'de 48 saat inkübe edildi.

III.3.5. MİK Değerlerinin Saptanması

Ayna yardımıyla bulanıklık dereceleri değerlendirilmeden önce, kuyucuklardaki bulanıklığın homojen hale gelmesi için iyice karıştırıldı. MİK değerlerini saptamada amfoterisin B için 0, azoller için +2 olan en düşük konsantrasyon olarak kabul edildi.

Tablo 7. Referans mikrodilüsyon yönteminde MİK değerlerini görsel okumak için kullanılan skorlar

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

Amfoterisin B ve vorikonazol için NCCLS tarafından direnç sınır değerleri belirlenmediğinden suşların bu iki antifungalle olan sonuçları duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilmedi. Flukonazol Tablo 4'de verilen direnç sınır değerleri göz önüne alınarak tanımlandı.

III.4. RESAZURİN MİKROPLAK YÖNTEMİYLE ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ

Bu yöntemde besiyeri hazırlanması, antifungal stok solüsyonlarının hazırlanması, mikroplağın hazırlanması ve inokülasyon işlemi standart antifungal duyarlılık testi ile aynıdır. Standart yöntemden farklı olarak *C. albicans* için 11, non-albicans *Candida*'lar için 17 saatlik inkübasyondan sonra her kuyucuğa %0.01'lik 20 µl resazurin (Sigma) eklenir. Resazurinin eklendiği bütün kuyucuklar mavi renk alırlar. Bu işlemin ardından mikroplaklar tekrar 35°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra *C. albicans* için 12.saatte , non-albicans *Candida*'lar için ise 18. saatte sonuçlar değerlendirildi.

Her *Candida* suşu amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için iki kez çalışıldı.

III.4.1. Resazurin Mikroplak Yönteminde MİK Değerlerinin Saptanması

Üremenin olduğu kuyucuklardaki mavi rengin pembeye dönüşümü değerlendirilerek MİK değerleri saptandı. MİK değerlerini saptamada amfoterisin B için 0, azoller için +2 olan en düşük konsantrasyon kabul edildi.

Resazurin mikrodilüsyon yönteminde MİK değerlerini görsel okumak için kullanılan skorlar Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Resazurin mikroplak yönteminde MİK değerlerini görsel okumak için kullanılan skorlar

Skorlar	Skorların Anlamı
+4	Üreme kontrol kuyucuğu ile eşit pembelikte
+3	Üreme kontrol kuyucuğundaki pembeliğin %75'i kadar pembe
+2	Üreme kontrol kuyucuğundaki pembeliğin %50'si kadar pembe
+1	Üreme kontrol kuyucuğundaki pembeliğin %25'i kadar pembe
0	Pembelik yok (Mavi renk)

III.5. VERİ ANALİZİ

Veri analizi, ADT (Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri) için ABD FDA dökümanına göre yapılmıştır. Buna göre ADT'nde, Esansiyel uyum (EU), kategorik uyum (KU), çok büyük hata (ÇBH), büyük hata (BH) ve küçük hata (KH) aşağıdaki formüller ve tanımlamalar kullanılarak hesaplanmıştır (Guidance for Industry and FDA, 2003).

Tekrarlanabilirlik: Yeni yöntemin, aynı sonuçları, farklı test koşullarında, verip vermediğinin ölçülmesidir. Sonuçlar, farklı test koşullarında +/- 1 dilüsyon içinde olmalıdır.

KU: Değerlendirilen yeni yöntem ve NCCLS referans metodunun duyarlı, orta duyarlı, dirençli kategorik sonuçları arasında, uyum olmasıdır.

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

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

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

Hata: Değerlendirilen yeni yöntem sonuçları ile, NCCLS referans metod sonuçlarının uyumsuz olmasıdır. Yeni yöntemle saptanan MİK'le, referans metodla saptanan MİK arasında, +/- 1 dilüsyondan daha fazla fark varsa ve/veya kategorik sonuçları farklıysa hatadan bahsedilebilir.

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

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

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

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

ÇBH: NCCLS referans kategori sonucu dirençli ve yeni yöntem sonucu duyarlıysa çok büyük hatadır.

Kategorik uyuma dayalı çok büyük hatalar

$$\text{ÇBH} = \frac{\text{Referans metodla dirençli bulunan organizma sayısı}}{\text{Referans metodla dirençli bulunan organizma sayısı}} \times 100$$

Referans metodla dirençli bulunan organizma sayısı

BÖLÜM IV

BULGULAR

Çalışmada kullanılan kan kültürlerinden izole edilmiş 58 *Candida* suşunun germ tüp testi, pirinç ekstresi-Tween 80 agar ve gerekli olduğu yerlerde ticari kitler ile desteklenerek (kromojenik besiyeri ve ID 32 C maya identifikasyon sistemi) tür tayini yapılması sonucu 47 (%81)'si *C. albicans*, 11 (%19)'i non-*albicans Candida* olarak tanımlandı. Türlerin dağılımı Tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9. *Candida*'ların dağılımı ve yüzdeleri

Tür	Sayı	%
<i>C. albicans</i>	47	81
<i>C. guilliermondii</i>	7	12
<i>C. glabrata</i>	2	3.5
<i>C. tropicalis</i>	2	3.5

C. albicans suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 3'ünde 0.125 µg/ml, 9'unda 0.25 µg/ml, 23'ünde 0.5 µg/ml, 12'sinde 1 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının resazurin mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 3'ünde 0.06 µg/ml, 5'inde 0.125 µg/ml, 14'ünde 0.25 µg/ml, 20'sinde 0.5 µg/ml, 5'inde 1 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 6'sında ≤0.125 µg/ml, 31'inde 0.25 µg/ml, 10'unda 0.5 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının resazurin mikropalak yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 7'sinde ≤0.125 µg/ml, 31'inde 0.25 µg/ml, 8'inde 0.5 µg/ml, 1'inde 1 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 47'sinde de ≤0.015 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının resazurin mikropalak yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 47'sinde de ≤ 0.015 µg/ml olarak saptandı.

C. albicans suşlarının referans mikrodilüsyon ve resazurin mikropalak yöntemleriyle saptanan amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri Tablo 10'da toplu olarak verilmiştir.

Non-*albicans Candida* suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 8'i 0.5 µg/ml, 3'ü 1 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının resazurin mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 10'unda 0.5 µg/ml, 1'inde 1 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 2'sinde 0.5 µg/ml, 7'sinde 1 µg/ml, 1'inde 2 µg/ml, 1'inde 8 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının resazurin mikropalak yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 8'inde 0.5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, 1'inde 4 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 4'ünde ≤ 0.015 µg/ml, 4'ünde 0.03 µg/ml, 2'sinde 0.06 µg/ml, 1'inde 4 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının resazurin mikropalak yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 8'inde ≤ 0.015 µg/ml, 1'inde 0.03 µg/ml, 1'inde 0.06 µg/ml, 1'inde 4 µg/ml olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının MİK dağılımı tür düzeyinde değerlendirildiğinde karşılaşılan sonuçlar aşağıdaki gibidir.

C. guilliermondii suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 6'sı 0.5 µg/ml, 1'i 1 µg/ml olarak saptandı.

C. guilliermondii suşlarının resazurin mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 7'si de 0.5 µg/ml olarak saptandı.

C. guilliermondii suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 1'i 0.5 µg/ml, 5'i 1 µg/ml, 1'i 2 µg/ml olarak saptandı.

C. guilliermondii suşlarının resazurin mikropalak yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 6'sı 0.5 µg/ml, 1'i 1 µg/ml olarak saptandı.

C. guilliermondii suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 2'si ≤ 0.015 µg/ml, 4'ü 0.03 µg/ml, 1'i 0.06 µg/ml olarak saptandı.

