



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ
LABORATUVARINDA KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Dr. Özdemir OZKAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2011



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ
LABORATUVARINDA KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Dr. Özdemir OZKAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Beyza ENER

BURSA-2011

İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	12
Bulgular.....	17
Tartışma ve Sonuç.....	26
Kaynaklar.....	31
Teşekkür.....	39
Özgeçmiş.....	40

ÖZET

Modern tıptaki yeni tedavi gelişmelerine bağlı olarak, 1980'lerin başlarından itibaren özellikle yoğun bakım ve immün sistemi baskılanmış hastaların artan oranda ciddi mantar enfeksiyonlarına maruz kalması; amfoterisin B dışında yeni antifungallerin gündeme gelmesi ve antifungal direncin de görülmeye başlaması nedeniyle in vitro antifungal duyarlılık testleri giderek önem kazanmaya başlamıştır. Bu çalışma, 1995-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yatan hastalardan izole edilen *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılığını belirlemek, epidemiyolojik veri sağlamak ve bu bilgiler doğrultusunda ampirik tedaviye ışık tutmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada, kan ve steril vücut sıvılarından izole edilen 444 *Candida* izolatının antifungal duyarlılığına bakılmış ve amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin duyarlılıkları referans CLSI M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile saptanmıştır. Değerlendirme, 35°C'da hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sonunda gözle yapılmış ve mikrodilüsyon yönteminde, amfoterisin B için üremeni inhibe edildiği son kuyucuk, diğer ilaçlarda ise üremenin kontrol kuyucuğuna göre %50 azladığı son kuyucuk minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak alınmıştır. E-test yönteminde ise inhibisyon zonunun antifungal strip ile birleştiği nokta MİK olarak değerlendirilmiştir. Amfoterisin B duyarlılığında sınır değerler belli olmadığından MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri saptanmış, diğer ilaçlarda ise sınır değerler belli olduğundan duyarlı ve dirençli suşların yüzde oranları hesaplanmıştır. İki yöntem arasındaki uyuma ise (\pm) dilüsyonda bakılarak uyum yüzdesi belirlenmiştir.

Duyarlılık sonuçları her iki yöntemde de hem 24. saat hem de 48. saatte okunabilmiş ve 48. saat okumasında hafif bir yükselme dışında fazla bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Amfoterisin B'de E-test ile referans yöntemine göre daha geniş bir MİK aralığı elde edilmiş ve $>1\mu\text{g/ml}$ MİK değerleri sadece *C. glabrata* ve *C. krusei* suşlarında saptanmıştır. Azol grubunda en etkili ilacın vorikonazol, en az etkili ilacın itrakonazol olduğu görülmüştür. Flukonazol direnci %1.2 olarak bulunmuş ve flukonazole dirençli beş suştan (iki *C. albicans*, iki *C. glabrata* ve bir *C. parapsilosis*) sadece bir *C. glabrata* suşunun vorikonazole de dirençli olduğu saptanmıştır. Tüm suşlar arasında kaspofungine duyarlı olmayan sadece bir *C. guilliermondii* suşu tespit edilmiştir. İki yöntem arasında, referans yöntemle dirençli iken E-test yöntemi ile duyarlı büyük uyumsuzluk olmamış; E-test ile dirençli, referans yöntemle duyarlı küçük uyumsuzluk sadece flukonazol ve itrakonazolde görülmüş, vorikonazol ve kaspofunginde saptanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada; 10 yıllık bir süreçte izole edilen *Candida* suşlarında duyarlılığa bakılarak epidemiyolojik veri elde edilerek, hastanemizde kandidemilerde ilk sırada kullanılan flukonazole, totalde direncin yüksek olmadığı, vorikonazol ve kaspofunginin en etkili ilaçlar olduğu ve amfoterisin B duyarlılığında seçilmesi gereken yöntemin E-test olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antifungal duyarlılık, E test, mikrodilüsyon

Summary

DETERMINING THE ANTIFUNGAL SENSITIVITIES OF CANDIDA TYPES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES IN ULUDAĞ UNIVERSITY FACULTY OF MEDICINE, MICROBIOLOGY LABORATORY

Depending on the new treatment developments in modern medicine, upon particularly the patients who were under intensive care and whose immune system was oppressed being exposed to serious fungal infections in increasing proportions as of the early 1980's, in vitro antifungal sensitivity tests started to be more significant due to the facts that new antifungals were brought to the agenda in addition to amphotericine B and that antifungal resistance started to emerge as well. This study was performed for the purpose of determining the antifungal sensitivity of *Candida* isolates that were isolated in the patients who stayed in Uludağ University Health Practice and Research Center from 1995 to 2005, to provide epidemiological data and to set light to empiric treatment on the basis of this information.

In the study antifungal sensitivity of 444 *Candida* isolates isolated from blood and sterile body fluids was examined and the sensitivities of amphotericine B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin were detected using reference CLSI M27-A3 microdilution method and the method of E-test. The assessment was performed at 35°C with eye both at the end of 24 hour and 48 hour incubation and in the micro dilution method, the last tiny borehole where the reproduction for amphotericine B was inhibited and in other medicines the last tiny borehole where reproduction decreased by 50% compared to the control tiny borehole was taken as minimal inhibitor concentration (MIC). And in the method of E-test the point on which the inhibition zone combined with the antifungal strip was assessed as MIC. Since the limit values were not definite in amphotericine B, MIC

range, MIC₅₀ and MIC₉₀ values were detected and since limit values were definite in the other medicines the percent proportions of the sensitive and resistant strains were calculated. And the harmony between the two methods was examined in (\pm) dilution and the harmony percentage was determined on this basis.

In both methods the results of sensitivity could be read in both 24th hour and 48th hour and in the reading of the 48th hour it was understood that there was no significant change other than a slight increase.

In amphotericine B a broader MIC range was acquired compared to the method referenced with the E-test and >1 μ g/ml MIC values were only detected in *C. glabrata* and *C. krusei* strains. It was understood that the most effective medicine in the azole group was voriconazole, and the least effective medicine was itraconazole. The resistance of fluconazole was found to be 1.2% and it was detected that only a *C. glabrata* strain among the five strains resistant against fluconazole (two *C. albicans*, two *C. glabrata* and a *C. parapsilosis*) was resistant against voriconazole as well. Among all the strains only one *C. guilliermondii* strain was detected to be not sensitive against caspofungine. While it was resistant with the reference method from the two methods and it was sensitive with the E-test method and no great disharmony emerged and the small disharmony between resistance with the E-test and sensitivity with the reference method was only the case with fluconazole and itraconazole and it was not detected in voriconazole and caspofungin.

As a consequence, in this study it was determined by acquiring epidemiological data on the basis of the sensitivity in *Candida* strains isolated for a period of 10 years that the resistance against fluconazole used at first rank in our hospital was not high in total and that voriconazole and caspofungin were the most effective medicines and that the method to be selected for B sensitivity of amphotericine was E-test.

Key words: Antifungal susceptibility, E test, microdilution

GİRİŞ

Mantarlar doğada yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Duyarlı hastalarda oluşturdukları fırsatçı enfeksiyonlar, ciddi mortalite ve morbidite nedenidir. Günümüzde kanser, immun yetmezlik ve kollajen doku hastalıklarında yaşam sürelerinin uzaması; geniş spektrumlu çoklu antibiyotik kullanımı; invazif girişimler ve organ nakillerinin yaygınlaşması genel durumu bozuk hasta sayısını arttırmış ve bu artış son 20 yıl içinde mantarların oluşturduğu enfeksiyonlarda ciddi bir sıçrayışa neden olmuştur. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) raporuna göre 1980-1990 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastanelerinde yatan her 1000 hasta için nozokomiyal mantar enfeksiyonu gelişme oranı 2'den 3.8'e yükselmiştir (1-4).

Mantarlar nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan etkenlerin yaklaşık %10'unu oluştururlar. *Candida albicans* (%59.8) ve diğer *Candida* türleri (%26) en fazla izole edilen etkenler olup, nozokomiyal patojenler arasında altıncı sırada yer alırlar. *Candida* türlerini, *Aspergillus* türleri (%1.3) ve diğer mantarlar (%13) izler. Fırsatçı mantar enfeksiyonlarına bağlı mortalite yaklaşık %38-50 civarındadır (1).