C. guilliermondii suşlarının resazurin mikropalak yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 6'sı ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 0.03 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'i 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının resazurin mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'i 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 8 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının resazurin mikropalak yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 1'i ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. glabrata suşlarının resazurin mikropalak yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 1'i ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 1'i 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının resazurin mikropalak yönteminde amfoterisin B için MİK değerleri; 2'si de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 1'i 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının resazurin mikropalak yönteminde flukonazol için MİK değerleri; 2'si de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının referans mikrodilüsyon yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 1'i ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 0.06 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

C. tropicalis suşlarının resazurin mikropalak yönteminde vorikonazol için MİK değerleri; 1'i ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$, 1'i 0.06 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

Non-*albicans Candida* suşlarının referans mikrodilüsyon ve resazurin mikropalak yöntemleriyle saptanan amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri Tablo 11'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 10. *C. albicans* suşlarının referans mikrodilüsyon ve resazurin mikroplak yöntemleriyle saptanan amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri

Köken No	Amfoterisin B		Flukonazol		Vorikonazol	
	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak
1	0.5	0.5	≤0.125	≤0.125	≤0.015	≤0.015
2	0.5	0.5	0.5	0.25	≤0.015	≤0.015
3	0.5	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
4	0.5	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
5	0.5	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
6	0.5	0.125	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
7	0.5	0.25	0.25	≤0.125	≤0.015	≤0.015
8	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
9	1	1	≤0.125	0.5	≤0.015	≤0.015
10	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
11	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
12	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
13	0.5	0.5	≤0.125	≤0.125	≤0.015	≤0.015
14	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
15	1	1	≤0.125	≤0.125	≤0.015	≤0.015
16	1	1	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
17	0.5	0.5	0.25	0.5	≤0.015	≤0.015
18	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
19	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
20	0.5	0.5	0.5	0.25	≤0.015	≤0.015
21	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
22	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
23	1	1	0.25	≤0.125	≤0.015	≤0.015
24	0.5	0.125	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015
25	0.125	0.125	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
26	0.25	0.125	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015

Tablo 10 devam. *C. albicans* suşlarının referans mikrodilüsyon ve resazurin mikroplak yöntemleriyle saptanan amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri

27	0.5	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
28	0.25	0.25	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015
29	0.25	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
30	0.5	0.5	0.5	0.25	≤0.015	≤0.015
31	1	1	0.5	0.25	≤0.015	≤0.015
32	0.25	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
33	0.25	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
34	0.25	0.125	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
35	0.25	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
36	0.125	0.06	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
37	0.125	0.06	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
38	0.25	0.06	≤0.125	≤0.125	≤0.015	≤0.015
39	0.25	0.25	≤0.125	≤0.125	≤0.015	≤0.015
40	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
41	0.5	0.5	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015
42	0.5	0.5	0.5	1	≤0.015	≤0.015
43	0.5	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
44	0.5	0.25	0.25	0.5	≤0.015	≤0.015
45	0.5	0.25	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015
46	1	0.25	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015
47	1	0.5	0.25	0.25	≤0.015	≤0.015

Tablo 11. Non-*albicans Candida* suşlarının referans mikrodilüsyon ve resazurin mikroplak yöntemleriyle saptanan amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri

Köken No	Amfoterisin B		Flukonazol		Vorikonazol	
	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak	Referans Mikrodilüsyon	Resazurin Mikroplak
48*	1	0.5	0.5	0.5	0.03	≤0.015
49*	0.5	0.5	1	0.5	≤0.015	≤0.015
50*	0.5	0.5	1	0.5	0.03	0.03
51*	0.5	0.5	1	0.5	≤0.015	≤0.015
52*	0.5	0.5	2	1	0.06	≤0.015
53*	0.5	0.5	1	0.5	0.03	≤0.015
54*	0.5	0.5	1	0.5	0.03	≤0.015
55**	1	1	8	4	4	4
56**	0.5	0.5	1	1	≤0.015	≤0.015
57***	1	0.5	1	0.5	0.06	0.06
58***	1	1	0.5	0.5	≤0.015	≤0.015

*: *C.guilliermondii*, **: *C. glabrata*, ***: *C. tropicalis*

Tablo 12. *Candida* türlerinin antifungaller için her iki yöntemde MİK 50 ve MİK 90 değerleri

		Referans mikrodilüsyon		Resazurin mikroplak	
		MİK 50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)	MİK 50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	Amfoterisin B	0,5	1	0,5	0,5
	Flukonazol	0,25	0,5	0,25	0,5
	Vorikonazol	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015
Non- <i>albicans Candida</i>	Amfoterisin B	0,5	1	0,5	0,5
	Flukonazol	1	2	0,5	1
	Vorikonazol	0,03	0,06	≤0,015	0,06

Tablo 13. Hata ve uyum oranları

		Hata Oranı (%)			Uyum Oranı (%)	
		KH	BH	ÇBH	KU	EU
<i>C. albicans</i>	Amfoterisin B	-	-	-	55,3	91,5
	Flukonazol	0	0	0	78,7	97,8
	Vorikonazol	-	-	-	100	100
Non- <i>albicans</i> <i>Candida</i>	Amfoterisin B	-	-	-	81,8	100
	Flukonazol	0	0	0	27,3	100
	Vorikonazol	-	-	-	63,6	90,9

KH: Küçük hata, BH: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata, KU: Kategorik uyum, EU: Esansiyel uyum

Tablo 14. Resazurin mikropalak ve standart yöntemden elde edilen MİK sonuçlarının uyum oranı

		-4 (%)	-3 (%)	-2 (%)	-1 (%)	0 (%)	+1 (%)	+2 (%)	+3 (%)	+4 (%)
<i>C. albicans</i> (47)	Amfoterisin B	-	-	4 (8,5)	17 (36,2)	26 (55,3)	-	-	-	-
	Flukonazol	-	-	-	6 (12,8)	37 (78,7)	3 (6,4)	1 (2,1)	-	-
	Vorikonazol	-	-	-	-	47 (100)	-	-	-	-
Non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> (11)	Amfoterisin B	-	-	-	2 (18,2)	9 (81,8)	-	-	-	-
	Flukonazol	-	-	-	8 (72,7)	3 (27,3)	-	-	-	-
	Vorikonazol	-	-	1 (9,1)	3 (27,3)	7 (63,6)	-	-	-	-

-4: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 4 kat düşük

-3: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 3 kat düşük

-2: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 2 kat düşük

-1: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 1 kat düşük

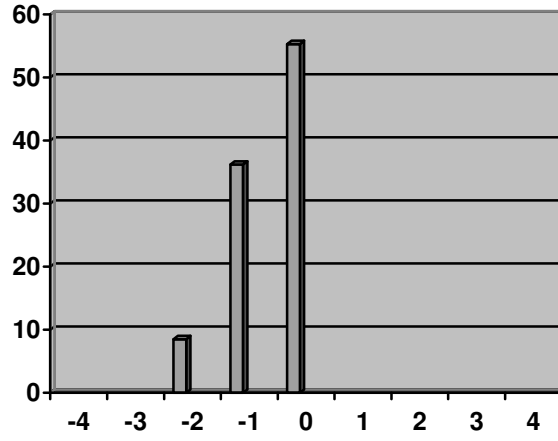
0: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucuyla aynı

1: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 1 kat yüksek

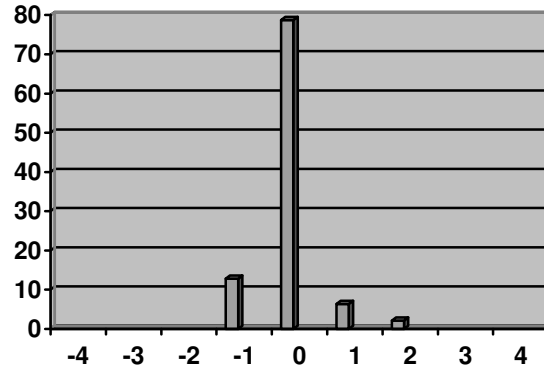
2: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 2 kat yüksek

3: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 3 kat yüksek

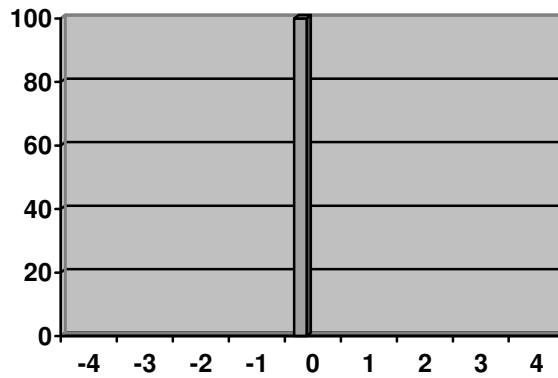
4: Resazurin mikropalak yöntemi sonucu standart yöntem sonucundan 4 kat yüksek



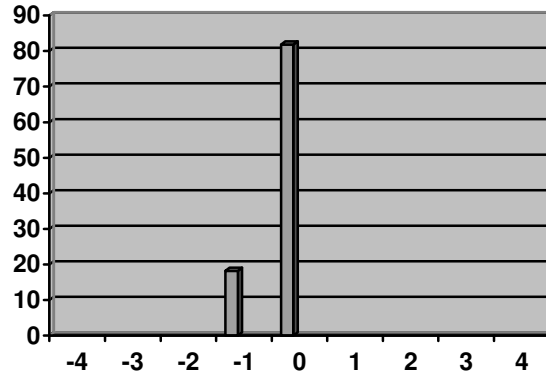
Şekil 2. *C. albicans* suşlarında amfoterisin B için iki yöntemin uyum yüzdeleri



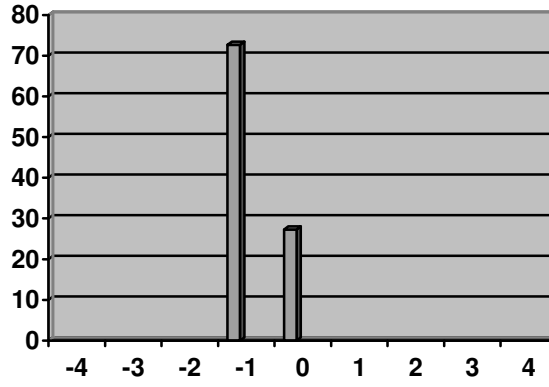
Şekil 3. *C. albicans* suşlarında flukonazol için iki yöntemin uyum yüzdeleri



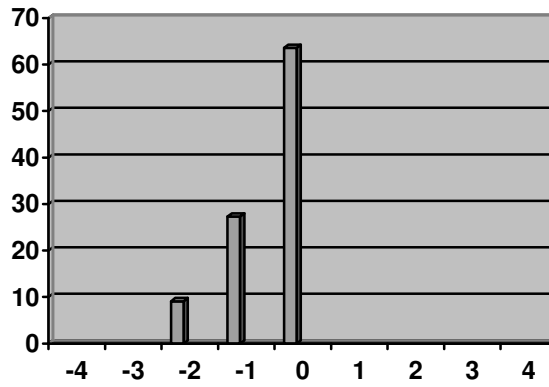
Şekil 4. *C. albicans* suşlarında vorikonazol için iki yöntemin uyum yüzdeleri



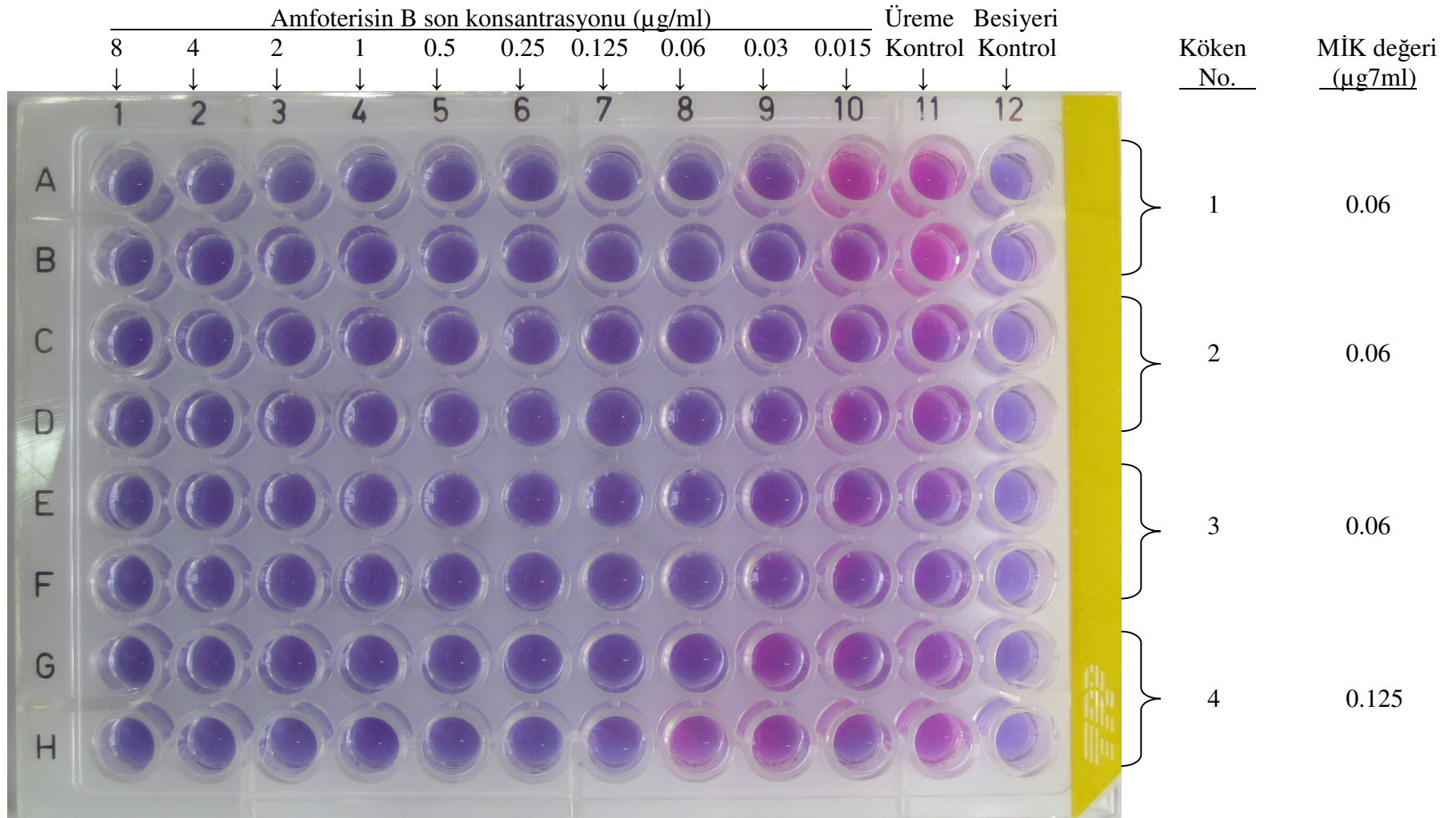
Şekil 5. Non-albicans *Candida* suşlarında amfoterisin B için iki yöntemin uyum yüzdeleri



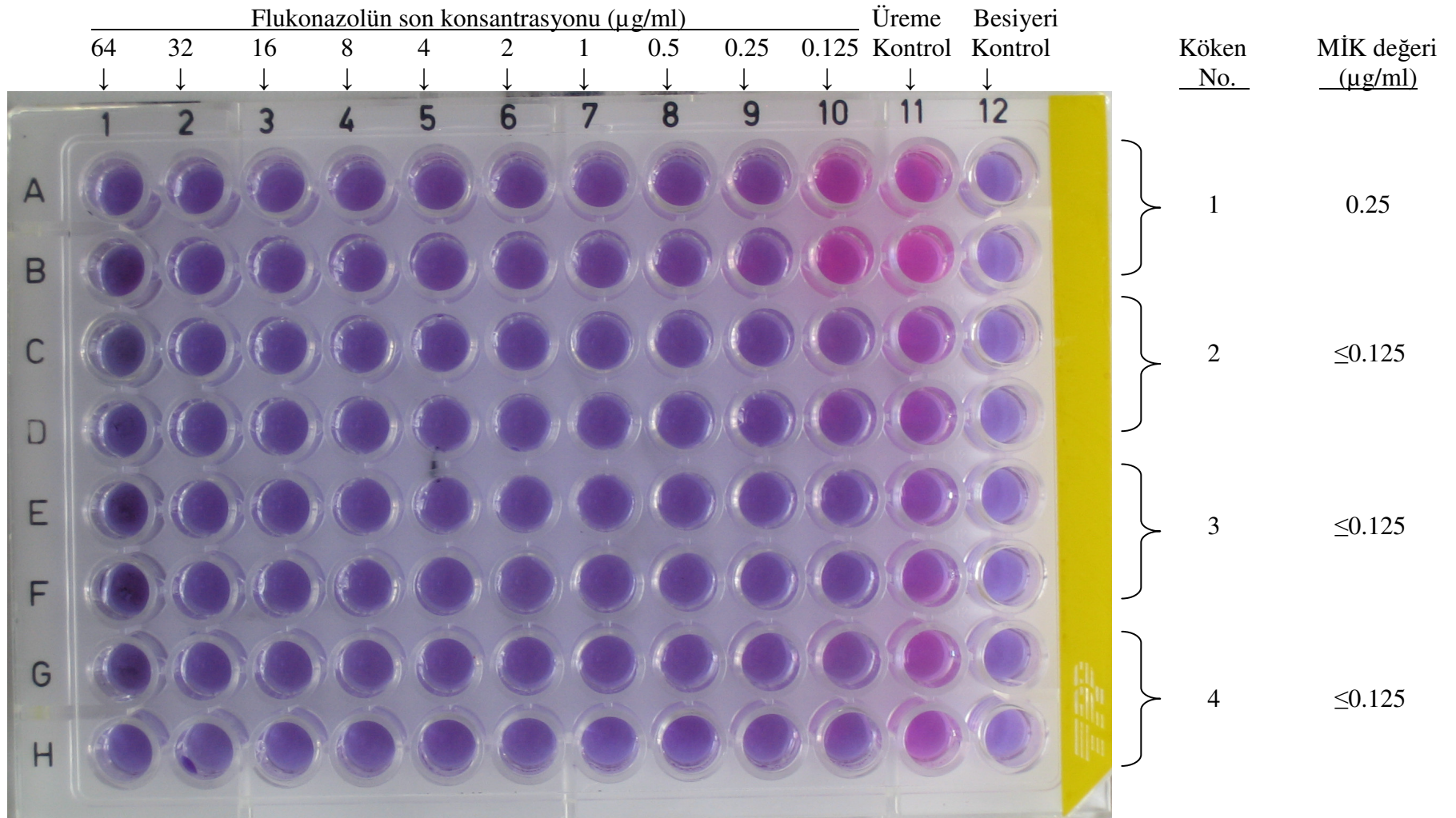
Şekil 6. Non-albicans *Candida* suşlarında flukonazol için iki yöntemin uyum yüzdeleri