Candida türleri, memelilerde gastrointestinal sistem mukozasında normal flora olarak bulunduğu için nozokomiyal mantar patojenleri arasında en sık karşılaşılan türlerdir. İnvazif ve non-invazif enfeksiyonlara sebep olabilirler ve mortalite ve morbititesi yüksek en önemli invazif enfeksiyonu, kan dolaşımı enfeksiyonudur. *Candida* türlerine bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının (kandidemi) insidansı bölgeden bölgeye ve aynı bölge içinde hastaneden hastaneye farklılık göstermekte ve 0.2-2.8/1000 başvuru arasında değişmektedir (5). Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde(SUAM) bu oran, 1996-2007 yıllarını kapsayan 12 yıllık bir taramada ortalama 1.9/1000 başvuruda bulunmuştur (6). Kuzey Amerika ve Avrupa'da yapılan sürveyans çalışmalarına göre *Candida* türleri kan dolaşımı enfeksiyonlarına dördüncü sıklıkta sebep olmakta ve tüm

nazokomiyal kan dolaşımı etkenleri arasında %8-10 oranında görülmektedir (7, 8).

***Candida* Türlerinin Genel Özellikleri**

Heterojen bir cins olan *Candida* cinsi, *Ascomycetes* sınıfı içinde *Candidaceae* ailesinde yer almaktadır. *Candida* cinsi içinde yaklaşık 200 kadar tür bulunmaktadır. *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. norvogensis*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. viswananthii*, *C. zeylanoides* insanlarda hastalık oluşturan türlerdir. Bununla beraber kandidoz olgularının %90'ından fazlası, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* tarafından oluşturulmaktadır (9, 10).

Mikroskopik olarak *Candida* türleri 3-6 mikrometre çapında, oval veya yuvarlağa yakın biçimde, tomurcuklanan hücreler (blastokonidiyum) halinde görülürler. Blastokonidiyumlar birbirlerinden ayrılmayıp uzayarak yalancı hifler oluştururlar. *C. albicans* ise gerçek hif oluşturarak dimorfik özellik gösteren tek türdür (11).

Candida türleri katı besiyerlerinde 35°C'de 24-72 saatte, kirli beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı, düzgün koloniler oluştururlar. Türlerin ayırımında koloni morfolojisi çok yararlı değildir. Mikroskopik morfolojik tanı, mısır unlu tween 80 agara Dalmau tekniği ile yapılan ekim sonucu plakların mikroskop altında incelenmesi ile yapılır. Yalancı hifler, blastakonidiyumların yalancı hiflere tutunma şekli ve sadece *C. albicans*'a özgü olan kalın duvarlı ve büyük klamidosporların varlığı mikroskopik tanıda kullanılan kriterlerdir. Çimlenme borusu testi (Germ tüp testi) ise *C. albicans*'ın gerçek hif oluşturduğunu göstermek amacı ile yapılan bir test olup, hızlı tanıda oldukça yararlıdır (9, 11). Diğer türlerin tanısında esas olan karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleridir. Karbonhidrat asimilasyonu için klasik bir yöntem Wickerham-Burton yönteminin; zor olması, zaman alıcı ve geç sonuçlanması nedeniyle günümüzde ticari olarak temin edilebilen çok sayıda tanı

sistemlerinden yararlanılmaktadır. Bu sistemlerden bir kısmı aynı gün içinde sonuç verirken, bir kısmı 24-48 saat sonra sonuç vermektedir. Ancak ticari sistemlerin hiçbiri klasik yöntemle tamamen uyumlu olmayıp, ticari sistemle yapılan tanı, morfolojik kriterlerle mutlaka desteklenmelidir (9-11).

***Candida* Türleri ile Gelişen Enfeksiyonlar**

Candida türleri ile gelişen enfeksiyonlara kandidoz denir. Kandidozların büyük çoğunluğu, etkenin normal florada (gastrointestinal sistem, vajina, deri) bulunması nedeniyle endojen kaynaklıdır. Ancak vajinal kandidozlu anneden bebeğine, eşler arasında cinsel ilişkiyle ve el taşıyıcılığının %70'lere ulaştığı hastane personelinden eller aracılığı ile kişiden kişiye bulaş da olabilir (12). *Candida* türleri deri ve deri eklerinde, mukozalarda hastalılar oluşturmakta ve özellikle immun sistemi zayıflamış kişilerde ciddi sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Tablo 1'de *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyonlar özetlenmiştir (12). *C. albicans* en sık görülen kandidoz etkenidir (2, 13). Hem endojen hem de ekzojen yolla enfeksiyona yol açabilir. Ancak son yıllarda diğer *Candida* türlerinde de göreceli bir artış olmuştur (13). Bu durum antifungal ajanların profilaktik ve ampirik kullanımının yaygınlaşması ile ilişkilendirilmektedir.

Tablo-1: *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyonlar

<ul style="list-style-type: none">• Kutanöz kandida enfeksiyonları<ul style="list-style-type: none">➤ Erosia interdigitalis blastomycetica➤ Intertrigo➤ Paronişi ve onikomikoz
<ul style="list-style-type: none">• Kronik mukokutanöz kandidoz
<ul style="list-style-type: none">• Mukozaların kandida enfeksiyonları<ul style="list-style-type: none">➤ Pamukçuk (oro-faringeal kandidoz)➤ Kandida özafajiti➤ Mide-barsak kandidozu➤ Kandida vajiniti
<ul style="list-style-type: none">• Kandidemiler
<ul style="list-style-type: none">• Derin organ kandidozları<ul style="list-style-type: none">➤ Lokal derin organ enfeksiyonları (Genellikle kateter ve şantlarla ilişkili)➤ Yaygın enfeksiyonlar

Sistemik Etkili Antifungal Ajanlar

Kandidozların tedavisinde esas, altta yatan olumsuz koşulların düzeltilmesi olup beraberinde antifungal ilaçlardan da faydalanılır. Ancak sistemik etkili antifungal ilaç seçeneklerinin antibakteriyel seçeneklerden çok daha az olması ve mantar enfeksiyonlarının giderek artması yeni ilaç arayışlarına yol açmış ve ilaç çalışmalarını hızlandırmıştır (14).

1959'da sistemik kullanıma giren **amfoterisin B**, yaklaşık 40 yıl boyunca invazif mikozların tedavisinde tek aktör olarak rol almıştır. Amfoterisin B, mantar hücre duvarında bulunan ergosterole geriye dönüşümsüz olarak bağlanarak etki eden poliyen grubu bir antifungal ajandır. Bu bağlanmayla zar geçirgenliği bozulur ve hücre içi potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin dışarı sızması sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Lipit formülleri de aynı mekanizmayla etki eder (15-17).

Amfoterisin B oldukça geniş spektrumlu bir antifungal ajandır. *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, *Zygomycetes* sınıfı mantarlar, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve bazı protozoon enfeksiyonlarında etkilidir (16, 18). Ancak *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. krusei* gibi bazı türler, amfoterisin B'ye karşı direnç veya azalmış duyarlılık gösterebilir (16). Amfoterisin B kullanılmakta olan antifungaller içinde en etkili ajan olmasına karşın, invazif mantar enfeksiyonlarının tedavisinde (doku dağılımı iyi olmadığı ve yan etkileri fazla olduğu için) başarı oranı istenilen düzeyde değildir. Nefrotoksisite, ateş, hipokalemi gibi ciddi yan etkileri lipit formüllerinin geliştirilmesiyle azaltılmıştır (15, 16).

5-Fluorositozin (Flusitozin=5-FC), ilk olarak antineoplastik bir ajan olarak üretilen, daha sonra antifungal etkisi olduğu da anlaşılan bir nükleozid analogudur. Pirimidin metabolizmasını bozarak antifungal aktivite gösterir. 5-FC mantar hücresine girdikten sonra permeaz enziminin yardımıyla 5-fluorourasil'e (5-FU) dönüşür ve fosforillenerek RNA ile birleşir. Bu birleşme protein sentezinin inhibisyonuyla sonuçlanır. Diğer taraftan, 5-FU'nün 5-fluorodeoksiüridin monofosfata dönüşümü; timidilat sentazın inhibisyonuna

ve fungal DNA sentezinin bozulmasına sebep olur. 5-FC'in dar bir etki spektrumu vardır. *Candida* türleri, *C. neoformans* ve kromoblastomikoza sebep olan dematiaceous (koyu renk pigmentli) mantarlara etkilidir. Monoterapi sırasında direnç gelişebildiğinden amfoterisin B ile kombine kullanılır (16-19).