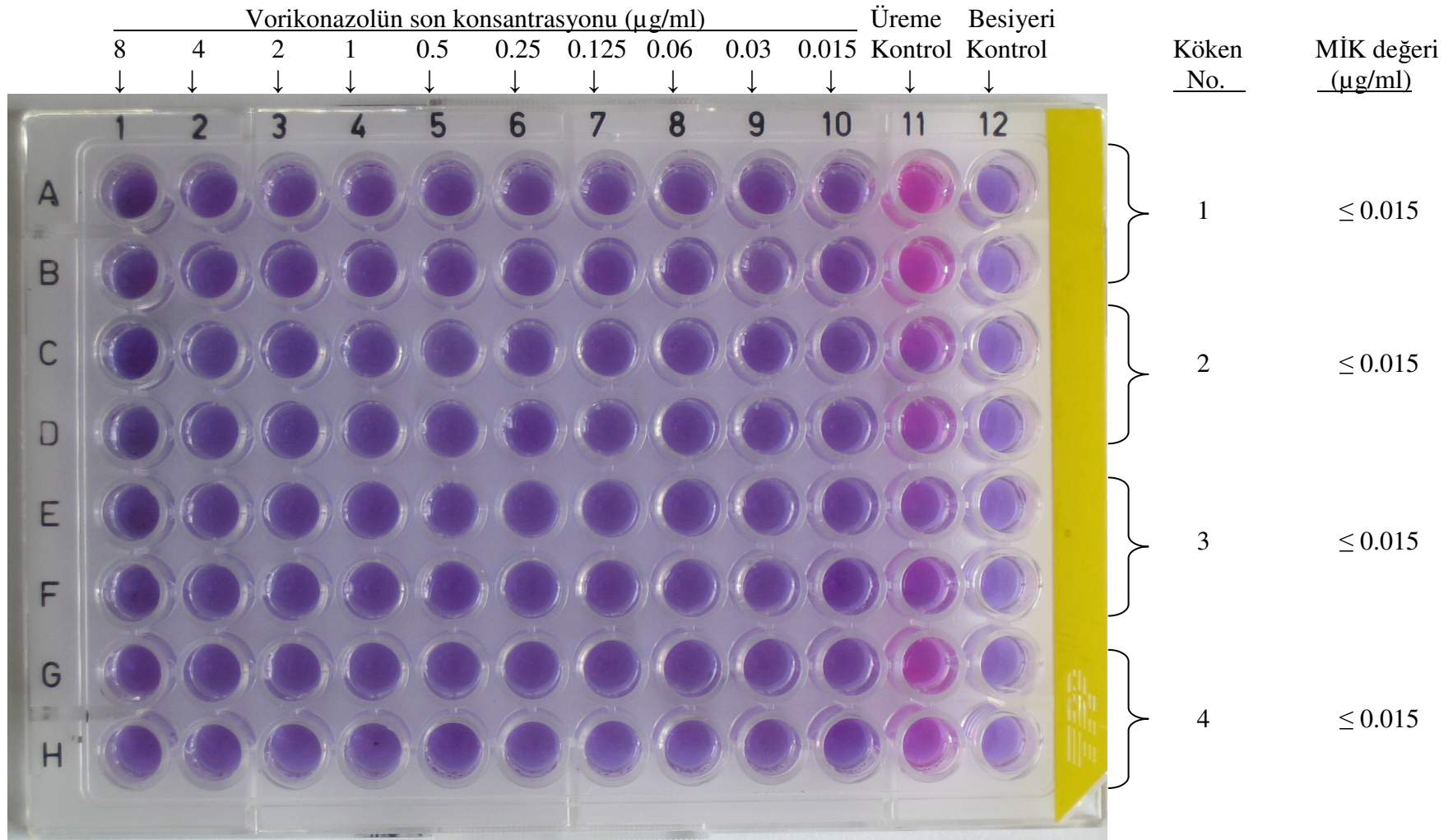
Şekil 7. Non-albicans *Candida* suşlarında vorikonazol için iki yöntemin uyum yüzdeleri



Şekil 8. Resazurin mikrolak yönteminde 4 *C. albicans* suşunun amfoterisin B'ye *in vitro* duyarlılık deneyi örneği



Şekil 9. Resazurin mikroplak yönteminde 4 *C. albicans* suşunun flukonazol'e *in vitro* duyarlılık deneyi örneği



Şekil 10. Resazurin mikroplak yönteminde 4 *C. albicans* suşunun vorikonazol'e *in vitro* duyarlılık deneyi örneği

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Önceleri saprofit olarak tanımlanan fırsatçı mantarlar; geniş spektrumlu antibiyotiklerin bilinçsizce ve uzun süreli kullanımı, yoğun sitotoksik kemoterapi ve uzun süreli kortikosteroid tedavisi sonrası, kemik iliği ve organ transplantasyonları, kateter uygulamaları protez cihazların tatbiki, yaşam destekleyici gelişmiş tedavi yöntemleri, intravenöz ilaç kullanımı ve AIDS gibi immün sistem yetmezliğine yol açan hastalıklarda riskli konuma geçerler (Fridkin ve Jarvis, 1996; Koneman ve ark. 1997).

Kandidemi, 1970'lere kadar genellikle, tedavisi gerekmeyen geçici bir durum olarak düşünülmüştür. Nötropenik hastalarda rutin kandidemi tedavisi, 1970'lerin ortalarından sonra başlamıştır (Young ve ark., 1974). Bu infeksiyonun, tedavi edilmediği takdirde, nötropenik olmayan hastalarda dahi kötü sonuçlara neden olabileceği, yaygın infeksiyonun bir işareti olduğu ve endokardit, endoftalmit, artirit, osteomyelit gibi komplikasyonlara neden olabileceği kabul edilmiştir (Jarvis ve Martone, 1992; Emori ve Gaynes, 1993).

Sosyoekonomik düzeyin yükselmesi ile yüzeysel enfeksiyonlarda (pamukçuk, pişik, gibi) azalma görülürken, modern tıptaki ilerlemeye paralel olarak mortal seyreden ciddi derin infeksiyonların sayısı yükselmektedir. Günümüzde hematolojik maligniteli ve transplantasyon geçirmiş hastaların; dahili, cerrahi ve pediatrik yoğun bakımlar ve yanık ünitelerindeki hastaların yaşam süreleri, gelişmiş tedavi protokolleri nedeniyle uzamış ve dolayısıyla bu hastalarda mantar infeksiyonu görülme olasılığı artmıştır (Ener, 1999b; Ener, 2003).

Candida infeksiyonları, hastanede kalış süresini uzatarak ekonomik ve iş gücü kaybına da neden olmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada Olaecha ve arkadaşları, *Candida*'ların kolonizasyon ve infeksiyonlarını özellikle yoğun bakım ünitesindeki hastalardaki önemini ekonomik açıdan değerlendirmişlerdir. Buna göre; *Candida* kolonizasyonu sonrasında yoğun bakımda kalma sürelerinin ortalama 6,2 gün, hastanede kalma sürelerinin 8,6 gün; *Candida* infeksiyonu bulunan hastalarda da bu sürelerin sırasıyla 12,7 ve 15,5 uzadığını tespit etmişlerdir. Bunların sonucunda hastaya

Candida kolonizasyonu sonrası 8,000 EUR, *Candida* infeksiyonu sonrasında da 16,000 EUR ek masraf oluştuğunu saptamışlardır (Olaechea ve ark., 2004).

Nozokomiyal fungemilerin sıklığı son yıllarda belirgin bir artış göstermiştir. Beck-Sague ve arkadaşlarının NNIS verileriyle 1980-1990 arasını kapsayan 115 hastanenin katıldığı çalışmalarında, nozokomiyal fungal infeksiyonları sıklığının 11 yıl içinde 1000 hastada 2,0'dan 3,8 infeksiyon sıklığına yükseldiğini saptamışlardır. Beck-Sague'ye göre en önemli risk faktörleri; santral venöz kateter varlığı, total parenteral beslenme uygulanması ve yoğun bakım ünitesinde yatmadır (Beck-Sague ve Jarvis, 1993).

Kan ile yayılan ve hastane infeksiyonuna neden olan mikroorganizmalar içinde *Candida*'ların dördüncü sıraya yerleştiği bildirilmektedir (Jarvis ve Martone, 1991).

ABD'de NNIS verilerine göre 1980'li yıllarda hastane infeksiyonları içinde *Candida* türlerinin oranı %2, 1986-1999 yılları arasında %5, 1990-1992 yılları arasında %9.9 olarak rapor edilmiştir. Fungal hastane infeksiyonları içinde *Candida*'ların oranı %70-85 arasında değişmektedir (Fridkin ve Jarvis, 1996; Ural, 2004).

Nozokomiyal kandidoz etkeni olarak en sık görülen tür *C. albicans*'dır. Dünya verilerine baktığımız zaman, NNIS hastanelerinde 1980-1990 yılları arasındaki 24222 *Candida* infeksiyonunun %76'sı *C. albicans* ile oluşmuştur. Son bulgulara göre de ABD'de *C. albicans* halen bütün kandidemilerde lider patojen olarak devam etmektedir. Ancak sıklık yüzdesinde düşüş vardır. Buna karşın non-*albicans Candida* türlerinde artış görülmektedir (Lunel ve ark., 1999).

Edmond ve arkadaşları ABD'de 934 kandidemiye değerlendirdiklerinde, %46.8 *C. albicans* tespit etmişlerdir. Non-*albicans Candida* türlerini %42.3 *C. glabrata*, %26.1 *C. tropicalis*, %21.1 *C. parapsilosis* olarak saptamışlardır (Edmond ve ark. 1999).

Ülkemizde yapılan benzer çalışmalarda da *C. albicans* ilk sırada izole edilen tür olmuştur. Alibey ve arkadaşları, çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri mayaların türlerine göre dağılımlarını araştırdıklarında %72'lik bir oranla *C. albicans*'ı ilk sırada saptamışlardır (Alibey ve Direkel, 1999).

Güleç ve arkadaşlarının 1997-1998 yıllarında laboratuvara gönderile değişik klinik örneklerden izole ettikleri mayaların identifikasyonu sonucu *C. albicans* %70.8'lik bir oranla ilk sırada yer aldığı bulmuşlardır. Diğer maya türleri; *C. glabrata*

%10, *C. kefir* %5.8, *C. parapsilosis* %3.3, *C. famata* %2.5 olarak belirlemişlerdir (Güleç ve ark., 1999).

Coşkun ve arkadaşlarının onkoloji hastalarının orofaringeal örneklerinde *Candida* kolonizasyonunu ve tür dağılımını göstermek için yaptıkları çalışmada da *C. albicans* %71.8 gibi bir oranla ilk sırada yer almıştır. Bunu %15.6 ile *C. sake*, %6.2 ile *C. tropicalis*, %3.1 ile *C. kefir*, %3.1 ile *C. dubliniensis* takip etmektedir (Coşkun ve ark., 2003).

Bizim çalışmamızda kullandığımız kan kültürlerinden izole edilen 58 *Candida* suşunu tanımladığımızda diğer çalışmalarla uyumlu olarak %81 oranla birinci sırada *C. albicans* saptanmıştır. Diğer suşlarımız %12 *C. guilliermondii*, %3.5 *C. glabrata*, %3.5 *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar Tablo 9'da toplu olarak verilmiştir.

Fungal infeksiyonlarının oranının artması ve tedavi seçeneklerinin genişlemiş olmasına karşın antifungal ajanların yaygın kullanımı ile bir veya bir kaç ajana dirençli fungal patojenlerin ortaya çıkması antifungal duyarlılık testlerinin önemini artırmıştır. Antibakteriyel ilaçlar için birçok güvenilir yöntemler geliştirilmiş olup bunlar rutin laboratuvarlarda uygulanarak hasta tedavisinde yol gösterici olarak yerlerini bulmuşlardır. Ancak antifungal ilaçların etkinliğini ölçmede ve antifungal sağaltımda durum biraz daha karmaşık ve bilgilerimiz daha azdır (Ener, 1999; Kuştimur, 1999).

NCCLS'in bu konudaki yoğun çalışmaları belli bir standardın oluşmasını sağlamış ve 1992'de belirlenen ilk standart yöntem geliştirilerek en son 2002'de M27-A2 içinde yayımlanmıştır (NCCLS, 2002).

Cuenca-Estrella ve arkadaşları, İspanya ve Arjantin'den edindikleri suşların amfoterisin B için MİK 50 ve MİK 90 değerlerini tespit etmişlerdir. İspanya suşlarının MİK 50 değerini 0,5 µg/ml, MİK 90 değeri 1µg/ml, Arjantin suşlarının MİK 50 değerini 0,5 µg/ml, MİK 90 değeri 0,5 µg/ml olarak bulmuşlardır (Cuenca-Estrella ve ark, 2002).

Diekema ve arkadaşları 1998-2001 yılları arasında topladıkları *Candida* suşlarından *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*'lerde MİK 50'yi ve MİK 90'ı 1 µg/ml, *C. parapsilosis*'de MİK 50'yi 1 µg/ml MİK 90'ı 2 µg/ml olarak saptamışlardır (Diekema ve ark., 2002).

Godoy ve arkadaşları Latin Amerika hastanelerinde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının MİK değerlerini araştırmışlar ve *C. albicans* ve *C.*

glabrata'da MİK 50'yi ve MİK 90'ı 0,5 µg/ml, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'lerde MİK 50'yi 0,5 µg/ml MİK 90'ı 1µg/ml olarak tespit etmişlerdir (Godoy ve ark., 2003).

Özkan ve arkadaşlarının çocuk hastalardan izole ettikleri *Candida* suşlarının antifungal duyarlılıklarını çalıştıklarında amfoterisin B için MİK 90 değerini ≤50 µg/ml olarak belirlemişlerdir (Özkan ve ark., 2004).

Çalışmamızda *C. albicans* suşları için amfoterisin B MİK 50 değerleri her iki yöntemde de 0.5 µg/ml, MİK 90 değerleri referans mikrodilüsyon yönteminde 1µg/ml, resazurin mikroplak metoduyla 0.5 µg/ml olarak tesbit edildi. Non-*albicans Candida*'lar için amfoterisin B MİK 50 değerleri her iki yöntemde de 0.5 µg/ml, MİK 90 değerleri referans mikrodilüsyon yönteminde 1µg/ml, resazurin mikroplak metoduyla 0.5 µg/ml olarak bulundu (Tablo 12).

Keçeli ve arkadaşlarının vulvovajinal kandidoz olgularından izole ettikleri mayalara bazı antifungallere duyarlılıklarını çalıştıklarında flukonazol için MİK 50 0.25 µg/ml, MİK 90 değeri 4 µg/ml olarak bulmuşlardır (Keçeli ve ark., 2003).

Göller ve arkadaşları sistemik infeksiyonlardan izole ettikleri çeşitli *Candida*'ların antifungal duyarlılıklarını çalışmışlar ve flukonazol için *C. albicans*'ın MİK 50 değerini 1 µg/ml olarak saptamışlardır (Göller ve ark., 2001).

Bizim çalışmamızda flukonazol için *C. albicans* için MİK 50 ve MİK 90 değerleri her iki yöntemde de aynı olup, bu değerler sırasıyla 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml olarak bulunmuştur. Non-*albicans Candida*'lar için resazurin mikroplak yöntemiyle bulunan MİK 50 ve MİK 90 değerleri referans mikrodilüsyon yönteminin MİK 50 ve MİK 90 değerlerine göre bir kat düşük çıkmakla beraber sonuçların genel anlamda uyumlu olduğu söylenebilir (Tablo 12).