Azoller fungistatik etkili ajanlar olup, sitokrom p450 aracılığıyla lanosterolün C-14 demetilasyonunu inhibe eder ve hücre zarında farklı sterol birikimine ve ergosterol konsantrasyonunda azalmaya neden olurlar. Sonuçta hücre membran sentezi yapılamaz (16, 17).

Bu grupta imidazol ve triazoller bulunur. İlk üretilen ve topikal etkili olan imidazol türevleri benzimidazol, klotrimazol ve ekonazolden sonra, 1978 yılında sistemik etkili **mikonazol** kullanıma girmiştir. Sistemik kandidozlar ve bazı refrakter kriptokok menenjit olgularında etkili olduğu görülmesine rağmen, ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır. 1981 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından kullanımı onaylanan **ketokonazol** ise, sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde günümüzde de kullanılan tek imidazoldür (20). *Candida* türleri ve *C. neoformans*'a karşı etkili olmakla birlikte, klinikte kullanımda olan triazollerle (flukonazol ve itrakonazol) karşılaştırıldığında etkisi sınırlı kalır (16). Toksikite potansiyeli, özellikle de hepatotoksikite, gastrik toksikite, testosteron, kortizol gibi hormonların düzeylerinde düşme gibi endokrinolojik yan etkiler ve daha az toksik alternatiflerinin olması nedeniyle günümüzde ketokonazol, nadiren kullanılmaktadır (17, 20).

Azol halkasında iki azot içeren imidazollerden sonra, daha geniş spektrumlu, yan etkileri daha az olan ve azol halkasında üç azot içeren triazoller geliştirilmiştir. 1990'da ilk kullanıma giren triazol **flukonazol**dür (20). Flukonazol yaygın olarak kandidozların tedavisinde kullanılır. Çoğu *Candida* türlerine ve *C. neoformans*'a etkilidir. *C. krusei* flukonazole intrensek olarak dirençlidir. *C. glabrata* izolatlarının bazıları doz bağımlı olarak flukonazole duyarlılık gösterirken, %15 kadarı gerçek direnç gösterebilir. Uzun süre flukonazol profilaksisi ya da tedavisi alan mukokutanöz kandidozlu hastalardan izole edilen *C. albicans* suşlarında da, flukonazol direnci

görülebilmektedir. Ancak sistemik enfeksiyonlarda flukonazole dirençli *C. albicans* oldukça nadirdir (16).

1992'de flukonazole göre daha geniş spektrumlu ikinci triazol, **itrakonazol** kullanıma girmiştir (19, 20). Flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* izolatları da dahil *Candida* türlerine etkilidir (16). Bu ilaç flukonazole göre daha geniş bir etki spektrumuna sahip olsa da oral alındığında biyoyararlılığının az olması kullanımını kısıtlamaktadır.

Flukonazol ve itrakonazol ile tatmin edici yanıtlara ulaşılamaması üzerine, yapılan çalışmalar sonunda ikinci jenerasyon triazol; vorikonazol, ravukonazol ve posakonazol geliştirilmiştir. 2002 yılında FDA tarafından onaylanan **vorikonazol**, flukonazolun ikinci kuşak sentetik derivativesidir. Flukonazole bir metil grubunun ilavesiyle 14- α -sterol demetilaza afinitesi artmış, bu sayede *Aspergillus* için fungisitik aktivite sağlanmıştır. Flukonazole kıyaslandığında vorikonazolün yaptığı inhibisyon daha güçlüdür ve doz bağımlıdır (21-24).

İlaç etkileşimleri ve yan etkileri açısından ideal bir azol değildir. Vorikonazol alan hastalarda infüzyonla ilişkili olarak hipokalemi ve dozla ilişkili geçici görsel bozukluklar yanında infüzyondan bağımsız görme halusinasyonları da rapor edilmiştir (20, 23, 24).

Posakonazol, itrakonazolün hidroksillenmiş derivativesidir. Etki spektrumu geniştir. *Candida* türlerine flukonazole karşılaştırıldığında en az 8 kat daha fazla etkili olduğu saptanmıştır. (20, 23). Ayrıca posakonazol sitokrom p450 3A4'ü selektif olarak inhibe ettiğinden, diğer yeni triazol türevleri gibi sitokrom p450 enzim aktivitesini inhibe etmez ve ilaç etkileşimleri daha azdır (25).

Hücre zarına etkili olan poliyen ve azol grubu antifungaller dışında son yıllarda, hücre duvarı sentezini inhibe eden ilaçlara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Mantar hücre duvarı glukan sentez inhibitörlerinin geliştirilmesiyle, antifungal kemoterapide önemli bir ilerleme sağlanmıştır. Bilinen (1,3)- β -D glukan sentetaz inhibitörleri; asidik terpenoidler, papulokandinler ve ekinokandinlerdir (26).

Ekinokandinler geniş etki spektrumlu lipopeptitlerdir. Glukan sentezini inhibe ederek mantar hücre duvarı sentezini engellerler. Sistemik kullanımında ciddi yan etkilere sebep olan ilk ekinokandin silofungindir. Birkaç yıl sonra ise yan etkisi az yeni ekinokandinler; kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin geliştirilmiştir. **Kaspofungin** bu nonkompetitif inhibitörlerin ilkidir ve pnömokandin B₀'ın semisentetik bir derivativesidir. Kaspofungin, erişkinde invazif kandidoz, orofaringeal ve özefagus kandidozu ve refrakter veya diğer tedavilere (amfoterisin B, lipit formları ve/veya itrakonazol) yanıtızsız hastalarda invazif aspergilloz tedavisi için FDA onayı almıştır. Ekinokandinler, *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı genelde etkili olmakla birlikte, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *Trichosporon* türlerine karşı sınırlı aktivite gösterirler. *C. neoformans* ve *Fusarium* türlerine karşı da aktivitesi pratik olarak yok veya oldukça sınırlıdır (16, 24, 26, 27).

Yeni ekinokandin türevlerinden mikofungin ve anidulafunginin *Candida* ve *Aspergillus* türleri ile azol dirençli *Candida* türlerine etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ilaçlarla ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir (24, 28, 29).

Antifungal Duyarlılık Testleri

Günümüzde mantar enfeksiyonlarının artması, yeni antifungal ilaçların ortaya çıkması ve antifungal ilaçlara karşı direnç gelişiminin başlaması nedeniyle güvenilir antifungal duyarlılık testleri giderek önem kazanmıştır (30-32).

Referans Antifungal Duyarlılık Yöntemleri: Antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyon çalışmaları 1980'li yılların başlarında başlamıştır. ABD'nde Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI), Avrupa'da The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önderliğinde çok sayıda çok merkezli ortak çalışmalar yapılmış ve hem sıvı ortamda hem de katı ortamda çalışabilen yöntemler üzerinde fikir birliği oluşturulmuştur (33-39). Tüm bu çabanın sonunda standartlaştırılan

antifungal duyarlılık testlerinden tedaviyi yönlendirme, yeni ilaç çalışmaları ve direnç epidemiyolojisini belirlemede yararlanılmaktadır.

Duyarlılık testlerinin en önemli hedefi tedaviye yön vermektir. *Candida* türleri için geliştirilmiş referans testler bu hedefi karşılamaya başlamıştır ve günümüzde hekimler antifungal duyarlılık testlerini rutin olarak kullanmaktadır (40). Yapılan bir çalışmada *C. glabrata* kandidemisinde antifungal duyarlılık sonuçları alındıktan sonra ekinokandin tedavisinden daha ekonomik olan flukonazol tedavisine geçmenin yararları vurgulanmakta ve kandidemilerde antifungal duyarlılık testlerinin kullanılabilirliği özetlenmektedir (41). Tablo-2'de antifungal duyarlılık testlerinin rutin kullanılması ile ilgili tavsiyeler görülmektedir (42).

Tablo-2: Antifungal duyarlılık testlerinin rutin kullanımı ile ilgili tavsiyeler.