Çalışmamızda vorikonazol için *C. albicans* için her iki yöntemle de MİK 50 ve MİK 90 değerleri ≤0.015 µg/ml olarak tesbit edilmiştir. Non-*albicans Candida*'lar için MİK 90 değerleri her iki yöntemde de 0.06 µg/ml saptanmıştı. MİK 50 değerleri resazurin mikroplak yönteminde standart yöntemle göre bir kat düşük çıkmıştır ve referans mikrodilüsyon 0.03 µg/ml, resazurin mikroplak ≤0.015 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo 12).

Bir referans yöntem geliştirilmesi laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanması için gerekli olmasına karşın bu yöntem tüm fungal izolatların test edilebilmesi için en uygunu olmayabilir. Bu nedenle, rutin laboratuvarlarda daha kolay

uygulanabilecek alternatif yöntem arayışları sürmektedir. Kolorimetrik yöntemler bunlardan biridir (Espinel-Ingroff ve Pfaller, 1995).

Kolorimetrik oksidasyon-redüksiyon indikatörü olan alamar mavisinin kullanılması ile MİK değerinin daha kolay belirlenebildiği görülmüştür. Ayıracı normalde mavi renkli olup, üreme varlığında pembeye dönüşmektedir. Mikrodilüsyon testinde pembe renge değişme göstermeyen ilk mavi kuyucuk MİK değerini vermektedir (Kuştımur, 1999). Bir diğer kolorimetrik yöntemde MTT yöntemidir. Sarı renkli MTT boyası hücresel dehidrogenazlar tarafından indirgenerek mor renkli formozona dönüştürülürler. Formazan kristalleri eritildikten sonra oluşan renk yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılı olmaktadır. 24 ve 48 saat inkübasyonlar sonunda ortama MTT eklenerek oluşan renk 550 nm dalga boyunda değerlendirilir (Gülay ve Yuluğ, 1995).

Kauffman ve arkadaşları alamar mavisini kolorimetrik indikatör olarak kullandıkları mikrodilüsyon testi ile NCCLS makrodilüsyon broth testini karşılaştırmışlardır. *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'ye karşı vorikonazol, flukonazol ve itrokonazol kullanmışlardır. İki metod arasındaki uyum vorikonazol için %98,3; flukonazol için %94,3 ve itrokonazol için %95,4 olarak bulunmuştur (Kauffman ve Zaris, 1999).

Tiballi ve arkadaşları NCCLS'in önerdiği broth makrodilüsyon metodunu, alamar ayırıcı ile modifiye edilen makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. Flukonazol için alamar ayırıcı ile modifiye edilen makrodilüsyon metodu standart yöntemle %94 uyumlu, alamar ayırıcı ile modifiye edilen mikrodilüsyon yöntemi %95 uyumlu bulunmuştur (Tiballi ve ark., 1995a).

Espinel-Ingroff ve arkadaşları YeastOne Kolorimetrik Antifungal Panel'le NCCLS'in M27-A2 referans metodu karşılaştırmışlardır. Bu karşılaştırmayı çeşitli *Candida* türlerinde posakonazol, ravukonazol ve vorikonazol ile yapmışlardır. Sonuç olarak YeastOne pleytde tüm tür ve antifungaller için %95-99 uyumu 24. saate tespit edebilmişlerdir (Espinel-Ingroff ve ark., 2004).

Pfaller ve arkadaşları bir ticari kolorimetrik mikrodilüsyon panelini (Sensititre YeastOne), referans mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Referans MİK sonuçlarını 48, ticari kolorimetrik mikrodilüsyon panelini 24 saatlik inkübasyondan

sonra değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, posakonazol'de %92,3; flukonazol'de %98 uyum saptamışlardır (Pfaller ve ark., 2004).

Linares ve arkadaşları referans metod olan NCCLS M27-A2 ile kolorimetrik metod Sensititre YeastOne'ı karşılaştırmışlardır. Toplam 272 *Candida* izolatında çalışılmış, antifungal olarak da vorikonazol kullanılmıştır. Sonuçta iki metod arasında %97-100 uyum bulunmuştur (Linares ve ark., 2004).

Li ve arkadaşları NCCLS mikrodilüsyon yöntemi ile fungal substrat kullanımını gösteren kolorimetrik reaksiyona dayalı bir testi değerlendirmişlerdir. Bu netod da (hızlı duyarlı testi [RSA]) sonuçları okumak için 8 saatten az bir süre yeterliydi. Çalışılan 106 izolatda amfoterisin B için %100, 5-flusitozin için %98, flukonazol için %63,2 ve itrokonazol için %61,3 uyum saptanmıştır (Li ve ark., 2000).

To ve arkadaşları standart makrodilüsyon metodu ile alamar kolorimetrik metodunu karşılaştırmışlardır. 24. saat sonuçları; amfoterisin B için %85,3; flukonazol için %77,9; flusitozin için %86,2 bulunmuştur. 48. saat sonuçları ise amfoterisin B'de %69,3; flukonazol'de %65,2; flusitozin'de %97,2 olarak bulunmuştur (To ve ark., 1995).

Tiballi ve arkadaşları 140 *C. glabrata* suşunu standart makrodilüsyon ve kolorimetrik broth mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırmışlardır. İki metodun uyumu flukonazol'de %87, itrokonazol'de %86 bulunmuştur (Tiballi ve ark. 1995b).

Resazurin mikroplak yöntemi *Candida*'larda çalışılmamakla beraber başka mikroorganizmalarla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Coban ve arkadaşları resazurin mikroplak yöntemini enterokok duyarlılığını ölçmede kullanmışlardır. Standart yöntem olarak NCCLS ve BSAC mikrodilüsyon metotlarını kullandıkları çalışmada, standart yöntemlerle, resazurin mikroplak yöntemi arasında %100 uyum bulmuşlardır (Coban ve ark., 2005).

Bizim çalışmamızda, referans mikrodilüsyon yöntemiyle *Candida*'larda ilk kez denenen kolorimetrik resazurin mikroplak yöntemi arasındaki uyum (± 1 dilüsyonda); *C. albicans*'lar için amfoterisin B'de %91.5, flukonazol'de %97.8, vorikonazol'de %100, non-*albicans Candida*'lar için ise amfoterisin B'de %100, flukonazol'de %100, vorikonazol'de %90.9 olarak saptanmıştır. Bizim yöntemimiz de diğer kolorimetrik yöntemlerin bir çoğu gibi standart yöntemle yüksek oranlarda uyumlu bulunmuştur (Tablo 13).

Referans mikrodilüsyon yönteminde önerilen görsel okuma zordur. Kolorimetrik yöntemler standar yöntemle göre değerlendirmesi daha kolay olan yöntemlerdir. Ayrıca, mikroplakların değerlendirmeden önce vortekslenmesi gerekmediğinden ve okuma esnasında aynaya ihtiyaç duyulmadığından standart yöntemlere göre oldukça pratiktir.

Resazurin mikropalak yönteminin, referans mikrodilüsyon yöntemine göre önemli bir avantajı, fazla bir ek maliyet getirmeden 48 saate çıkan standard yöntem sonucunu yüksek bir uyumla *C. albicans*'lar için 12. non-albicans *Candida*'lar için ise 18. saatte vermesidir. Yöntemimiz bu özelliği ile diğer kolorimetrik yöntemlerin birçoğundan daha avantajlıdır.

Antifungal duyarlılık testlerinde, yöntemin yeni ilaçlara uygulanabilmesi ve iki ya da daha fazla ilacın aktivitesini güvenli olarak ölçebilmesi aranan önemli özelliklerdendir. Resazurin mikropalak yönteminin, yeni bir antifungal ilaç olan vorikonazol ve onun haricinde iki antifungalın aktivitesini güvenli olarak ölçebildiği görülmüştür.