• Kan veya steril bölgelerden izole edilen <i>C. glabrata</i> başta olmak üzere <i>C. albicans</i> dışı türlere uygulanmalı
• Klasik tedaviye yanıt vermeyen orofaringeal kandidoz olgularından izole edilen suşlar uygulanmalı
• Başlangıçtaki antifungal tedaviye yanıt vermeyen invazif hastalıklardan izole edilen tüm suşlara uygulanmalı
• Çapraz direnç belirlenmek istendiği zaman uygulanmalı ➢ Flukonazol dirençli <i>C. glabrata</i> 'da vorikonazol direncinin belirlenmesi
• Sık görülmeyen ve duyarlılık özelliği bilinmeyen izolatlarla uygulanmalı

Antifungal duyarlılık testlerinin bir diğer kullanım alanı epidemiyolojik çalışmalardır. Özellikle steril bölgelerden izole edilen suşların duyarlılık paternlerinin bilinmesi ampirik tedavilere yol gösterici olmakta ve bölgeler arası farklılıkları ortaya koymaktadır (43, 44).

Antifungal duyarlılıkta, en fazla kullanılan yöntem sıvı dilüsyon yöntemleridir. CLSI tarafından makro ve mikro dilüsyon yöntemi, EUCAST tarafından sadece mikrodilüsyon yöntemi referans yöntem olarak sunulmuştur (33, 39). Makrodilüsyon yönteminin daha fazla malzeme ve zaman harcatması nedeniyle günümüzde tercih edilen yöntem mikrodilüsyon yöntemi olmuştur. Her iki referans mikrodilüsyon yöntemi temelde birbirine çok benzemektedir. Her ikisi de RPMI 1640'ı besiyeri olarak kullanmakta ve 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) ile tamponlama yapmaktadır.

EUCAST tarafından önerilen mikrodilüsyon yönteminde ek olarak besiyerinin glikoz konsantrasyonu %2'ye artırılmıştır. İnoklum hazırlanması iki yöntemde de spektrofotometrik olup, miktar CLSI yönteminde $0.5-2.5 \times 10^3$ iken EUCAST yönteminde on kat fazla yaklaşık 10^4 civarındadır. Artırılmış glikoz konsantrasyonu ve inokulum miktarı EUCAST yönteminde sonuçların daha erken, 24 saat sonra okunmasını sağlamıştır. Her iki referans yöntemde de okuma gözle yapılmakta ve amfoterisin B için üremenin olmadığı son kuyucuk, azol ve ekinokandinler için ise üremenin %50 azaldığı son kuyucuk minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirilmektedir. İki referans yöntem birbirleriyle kıyaslandığında uyumlu sonuçların alındığı saptanmıştır (45, 46).

Disk difüzyon yöntemi katı besiyerleri kullanılarak yapılan bir duyarlılık yöntemidir ve CLSI tarafından *Candida* türleri için geliştirilmiş referans bir yöntem bulunmaktadır (36). Muller-Hinton agarda 35°C'da 24 saatlik inkübasyon sonunda zon çapları ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır.

Tablo-3'de mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemi için geçerli duyarlılık sınırları görülmektedir.

Tablo-3: *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara duyarlılık sınırları

İlaçlar	Duyarlılık kategorisi	CLSI $\mu\text{g/ml}$	EUCAST $\mu\text{g/ml}$	Zon çapı (mm)
Amfoterisin B	Duyarlı	-	≤ 1	-
	Dirençli	-	> 1	-
Flukonazol	Duyarlı	≤ 8	≤ 2	≥ 19
	Doza-bağılı duyarlı	16-32	-	15-18
	Dirençli	≥ 64	> 4	≤ 14
Itrakonazol	Duyarlı	≤ 0.12	-	-
	Doza-bağılı duyarlı	0,25-0.5	-	-
	Dirençli	≥ 1	-	-
Vorikonazol	Duyarlı	≤ 1	≤ 0.125	≥ 17
	Doza-bağılı duyarlı	2	-	14-16
	Dirençli	≥ 4	> 0.125	≤ 13
Kaspofungin	Duyarlı	≤ 2	-	≥ 11
	Duyarlı değil	≥ 4	-	≤ 10
Anidulofungin	Duyarlı	≤ 2	≤ 0.06	-
	Duyarlı değil	≥ 4	> 0.06	-

-: Henüz belirlenmemiş

Amfoterisin B için CLSI duyarlılık sınırlarını saptamamıştır. EUCAST ise $>1\mu\text{g/ml}$ değerleri dirençli kabul etmiştir (33,39). Azoller için doza bağlı duyarlı kavramı bulunmaktadır. Bu kategorideki suşlara ilaç dozu arttırıldığı zaman etkili olmak mümkündür (33). Ekinokandinlerde ise dirençli kavramı yerine duyarlı değil kavramı kullanılmaktadır. Ekinokandinlerin emniyetli ilaç kullanım aralığı tam bilinmediğinden direnç kavramının kullanılması doğru bulunmamıştır (33).

Antifungal duyarlılığı belirlemede kullanılan diğer yöntemler:

CLSI ve EUCAST tarafından önerilen makro ve mikro dilüsyon ve disk difüzyon referans yöntemleri yaygın kullanım alanı bulsa da yeni arayışlar her zaman devam etmiştir. En önemli sorun yeni bir sistemin standardizasyonunu sağlamaktır. Günümüzde E-test (AB Biodisk Solna, Sweden) Sensititre YeastOne Colorimetric System (TREK Diagnostic Systems, Inc, Cleveland, OH) ve VITEK 2 Yeast Susceptibility Test (BioMerieux, Inc, Durham, NC) kullanılması tavsiye edilen üç ticari sistemdir.

E-test yöntemi kantitatif bir difüzyon yöntemidir. Çeşitli konsantrasyonlarda antifungal ajan emdirilmiş plastik bir şeritten katı bir besiyerine ilacın difüzyonu sağlanarak, 24-48 saatlik inkübasyon sonunda elips şeklinde oluşan inhibisyon zonu ile MİK değerinin saptanması mümkün olur. Kolay ve pratik bir test olup, referans yöntemlerle yüksek düzeyde uyum gösteren sonuçlar bildirilmektedir (47-49). E-testin en önemli avantajı *Candida* türleri ve *C. neoformans*'da azalmış amfoterisin B duyarlılığını diğer yöntemlerden daha güvenilir olarak belirleyebilmesidir (50-53).

Sensititre YeastOne Colorimetric System, 96 kuyucuğu olan bir plak olup kuyucuklarda kuru şekilde değişik dilüsyonlarda antifungal maddeler ve kolorimetrik indikatör bulunmaktadır. *Candida* türleri ve *C. neoformans*'ın antifungal duyarlılığını test etmekte oldukça yararlı bir sistemdir. İnokulum süspansiyonunun kuyucuklara eklenmesinden 24 saat sonra sonuçlar okunabilir. Renk değişikliğinin olduğu ilk kuyucuk MİK olarak değerlendirilir. Kırmızı renk üremenin olduğunu, mor-mavi renk ise üremenin inhibe edildiğini gösterir (54, 55). Değişik çok merkezli çalışmalarda, bu sistemin

referans mikrodilüsyon yöntemiyle paralel olduğu ve yeni triazollerle %95, üç ekinokandinle %100 uyumlu olduğundan bahsedilmektedir (56, 57).

VITEK 2 Yeast Susceptibility Test, duyarlılığı spektrofotometrik olarak ölçen ilk tam otomatik ticari duyarlılık sistemidir. EUCAST mikrodilüsyon yöntemi ile entegre bir yöntemdir ve optimum standardizasyonu sağlanmıştır (58). Çok merkezli çalışmalar VITEK 2 sisteminin referans mikrodilüsyon yöntemi ile amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve flusitozin için uyumlu olduğunu göstermiştir (59, 60). Ayrıca bu sistem 12-15 saat sonra sonuç çıkarabilmektedir.

Bahsedilen bu üç ticari sistem dışında çok sayıda farklı sistemler de vardır. Ancak hiçbirinin tam standardizasyonu yapılmamış ve güvenilirlik kazanmamıştır. Bu nedenle rutinde kullanılmaları önerilmemektedir (31).