Çalışmamızın sonuçlarından hareketle resazurin mikropalak yönteminin; kolay uygulanabilen, erken sonuç veren ve fazla bir ek maliyet getirmeden sonuçların daha kolay değerlendirilmesini sağlayan bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmada kullanılan kan kültürlerinden izole edilmiş 58 *Candida* suşunun identifikasyonu sonucu; %81 gibi yüksek bir oranda *C. albicans*, %12'si *C. guilliermondii*, %3.5'i *C. glabrata*, %3.5'i *C. tropicalis* olarak bulundu.
2. *Candida*'ların MİK değerlerine bakıldığında, vorikonazolün flukonakolden daha düşük MİK değerleri olduğu görülmektedir.
3. Referans mikrodilüsyon yöntemiyle resazurin mikroplak yöntemi arasındaki uyum (± 1 dilüsyonda); *C. albicans*'lar için amfoterisin B'de %91.5, flukonazol'de %97.8, vorikonazol'de %100, non-albicans *Candida*'lar için ise amfoterisin B'de %100, flukonazol'de %100, vorikonazol'de %90.9 olarak saptanmıştır.
4. Resazurin mikroplak yöntemi *Candida*'larda yüksek oranda standart yöntemle uyumlu bulunmuştur.
5. Resazurin mikroplak yöntemi fazla bir ek maliyet getirmeden ve kolaylıkla uygulanabilmektedir.
6. Resazurin mikroplak yöntemi sayesinde, standart yöntemle 48 saatte alınan *Candida*'ların MİK sonuçları, *C. albicans* için 12. saatte, non-albicans *Candida*'lar için 18 saate alınabilmektedir.
7. MİK sonuçlarının okunması aşamasında, mikroplakların vortekslenmesine ve kuyucukların bulanıklığının değerlendirilmesinde kullanılan aynaya ihtiyaç duyulmadığından standart yöntemden daha pratiktir.
8. Referans mikrodilüsyon yönteminde görsel okuma zorluğu bulunmakla birlikte, resazurinin ortama eklenmesiyle elde edilen renk değişimi okumada kolaylık sağlamaktadır.
9. Yöntem ile ilgili *Candida*'larda yapılmış başka çalışma bulunmadığından, konu ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, S. Khan, Z., Mustafa, A.S., Khan, Z.U. (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*, **40** (7), 2483-2489.
- Akkurt, L. (2004). Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin amfoterisin B, flukonazol ve posakonazole duyarlılığı. Samsun. Uzmanlık Tezi.
- Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H., Vartivarian, S. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*, **24** (6), 1122-1128.
- Alibey, H.A., Direkel, Ş. (1999). Turgut Özal tıp merkezinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen mayaların türlere göre dağılımı. *1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, İzmir, Özet kitabı, P31.
- Anaissie, E., Bodey, G.P. (1989). Nosocomial fungal infections: old problems and new challenges. *Infect Dis Clin North Am*, **3**, 867-882.
- Barry, A.L., Brown, S.D. (1996). Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **34** (9), 2154-2157.
- Beck-Sague, C., Jarvis, W.R. (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis*, **167** (5), 1247-1251.
- Bodey, G.P. (1988). The emergence of fungi as a major hospital pathogens. *J Hosp Infect*, **11**, 411-426.
- Bryskier, A. (1998). Novelties in the field of anti-infectives in 1997. *Clin Infect Dis*, **27** (4), 865-883.
- Coban, A.Y., Darka, O., Fısgın, N.T., Cihan, C.C., Bilgin, K., Akgünes, A., Güven, T., Dokuzoğuz, B., Birinci, A., Durupınar, B. (2005). The resazurin microplate method for rapid detection of vancomycin resistance in enterococci. *Journal of Chemotherapy*, **17** (4), 361-366.
- Como, J.A., Dismukes, W.E. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med*, **330** (4), 263-272.
- Costa, M.R.E., Lacaz, C.D.S., Kawasaki, M., Camargo, Z.P. (2000). Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol*, **38** (1), 139-145.
- Coşkun, S., Aksaray, S., Balaban, N., Süzük, S., Cesur, S., Şahiner, Ş., Topal, M. (2003). Onkoloji hastalarının orofaringeal örneklerinde candida kolonizasyonu. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Bodrum, Özet kitabı, P9

- Cuence-Estrella, M., Rodero, L., Garcia-Effron, G., Rodriguez-Tudela, J.L. (2002). Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother*, **49** (6), 981-987.
- Çerikçioğlu, N. (1999). Mantar infeksiyonlarında seroloji ve deri testleri. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1145-1153.
- Çerikçioğlu, N. (2002). *Candida*'ların ince yapısı. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir, Özet kitabı, 47-54.
- Davey, K.G., Holmes, A.D., Johnson, E.M., Szekely, A., Warnock, D.W. (1998). Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, **36** (4), 926-930.
- De Oliveira, R.D., Maffei, C.M., Martinez, R. (2001). Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. *Rev Assoc Med Bras*, **47** (3), 231-235.
- Denning, D.W., Evans, E.G., Kibbler, C.C., Richardson, M.D., Roberts, M.M., Rogers, T.R., Warnock, D.W., Warren, R.E. (1997). Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. British Society for Medical Mycology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **16** (6), 424-436.
- Diekema, D.J., Messer, S.A., Brueggemann, A.B., Coffman, S.L., Doern, G.V., Herwaldt, L.A., Pfaller, M.A. (2002). Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol*, **40** (4), 1298-1302.
- Dix, P.S. (1998). Pharmacology of lipid formulations of amphotericin B. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. Eds, Andriole, V.T., Gorbach, S.L., Vol:7, 8-15.
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenzel, R.P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, **29** (2), 239-244.
- Emori, T.G., Gaynes, R.P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, **6** (4), 428-442.
- Ener, B. (1998). Fungal hastane infeksiyonları: Epidemiyoloji ve korunma. *Hast İnfek Derg*, **2**, 150-155.
- Ener, B. (1999). Hastane infeksiyonu etkeni olarak mantarlar. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1123-1128..

- Güleç, S., Karadenizli, A.Y., Bingöl, R. (1999). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen mayarın izolasyonu. *1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, İzmir, Özet kitabı, P32.
- Godoy, P., Yiraboschi, I.N., Severo, L.C., Bustamante, B., Calvo, B., Almeida, L.P., da Matta, D.A., Colombo, A.L. (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **98** (3), 401-405
- Goodrich, J.M., Reed, E.C., Mori, M., Fisher, L.D., Skerrett, S., Dandliker, P.S., Klis, B., Counts, G.W., Meyers, J.D. (1991). Clinical features and analysis of risk factors for invasive candidal infection after marrow transplantation. *J Infect Dis*, **64** (4), 731-740.
- Göller, S., Özkütük, A., Yuluğ, N. (2001). Sistemik infeksiyonlardan izole edilen *Candida*'ların çeşitli antifungal ajanlara duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg*, **15** (2), 221-224.
- Hawkins, J.L., Baddour, L.M. (2003). *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clin Infect Dis*, **36** (2), 14-8.
- Hay, R.J. (1994). Antifungal drugs on the horizon. *J Am Acad Dermatol*, **31** (3), 82-86.
- Hazen, K.C., Howell, S.A. (2003). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth edition, Eds, Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A., Tenover, M.A., ASM Press, Washington DC, 1693-1711.
- Helvacı S., Gediklioğlu S., Mıstık R. (1992). *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. *İnf Derg*, **6** (2), 141-143.
- Herbrecht, R., Denning, D.W., Patterson, T.F., Bennett, J.E., et al. (2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, **347** (6), 408-415.
- Hopfer, R.L. (1995). Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. *Arch Med Res*, **26** (3), 287-292.
- Hurst, S.F., Reyes, G.H., McLaughlin, D.W., Reiss, E., Morrison, C.J. (2000). Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7** (3), 477-485.
- İnci, R. (1999). Antifungal ilaçlar. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1155-1158

- Jahn, B., Martin, E., Stueben, A., Bhakdi, S. (1995). Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J Clin Microbiol*, **33** (3), 661-667.
- Jarvis, W.R., Martone, W.J. (1991). Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob chemother*, **28**, 15-19.
- Jarvis, W.R., Martone, W.J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother*. **29**, 19-24.
- Jarvis, W.R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis*, **20** (6), 1526-1530.
- Johnson, L.B., Kauffman, C.A. (2003). Voriconazole: A new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*, **36** (5), 630-637.
- Jeu, L., Piacenti, F.J., Lyakhovetskiy, A.G., Fung, H.B. (2003). Voriconazole. *ClinTher*, **25** (5), 1321-1381.
- Kauffman, C.A., Zaris, L.T. (1999). Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other triazoles against *Candida* species. *Mycoses*, **42** (9-10), 539-542.
- Kayaalp, O. (1995). *Tıbbi Farmakoloji Gözden Geçirme Kitabı*.
- Keçeli, S.A., Budak, F., Yücesoy, G., Vilke, A. (2003). Vulvovajinal kandidoz olgularından izole edilen mayaların bazı antifungallere duyarlılıkları. 3. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Bodrum, Özet kitabı, P31.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, **Fifth Ed.** Philadelphia.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, **359**, 1135-1144.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). *The yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Scientific.
- Kuştimur, S. (1999). Antifungal duyarlılık testleri. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1159-1166.
- Kuştimur, S. (2003). Hastane infeksiyonlarına neden olan mantarların Dünya'da ve Türkiye'de dağılımı. 3. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Bodrum, Özet kitabı, 47-58.