Bu çalışmada, 1995-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi SUAM'nde yatan hastalardan izole edilen *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece 11 yıllık period içinde hastanemizde izole edilen *Candida* türlerinin duyarlılığı hakkında bilgi edinilecek ve antifungal duyarlılık açısından epidemiyolojik veri sağlanarak ampirik tedavinin daha güvenilir yapılması sağlanacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

***Candida* İzolatları**

Bu çalışmada 1995-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi SUAM'nde yatan ve kandidemi tespit edilen hastaların izolatları çalışıldı. Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 22 Şubat 2011 tarih ve 2011-5/1 karar numarası ile alınan onay doğrultusunda yapıldı. Uludağ Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında -80°C'da uygun koşullarda saklanan izolatlar, çalışma yapılacağı zaman iki kez pasajlanarak saflığından emin olundu ve daha sonra yeniden identifikasyonu yapılarak doğrulandı. İdentifikasyon koloni morfolojisi, çimlenme borusu testi, klamidospore oluşumu ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API ID32C; Biomerieux, Fransa) ile yapıldı (9, 10). İzolatların antifungal duyarlılığı CLSI M27-A3 referans mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile tespit edildi ve kalite kontrol suşu olarak *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı (33).

Antifungal İlaçlar

Toz halinde saf amfoterisin B (sigma) ticari olarak alındı. Saf itrakonazol (Janssen Pharmaceutica), flukonazol (Pfizer Pharmaceuticals), vorikonazol (Pfizer Pharmaceuticals) ve kaspofungin (Merck Research Laboratories) üretici firmalardan potensi ve son kullanım tarihi belli olarak toz halinde temin edildi. Flukonazolün 5120 µg/ml'lik stok solüsyonu distile suda; diğer ilaçların 1600 µg/ml'lik stok solüsyonları dimetil sülfoksitte (DMSO, Merck) hazırlanarak -80°C'da saklandı (33).

CLSI M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi

Besiyerinin Hazırlanması: CLSI M27-A3 referans mikrodilüsyon yönteminde önerilen sentetik besiyeri L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren,

sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Sigma) olup içeriği tam bilinen sentetik bir besiyeridir. Bu çalışmada MOPS (0.165 mol/l) ile tamponlanan besiyerinin pH'ı, oda sıcaklığında 6.9-7.1 olacak tarzda 1M NaOH ile ayarlandı ve 0.2 µm çaplı filtrelerden süzülerek steril edildi. Bu şekilde hazırlanan besiyeri hem ilaç dilüsyonlarında hem de inokulum hazırlanmasında kullanıldı (33).

Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması: Mikrodilüsyon plağı olarak U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Bu plaklar, Uludağ Üniversitesi SUAM sterilizasyon ünitesinde etilen oksit ile steril edildi. Stok antifungal solüsyonlarının dilüsyonu CLSI M27-A3 dökümanında gösterildiği şekilde yapılarak (Tablo-4 ve 5) son konsantrasyon flukonazol için 0.250-128 µg/ml, diğer ilaçlar için 0.064-32 µg/ml olacak tarzda hazırlandı (33). Son konsantrasyonu hazırlanan antifungaller her yatay sıraya bir suş çalışması yapılabilecek ve her kuyucukta 100 µl olacak şekilde on kuyucuğa dağıtıldı. Onbirinci kuyucuk boş bırakıldı. Onikinci kuyucuğa ise üreme kontrolü için 100 µl besiyeri konuldu.

Tablo-4: CLSI M27-A3 referansına göre suda çözülen ilaçların dilüsyonlarının hazırlanması.

Tüp no	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Volüm (ml) + besiyeri (ml)		Ara konsantrasyon (µg/ml)	RPMI ile 1/5 dilüsyon (µg/ml)
1. tüp	5120	Stok	1	7	640	128
2. tüp	640	1. tüp	1	1	320	64
3. tüp	640	1. tüp	1	3	160	32
4. tüp	160	3. tüp	1	1	80	16
5. tüp	160	3. tüp	0.5	1.5	40	8
6. tüp	160	3. tüp	0.5	3.5	20	4
7. tüp	20	6. tüp	1	1	10	2
8. tüp	20	6. tüp	0.5	1.5	5	1
9. tüp	20	6. tüp	0.5	3.5	2.5	0.5
10. tüp	2.5	9. tüp	1	1	1.25	0.250

Tablo-5: CLSI M27-A3 referansına göre suda çözülmeyen ilaçların dilüsyonlarının hazırlanması.

Tüp no	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Volüm (ml)+DMSO (ml)		Ara konsantrasyon (µg/ml)	RPMI İle 1/50 dilüsyon (µg/ml)
1. tüp	1600	Stok			1600	32
2. tüp	1600	Stok	0,5	0,5	800	16
3. tüp	1600	Stok	0,5	1,5	400	8
4. tüp	1600	Stok	0,5	3,5	200	4
5. tüp	200	4. tüp	0,5	0,5	100	2
6. tüp	200	4. tüp	0,5	1,5	50	1
7. tüp	200	4. tüp	0,5	3,5	25	0,5
8. tüp	25	7. tüp	0,5	0,5	12,5	0,25
9. tüp	25	7. tüp	0,5	1,5	6,25	0,125
10. tüp	25	7. tüp	0,5	3,5	3,13	0,0625

Maya Süspansiyonunun Hazırlanması: Saflaştırılan ve yeniden tanımlanan *Candida* suşlarının 24 saatlik pasajlarından 5 koloni (koloni çapı yaklaşık ≥ 1 mm) öze ile alınarak, 5 ml steril serum fizyolojik içinde süspanse edildi. Süspansiyonun bulanıklık ayarı, McFarland 0.5 standardına göre 530 nm dalga boyunda filtre kullanılarak spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 20D, ABD) ile yapıldı. Bu şekilde $1-5 \times 10^6$ hücre/ml içeren maya stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok, RPMI 1640 sıvı besiyeri ile 1/1000 oranında sulandırılarak; $1-5 \times 10^3$ hücre/ml içeren inokulum elde edildi. Hazırlanan inokulum, içinde 2 kat seri dilüsyon şeklinde antifungal dağıtılmış mikroplaklara, her kuyucuğa 100 µl gelecek şekilde eklendi. Böylece son inokulum ve antifungal konsantrasyonları yarı yarıya sulandırılarak çalışma oranlarına indirildi (inokulum miktarı: $0.5-2.5 \times 10^3$, flukonazol dilüsyon aralığı: 0.125-64 µg/ml ve diğer ilaçların dilüsyon aralığı: 0.032-16 µg/ml). Mikroplaklar sarsmadan etüve kaldırılarak 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Hem 24. saate hem de 48. saate değerlendirme yapıldı (33).

Değerlendirme: Mikroplaklar, 24 ve 48 saatlik inkübasyonu takiben görsel olarak değerlendirildi. Kontrol kuyucuğuna göre üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuktaki konsantrasyon, amfoterisin B için MİK değeri (MİK-0) olarak belirlendi. Flukonazol, itraconazol, vorikonazol ve kaspofungin için ise

kontrol kuyucuğuna göre %50 azalmanın olduğu kuyucuk (MİK-2) MİK değeri olarak alındı. Her çalışmaya ATCC kalite kontrol suşları da dahil edildi (33).

E-Test Yöntemi

Antifungal Stripler: Antifungaller için E-test stripleri üretici firmadan (AB BIODISK Solna/İsveç) temin edildi. Kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

Besiyeri: E test için %2 agar ve %2 glikoz ilaveli RPMI 1640 besiyeri (pH=7.0) kullanıldı. MOPS tamponlu olarak üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanan besiyerleri, çapı 9 mm olan steril petrilere 25'er ml olacak şekilde dağıtıldı (49, 50).

Yöntem: Spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonları, steril eküviyonla besiyeri yüzeyine homojen olarak yayıldı. Yaklaşık 15 dakika kuruması beklendikten sonra üzerlerine E-test stripleri bir petri kutusuna iki strip olacak şekilde yerleştirildi. Değerlendirme 35°C'de 24 ve 48 saat inkübasyonu takiben yapıldı. Elips şeklindeki inhibisyon zonunun stripe birleştiği konsantrasyon, MİK olarak belirlendi (49, 50).

Çalışmanın Analizi

Mikrodilüsyon ve E-test sonuçları 24 ve 48. saatlerde okundu. MİK aralığı dışında kalan veriler (off-scale) de değerlendirmeye alındı. Küçük taraftaki MİK aralığı dışı değerler aynen bırakıldı; büyük taraftaki MİK aralığı dışı değerler ise bir üst dilüsyon değerine çevrildi (61). Amfoterisin B dışındaki antifungallerde duyarlılık değerleri belli olduğu için sonuçlar yüzdelenerek analiz edildi. Amfoterisin B için ise MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplandı. Her iki yöntem arasındaki uyuma ± 1 dilusyonda bakılarak uyumlu olan suşların sayısı yüzde olarak belirlendi. Ayrıca duyarlılık sınırları belirli olan ilaçlar için (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve Kaspofungin) duyarlılık uyumuna da bakıldı. Referans yöntemle duyarlı kabul edilen bir suşun E-test yöntemi ile dirençli olması durumu küçük hata,

referans yöntemle dirençli olan bir suşun E-test yöntemi ile duyarlı olması ise büyük hata olarak değerlendirildi (47, 48, 61)

BULGULAR

Kandidemi Etkekini Türlerin Dağılımı

1995-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi SUAM'de 655 erişkin ve çocuk hastada kandidemi saptanmıştır. Tablo-6'da çalışma dönemi içinde kandidemili hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin yıllara göre dağılımı görülmektedir. En fazla izole edilen tür % 42.7 oranla *C. albicans* olmuş, bunu *C. parapsilosis* (%20.9) izlemiştir. Sık görülen etkenler arasında; yıllar içinde *C. albicans* izolasyonunda artma, *C. krusei* izolasyonunda düşme olduğu saptanmış, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izolasyonlarında ise önemli değişiklik görülmemiştir. Çalışma dönemi içerisinde *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. inconspisua/norvagensis*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, *C. zeylanoides* seyrek görülen etkenler şeklinde izole edilmiştir. İzolatların %2.9'unda tür düzeyinde tanımlama yapılamamış ve hastaların %5.3'ünde birden fazla türle kandidemi gelişmiştir. Tablo-7'de birden fazla türle kandidemi gelişen hastalardaki tür dağılımı görülmektedir. Karışık üremesi olan hastaların 25 tanesinde (%71.4) en fazla izole edilen tür olan *C. albicans*'ın bulunduğu görülmüştür. Karışık üremeler de dikkate alındığında çalışma döneminde 655 hastadan 693 izolasyon olmuştur.

Çalışma döneminde saptanan tüm izolatların antifungal duyarlılığına bakmak mümkün olamamış ve 693 izolattan bulunabilen ve yeniden canlandırılabilen 444 (%64.1) izolatin antifungal duyarlılığı saptanmıştır. Tablo-8'de antifungal duyarlılığına bakılan izolatların tür dağılımı görülmektedir.

Tablo-6: 1995-2005 yılları arasında kandidemi etkeni olarak izole edilen türlerin dağılımı.

Yıllar	Ca	Cd	Cg	Cgu	Ci/n	Ckr	Ckef	Clip	Clus	Cp	Cpe	Ct	Cz	Miks	Cspp	Toplam
1995	14		1			4				8		3		3	2	35
1996	20					10			1	20		7		4	3	65
1997	17					9				20		2			1	49
1998	11		4	1	2	5		1	1	11		10		2	2	50
1999	18		2	1		11				13	1	8		2	1	57
2000	27		1			7	1			6	1	5		2	5	55
2001	32		3			4	4			10	5	10	1	6		75
2002	22		2	3		2				12	5	7		4		57
2003	31		1	1		1	1	1		7		4		5	5	57
2004	40	1	1			3		2		7	1	3		1		59
2005	48		2			3	3	4	1	23	1	5		6		96
Toplam	280	1	17	6	2	59	9	8	3	137	14	64	1	35	19	655
(%)	(42.7)	(0.15)	(2.6)	(0.92)	(0.3)	(9)	(1.4)	(1.2)	(0.46)	(20.9)	(2.1)	(9.8)	(0.15)	(5.3)	(2.9)	

Ca: *C. albicans*; Cd: *C. dubliniensis*; Cg: *C. glabrata*; Cgu: *C. guilliermondii*; Ci/n: *C. inconspicua/norvegensis*; Ckr: *C. krusei*; Ckef: *C. kefyr*; Clip: *C. lipolytica*; Clus: *C. lusitanae*; Cp: *C. parapsilosis*; Cpe: *C. pelliculosa*; Ct: *C. tropicalis*; Cz: *C. zeylanoides*; Miks; Birden fazla tür ile gelişen kandidemiler; Cspp: Tanımlanamayan *Candida* türü

Tablo-7: Birden fazla tür ile gelişen kandidemilerde dağılım.

Birden Fazla Tür ile Gelişen Kandidemiler	Hasta sayısı
<i>C. albicans</i> ve <i>C. parapsilosis</i>	10
<i>C. albicans</i> ve <i>C. tropicalis</i>	6
<i>C. albicans</i> ve <i>C. glabrata</i>	2
<i>C. albicans</i> ve <i>C. guilliermondii</i>	1
<i>C. albicans</i> ve <i>C. pelliculosa</i>	1
<i>C. albicans</i> ve <i>C. spp</i>	2
<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i>	1
<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. pelliculosa</i>	1
<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i>	1
<i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. tropicalis</i>	3
<i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. kefyri</i>	1
<i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. krusei</i>	1
<i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. famata</i>	1
<i>C. tropicalis</i> ve <i>C. kefyri</i>	2
<i>C. guilliermondii</i> ve <i>C. krusei</i>	1
<i>C. krusei</i> ve <i>Trichosporon spp</i>	1
TOPLAM	35 hasta

Tablo-8: Antifungal duyarlılık çalışılan izolatlardaki tür dağılımı

Yıllar	Ca	Cd	Cg	Cgu	Ci/n	Ckr	Ckef	Clip	Clus	Cp	Cpe	Ct	Toplam
1995	16		1			1				6		2	26
1996	17					3	1		1	21		4	47
1997	7					6				15		1	29
1998	4		3	1	2	2			1	11		6	30
1999	14		1	1		5				13		4	38
2000	17					4				4		3	28
2001	23		2			5	1			10	1	7	48
2002	17		1	3		3				11		5	40
2003	28		1			1				8		4	42
2004	41	1	1			3		2		7	1	3	59
2005	30		4	1		1	1	2		18			57
Toplam	214	1	14	5	2	34	3	4	2	124	2	39	444
(%)	(48.2)	(0.2)	(3.1)	(1.1)	(0.4)	(7.7)	(0.7)	(0.9)	(0.4)	(27.9)	(0.4)	(8.8)	

Ca: *C. albicans*; Cd: *C. dubliniensis*; Cg: *C. glabrata*; Cgu: *C. guilliermondii*; Ci/n: *C. incons/norvegensis*; Ckr: *C. krusei*; Ckef: *C. kefir*; Clip: *C. lipolytica*; Clus: *C. lusitaniae*; Cp: *C. parapsilosis*; Cpe: *C. pelliculosa*; Ct: *C. tropicalis*

Amfoterisin B duyarlılığı

Candida türlerinde amfoterisin B duyarlılığı için belirlenmiş sınır değerler olmadığından bu çalışmada amfoterisin B için hem mikrodilüsyon hem de E-test yönteminde MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri saptanmıştır. Tablo-9'da 24 saatlik inkübasyon sonunda Tablo-10'da ise 48 saat inkübasyon sonunda bulunan değerler görülmektedir. Uzamış inkübasyonda her iki yöntemde de MİK değerlerinde genellikle bir dilüsyonluk artış saptanmıştır. En fazla değişim E-test yönteminde *C. parapsilosis* duyarlılığında olmuştur. Her iki saatlik inkübasyonda da beklendiği gibi E-test ile daha düşük ve daha geniş aralıkta MİK değerleri elde edilmiş ve >1µg/ml MİK değerlerine sadece *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarında rastlanılmıştır. Genel olarak iki yöntem arası uyum kötü olup, en iyi sonuçlar *C. krusei* ve *C. glabrata*'da alınmıştır.