- Larone, D.H. (1995). *Medically Important Fungi – A Guide to Identification*. Third edition, ASM Press, Washington DC, 28-35
- Li, R.K., Elie, C.M., Clayton, G.E., Ciblak, M.A. (2000). Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method (M-27A) for antifungal drug MIC determination. *J Clin Microbiol*, **38** (6), 2334-2338.
- Linares, M.J., Charriel, G., Solis, F., Casal, M. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *J Clin Microbiol*, **42** (2), 899-902.
- Lunel, F.M.V., Meis, J., Voss, A. (1999). Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **34**, 213-220.
- Maaroufi, Y., Heymans, C., De Bruyne, J.M., Duchateau, V., Rodriguez-Villalobos, H., Aoun, M., Crokaert, F. (2003). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based pcr assay. *J Clin Microbiol*, **41** (7), 3293-3298.
- McLintock, L.A., Jones, B.L. (2004). Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*, **126** (3), 289-297.
- Munoz, P., Burillo, A., Bouza, E. (2001). Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect Dis*, **7** (2), 38-45.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1992). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Proposed Standard. NCCLS Document M27-P, Villanova, Pennsylvania.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. NCCLS Document M27-A, Wayne, Pennsylvania.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard second edition. NCCLS Document M27-A2, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Neely, M.N., Ghannoum, M.A. (2000). The exciting future of antifungal therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **19** (12), 897-914.
- Olaechea, P.M., Palomar, M., Leon-Gil, C., Alvarez-Lerma, F., Jorda, R., Nolla-Salas, J., Leon-Regidor, M.A., EPCAN Study Group. (2004). Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **23** (4), 323-330.

- Or, E., Dokuzeylül, B. (2005). Sistemik mantar hastalıklarının sağaltımında kullanılan ilaçlar. 4. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Konya, Özet kitabı, 140-148.
- Öğünç, D. (2005). Mantarlarda virülans faktörleri. 4. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Konya, Özet kitabı, 11-14.
- Özkan, S., Kaynak, F., Abbasoğlu, U., Gür, D. (2004). Çocuk hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin çeşitli antifungallere duyarlılıklarının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **34** (4), 253-256.
- Özkütük , A., Şengönül, A., Yuluğ, N. (2000). *Candida* türlerinin tanımlanmasında CHROMagar *Candida* besiyerinin değerlendirilmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **14** (4), 311-313.
- Öztürk, R. (2005). Vorikonazol: Mikrobiyolojik ve farmakolojik özellikleri. *Flora*, **10** (2), 3-11.
- Pfaller, M.A. (1994). Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis*, **19**, 8-13.
- Pfaller, M.A., Houston, A., Coffmann, S. (1996). Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*, **34**, 58-61.
- Pfaller, M.A., Yu, W.L. (2001). Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am*, **15** (4), 1227-1261.
- Pfaller, M.A., Espinel-Ingroff, A., Jones, R.N. (2004). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *J Clin Microbiol*, **42** (10), 4577-4580.
- Ramani, R., Chaturvedi, V. (2000). Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother*, **44** (10), 2752-2758.
- Rex, J.H., Walsh, T.J., Sobel J.D., Filler, S.G., Pappas, P.G., Dismukes, W.E., Edwards, J.E. (2000). Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*, **30** (4), 662-678.
- Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Gosey, L.L., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J., Warnock, D.W. (2001). Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*, **14** (4), 643-658.
- Rex, J.H., Pfaller, M.A. (2002). Has antifungal susceptibility testing come of age. *Clin Infect Dis*, **35**, 982-989.

- Rodriguez-Tudela, J.L., Berenguer, J., Martinez-Suarez, J.V., Sanchez, R. (1996). Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40** (9), 1998-2003.
- Saraçlı, M.A. (2005). Mikozların moleküler Tanısı: Neredeyiz. 4. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Konya, Özet kitabı, 33-45.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*, **12** (1), 40-79.
- Stevens, D.A., Bennett, J.E. (2000). Antifungal agents. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Eds, Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., 448-459.
- Sutton, D.A. (2003). Specimen collection, transport and processing: Mycology. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth edition, Eds, Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Jorgensen, J.H., Tenover, R.H. ASM Press, Washington DC, 1659-1667.
- Sürücüoğlu, S. (1999). Sistemik azoller ve amfoterisin B'nin yeni formülasyonları. 1. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, İzmir, Özet kitabı, 183-186.
- Tabak, F. (2005). Vorikonazol: Klinik kullanım, yan etkiler, ilaç etkileşimleri. *Flora*, **10** (2), 12-20.
- Tiballi, R.N., He, X., Zarins, L.T., Revankar, S.G., Kauffman, C.A. (1995a). Use of a colorimetric system for yeast susceptibility testing. *J Clin Microbiol*, **33** (4), 915-917.
- Tiballi, R.N., Zarins, L.T., He, X., Kauffman, C.A. (1995b). *Torulopsis glabrata*: azole susceptibilities by microdilution colorimetric and macrodilution broth assays. *J Clin Microbiol*, **33** (10), 2612-2615.
- To, W.K., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G. (1995). Comparative evaluation of macrodilution and alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol*, **33** (10), 2660-2664.
- Tümbay, E. (1999). *Candida* türleri. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1081-1086.
- Ulutan, F. (2003). Fırsatçı mantar infeksiyonlarının tedavisi. 3. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Bodrum, Özet kitabı, 245-254.

- Ural, O. (2004). Fungal hastane infeksiyonları: Fungal infeksiyonların epidemiyolojisi ve korunma. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **8 (2)**, 159-167.
- Uzun, Ö. (1998). Antifungal tedavi: Amfoterisin B hala standart ilaç mı. *ANKEM Derg*, **12 (3)**, 253-256.
- Uzun, Ö. (2001). Kandidemi. 2. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*. Ankara, Özet kitabı, 159-162.
- Walsh, T.J., Lee, J.W. (1993). Prevention of invasive fungal infections in patients with neoplastic disease. *Clin Infect Dis*, **17 (2)**, 468-480.
- Wang, S., Holyoak, G.R., Liu, G., Bunch, T.J., Evans, R.C., Bunch, T.D. (1998). Effects of resazurin on bovine oocyte fertilization and embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, **51**, 205-213.
- Wasan, K.M., Lopez-Berestein, G. (1996). Characteristics of lipid-based formulations that influence their biological behavior in the plasma of patients. *Clin Infect Dis*, **23 (5)**, 1126-1138
- Wenzel, R.P. (1995). Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis*, **20**, 1531-1534.
- Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F., Wenzel, R.P. (1988). Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*, **148 (12)**, 2642-2645.
- Wilson, M.L., Weinstein, M.P., Reimer, L.G., Mirrett, S., Reller, L.B. (1992). Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J Clin Microbiol*, **30 (2)**, 323-329.
- Wong-Beringer, A., Jacobs, R.A., Guglielmo, B.J. (1998). Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis*, **27 (3)**, 603-618.
- Verweij, P.E., Meis, J.F. (2000). Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, **2 (2)**, 80-87.
- Viviani, M.A., Marie, S., Graybill, J.R., Yamaguchi, H., Anaissie, E., Caillot, D. (1998). New approaches to antifungal chemotherapy. *Med Mycol*, **36 (1)**, 194-206.
- Yeğenoğlu, Y. (2001). Mantar infeksiyonlarının serolojik tanısı. 2. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*. Ankara, Özet kitabı, 97-104.
- Yıldıran, Ş.T. (1999). Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanısı. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Editörler, Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaşelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., Güneş Kitabevi, 1129-1144.

- Yücel, A. (1987). Tıp bakımından önemli *Candida* türlerinin mikolojisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **17**, 45-59.
- Yücel, A., Kantarcıoğlu, S. (2002). Antifungallerin sistemik mantar infeksiyonlarında kullanımı ve duyarlılık deneyleri: Genel yönlendirme. *J Med*, **33**, 261-280.
- Yücesoy, M., Ergon, M.C. (2005). Yoğun bakım ünitelerinden dört yıllık dönem süresince soyutlanan maya mantarlarının tür dağılımı. *4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Konya, Özet kitabı, S9.
- Young, R.C., Bennett, J.E., Geelhoed, G.W., Levine, A.S. (1974). Fungemia with compromised host resistance. A study of 70 cases. *Ann Intern Med*, **80 (5)**, 605-612.
- Xu, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (1998). Colony size can be used to determine the MIC of fluconazole for pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol*, **36 (8)**, 2385-2385.

ÖZGEÇMİŞ

04/06/1978 tarihinde Samsun'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Samsun'da tamamadım. 1997 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2001 yılında "Biyolog" ünvanı ile mezun oldum. 2001'de Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.'da yüksek lisans eğitimime başladım. Halen bu eğitimimi sürdürmekteyim.