Tablo-9: Amfoterisin B duyarlılığı (24 saat inkübasyon)

Tür (n)	Mikrodilüsyon			E-test			% uyum (±1 dilüsyon)
	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	
Ca (214)	0,125-2	0.5	1	≤0.032-1	0.064	0.25	%14.4
Cp (124)	0,125-2	0.5	1	≤0.032-1	≤0.032	0.25	%18.5
Ct (39)	0,125-2	0.5	1	≤0.032-0.5	0.125	0.25	%23.1
Ckr (34)	0,25-2	1	2	≤0.032-8	0.5	1	%23.5
Cg (14)	0,25-2	1	2	≤0.032-2	0.125	0.5	%42.9
Diğerleri (19)	0.125-2	0.25	1	≤0.032-0.5	0.064	0.5	%32
Tümü (444)	0,125-2	0.5	1	≤0.032-8	0.064	0.5	%18.8

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ckr: *C. krusei*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Tablo-10: Amfoterisin B duyarlılığı (48 saat inkübasyon).

Tür (n)	Mikrodilüsyon			E-test			% uyum (±1 dilüsyon)
	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	
Ca (214)	0,125-4	0.5	2	≤0.032-1	0.064	0.25	%10.3
Cp (124)	0,125-4	1	2	≤0.032-1	0.25	0.5	%15.6
Ct (39)	0,125-2	1	2	≤0.032-0.5	0.25	0.5	%21.6
Ckr (34)	0,25-2	2	2	≤0.032-8	0.5	2	%52.9
Cg (14)	0,25-2	1	2	≤0.032-4	0.25	0.5	%33.3
Diğerleri (19)	0.125-2	0.25	1	≤0.032-1	0.125	0.5	%19.3
Tümü (444)	0,125-4	1	2	≤0.032-8	0.125	0.5	%17.1

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ckr: *C. krusei*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Diğer Antifungallerde Duyarlılık

Flukonazol, itraconazol ve vorikonazol bu çalışmada değerlendirilen duyarlılık sınırları belli azol grubu antifungallardır ve tablo 11-13'de mikrodilüsyon yöntemi ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlar görülmektedir. *C. krusei* ve *C. incospicua/norvagensis* flukonazole interensek dirençli olduğu için değerlendirilmeye alınmamıştır. Flukonazol duyarlılığında *C. parapsilosis*'deki hafif bir düşme dışında 24. ve 48. saat okumalarında bir fark saptanmamıştır. Toplam direnç %1.2 olarak bulunmuştur (Tablo-11). İki *C. glabrata*, iki *C. albicans*, bir *C. parapsilosis* suşlarında direnç saptanmıştır. Itraconazolda direnç flukonazole göre daha yüksek saptanmış ve 48. saat okumada direncin arttığı görülmüştür (Tablo-12). Azoller içinde en iyisi vorikonazol olup 24. saat okumada dirençli suşa rastlanmazken, 48. saat okumada bir *C. glabrata* suşunda direnç görülmüştür (Tablo-13) ve bu suş diğer bütün azollere de dirençli olan suştur.

Tablo-11: Flukonazol duyarlılığı.

İzolatlar	24 saat inkübasyon			48 saat inkübasyon		
	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)
Ca (214)	%98.6	%0.5	%0.9	%98.6	%0.5	%0.9
Cp (124)	%88.1	%11.1	%0.8	%84.7	%14.5	%0.8
Ct (39)	%100	-	-	%100	-	-
Cg (14)	%78.6	%7.1	%14.3	%78.6	%7.1	%14.3
Diğerleri (17)	%100	-	-	%100	-	-
Tümü (408)	%95	%3.8	%1.2	%94	%4.8	%1.2

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Tablo-12: Itrakonazol duyarlılığı.

İzolatlar	24 saat inkübasyon			48 saat inkübasyon		
	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)
Ca (214)	%90.3	%8.3	%1.4	%87	%10.7	%2.3
Cp (124)	%75.4	%20.6	%4	%71.8	%25.8	%2.4
Ct (39)	%79.5	%17.9	%2.6	%70.3	%21.6	%8.1
Ckr (34)	%9.7	%61.3	%29	%11.8	%41.2	%47
Cg (14)	%42.9	%21.4	%35.7	%33.3	%33.3	%33.3
Diğerleri (19)	%82	%14	%4	%82	%14	%4
Tümü (444)	%77.2	%17.5	%5.3	%73.7	%18.9	%7.4

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ckr: *C. krusei*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Tablo-13: Vorikonazol duyarlılığı.

İzolatlar	24 saat inkübasyon			48 saat inkübasyon		
	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	DBD (%)	Dirençli (%)
Ca (214)	%100	-	-	%100	-	-
Cp (124)	%100	-	-	%100	-	-
Ct (39)	%100	-	-	%100	-	-
Ckr (34)	%100	-	-	%100	-	-
Cg (14)	%100	-	-	%91.7	-	%8.3
Diğerleri (19)	%100	-	-	%100	-	-
Tümü (444)	%100	-	-	%99.8		%0.2

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ckr: *C. krusei*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Kaspofungin duyarlılık sınırları belli bir ekinokandindir. Tablo-14'de mikrodilüsyon yöntemi ile 24. ve 48. saatte alınan sonuçlar görülmektedir. Azollerden vorikonazol gibi kaspofungin de çok etkili bulunmuş ve 24. saat okumasında tüm suşlar duyarlı iken 48. saat okumada sadece bir *C. guilliermondii* suşu duyarlı bulunmamıştır.

Tablo-14: Kaspofungin duyarlılığı.

İzolatlar	24 saat inkübasyon		48 saat inkübasyon	
	Duyarlı (%)	Duyarlı değil (%)	Duyarlı (%)	Duyarlı değil (%)
Ca (214)	%100	-	%100	-
Cp (124)	%100	-	%100	-
Ct (39)	%100	-	%100	-
Ckr (34)	%100	-	%100	-
Cg (14)	%100	-	%100	-
Diğerleri (19)	%100	-	%95.4	%4.6
Tümü (444)	%100	-	%99.8	%0.2

Ca: *C. albicans*; Cg: *C. glabrata*; Ckr: *C. krusei*; Cp: *C. parapsilosis*; Ct: *C. tropicalis*

Referans yöntem ve E -test yöntemi ile alınan sonuçların ± 1 dilüsyonda uyumunu Tablo-15'de özetlenmiştir. En iyi uyum vorikonazol ile elde edilmiştir. İkinci okumalarda (48. saat) azollerde uyumda hafif bir azalma olurken, kaspofunginde hafif bir artış saptanmıştır.

Tablo-15: Referans yöntem ve E-test yönteminin ± 1 dilüsyonda uyumu

Antifungaller	± 1 dilüsyonda uyum (%)	
	24 saat inkübasyon	48 saat inkübasyon
Flukonazol	74.5	66.2
İtrakonazol	68	65.9
Vorikonazol	87.6	79.3
Kaspofungin	59.3	64.9

Duyarlılık kategorilerine göre uyuma bakıldığında iki yöntem arasında her iki inkübasyon süresinde ilaçların hiçbirinde büyük uyumsuzluk olmamıştır. Küçük uyumsuzluk sadece flukonazol (24 saat inkübasyonda: %1.3; 48 saat inkübasyonda: %1.6) ve itrakonazolde (24 saat inkübasyonda: %5.4; 48 saat inkübasyonda: %5.6) rastlanılmış, vorikonazol ve kaspofunginde görülmemiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnvazif kandidoz hayatı tehdit eden en önemli mantar hastalığıdır ve kandidemiler bütün invazif olguların büyük bir kısmını oluşturur. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) kriterlerine göre tek bir pozitif kan kültürü invazif mantar enfeksiyonunu kanıtlamaya yeterlidir (62). *Candida* türlerine bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının giderek arttığı birçok çalışmada belirtilmekte ve bu artışın değişik faktöre bağlı olduğu vurgulanmaktadır (63). Modern tıptaki gelişimlere paralel olarak yoğun bakım ve immun baskılanmış hastaların yaşam sürelerinin uzaması bu artışın en önemli nedenini oluşturur. Nozokomiyal kan dolaşımı etkenleri arasında *Candida* türleri %8-10 görülme sıklığı ile dördüncü sırada yer almaktadır (7, 8).

Kandidemilere farklı *Candida* türleri yanısıra en fazla *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* sebep olmaktadır. Bu çalışmada da 10 yıllık dönem içinde izole edilen suşların (karışık üremelerde dahil edildiğinde) yaklaşık %90 kadarını bu beş tür oluşturmuştur. *C. albicans* en fazla izole edilen (%42.7) türdür. Çalışmaların hemen hemen tamamında da en fazla izole edilen tür olup, %37'lik izolasyonla en düşük Latin Amerika, %70'lik izolasyonla en yüksek Norveçte bulunmuştur (63).

Deri ve mukozalara yerleşerek daha çok ekzojen enfeksiyonlara sebep olan *C. parapsilosis* bu çalışmada ikinci sıklıkta görülmektedir. Kataterlerde biyofilm oluşturarak etkili olan ve katater bakımı sırasında eller aracılığı ile hastadan hastaya yayılabilen bu tür önemli bir nozokomiyal patojendir. Bu çalışmada %21'e yakın izolasyonu olmuştur. Özellikle pediatri hastalarında daha fazla sorun oluşturmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, çocuklarda gelişen kandidemilere %37 oranında *C. parapsilosis*'in sebep olduğu bildirilmiştir (64).

Üçüncü sıklıkta izole edilen *C. tropicalis*'in görülme oranı Latin Amerika hariç diğer birçok ülke ile benzerlik göstermektedir. İlginç bir şekilde Latin Amerika ülkelerine *C. tropicalis* izolasyonu %20'lere ulaşmaktadır (63).

Çalışma döneminde %9 oranında saptanan *C. krusei* izolasyonu biraz yüksek olarak bulunmuştur. Çoğu çalışmada *C. krusei*'nin %2-4 oranında görüldüğünden bahsedilmektedir (63). Ancak tablo-6 incelenecek olursa son yıllarda izolasyonunun düştüğü anlaşılmakta ve oranı yükseltenin ilk yıllarda Pediatri Kliniğinde görülen küçük epidemilerin olduğu düşünülmektedir.

ABD'de, *C. albicans* dışı en önemli kandidemi etkeni hiç şüphesiz *C. glabrata*'dır. Epidemiyolojik çalışmalarda %20-24 görülme oranı ile ikinci sırada yer almakta olup, flukonazole ve çapraz olarak vorikonazole dirençli olabilmesi nedeniyle bu yüksek izolasyon oranı önemlidir (63). Bununla beraber *C. glabrata* diğer ülkelerde bu kadar yüksek oranlarda görülmemektedir. Latin Amerikada %4-7 oranında saptanmıştır (65). Bizde saptanan izolasyon oranı Latin Amerika'dan bile düşük olup (%2.6), ülkemizde yapılmış farklı bir çalışma ile benzerlik göstermektedir (66).

Mantar enfeksiyonlarında uzunca bir süre tek ilaç olarak kullandığımız amfoterisin B yanısıra günümüzde daha birçok alternatifler bulunmaktadır. Birinci ve ikinci jenerasyon triazol ve ekinokandinler kandidemilerde kullanılabilir oldukça iyi alternatifler olup, ilaç sayısının artması antifungal duyarlılık testlerinin önemini arttırmıştır. Kan ve steril vücut sıvılarından izole edilen başta *C. glabrata* olmak üzere, *C. albicans* dışı tüm *Candida* türlerine *in vitro* duyarlılığın yapılması önerilmektedir (42).

Bu çalışma da 444 *Candida* izolatının, amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin duyarlılığına iki farklı yöntemle bakılmıştır. CLSI mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi kullanılan iki yöntem olup, sonuçlar hem 24. saatte hem de 48. saatte okunmuştur. Hiç şüphesiz ki sonuçları erken okumanın pratik yararı çok fazladır. CLSI mikrodilüsyon yönteminde sadece ekinokandinlerin 24 saat sonra değerlendirilmesi uygun görülürken diğer ilaçlar için 48 saat sonra okuma önerilmektedir (33). Bu çalışmada 48. saatte tüm ilaçların MİK değerlerinde hafif bir yükselme saptanmış olmakla beraber duyarlılık özelliğini değiştirecek

bir fark olmamıştır (Tablo 10-14). Bunun ötesinde azollerde MİK değerini belirlemek, kısmi üreme inhibisyonu (trailing) nedeniyle güçtür ve 48. saatte bu daha da zor olmaktadır. Özellikle *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşlarında kısmi üreme inhibisyonu çok olduğundan 24. saat okuma önemlidir (67).

Amfoterisin B geniş spektrumlu fungusitik aktivitesi olan bir antifungal olduğundan ampirik tedavide en fazla tercih edilen ilaçtır. *Candida* türleri arasında amfoterisin B direnci nadir olarak düşünülmeyle beraber *C. lusitanae* başta olmakla beraber bazı suşlarda bildirilmiştir (68, 69). Ne yazık ki CLSI referans yöntemi ile çok dar aralıklarda MİK değeri elde edilmekte ve duyarlı ve dirençli suşları birbirinden ayırmak ve direnç sınırlarını belirlemek mümkün olamamaktadır (33, 70). Ancak E-test yöntemi ile daha geniş aralıkta MİK değerleri saptamak mümkün olmuş ve amfoterisin B duyarlılığını tespit ederken E-testin uygulanması önerilmiştir (70-73). Bu çalışmada da gerçekten E-test ile daha geniş aralıkta MİK değerleri elde edilmiştir.

Her ne kadar amfoterisin B için sınır değerler belirtilmemişse de EUCAST yönteminde ve E-test çalışmalarında $>1\mu\text{g/ml}$ değerlerin sorunlu olduğu ve direnç kabul edilebileceği belirtilmektedir (39, 46). Goldman ve ark (74) $>1\mu\text{g/ml}$ MİK değeri olan bir suşla enfeksiyon olduğu zaman daha yüksek doz amfoterisin B gerektiğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada sadece *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarında $>1\mu\text{g/ml}$ MİK değerleri elde edilmiş ve literatür bilgisi ile uyumlu bulunmuştur (63).

CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile E-test yöntemi arasındaki uyum, amfoterisin B için yüksek bulunmamıştır. Bunun nedeni bahsedildiği gibi mikrodilüsyon yöntemindeki dar MİK aralığıdır. Bu nedenle amfoterisin B duyarlılığına bakarken E-test yönteminin tercih edilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Azol grubu antifungallerden bu çalışmada flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol duyarlılığına bakılmıştır. Beklendiği gibi en yüksek duyarlılık vorikonazol ile elde edilmiştir (23). Birinci okumada hiçbir izolatta direnç saptanmamışken, 48. saatte sadece bir *C. glabrata* suşunda direnç belirlenmiştir. Bu suş aynı zamanda flukonazol ve itrakonazole de dirençli bir suştur ve çapraz dirence güzel bir örnek oluşturmaktadır (75). *C. krusei* flukonazole interensek dirençli bir tür olduğundan flukonazol direnç oranları

hesaplanırken bu tür hariç bırakılmıştır. *C. krusei* hariç bırakıldığında flukonazole direnç bu çalışmada %1.2 olarak bulunmuştur ve literatürler uyumludur (63). *C. glabrata* suşlarında %14.3 oranında saptanan direnç ABD'den bildirilen %20-25 oranındaki dirence göre daha düşüktür (63, 75). Flukonazole interensek dirençli olan *C. krusei* suşlarının tamamı vorikonazole duyarlı bulunmuştur. Ancak iki *C. albicans* suşuda flukonazole direnç olması ve bu direncin E-test ile doğrulanması bu çalışmada ortaya çıkmış en kötü sonuçtur. Bilindiği gibi AIDS ve kronik mukokutanöz kandidozlu hastaların orofaringeal izolatları dışında *C. albicans*'da flukonazol direnci çok nadirdir (76, 77). Bununla beraber flukonazole dirençli *C. albicans* izolatlarında vorikonazol direnci saptanmamıştır. Bir *C. parapsilosis* suşunda flukonazol direnci her iki yöntemle de gösterilmiştir. Bu izolat da vorikonazole duyarlıdır. Sonuçta beş flukonazole dirençli suştan sadece bir tanesinin vorikonazole de dirençli olması çapraz direncin %20'lerde olduğunu göstermiş ve çapraz direncin literatüre göre biraz daha düşük olmasının sevindirici bir bulgu olduğu düşünülmüştür (75).

Azol grubu antifungallerde her iki yöntem arasındaki uyum 24. saatte daha iyi bulunmuş ve 48. saatte üremenin kısmi inhibisyonu nedeniyle biraz düştüğü düşünülmüştür. E-test yöntemi ile duyarlı, referans yöntemle dirençli büyük uyumsuzluğun olmaması E-test yönteminin kullanılabilirliğini göstermiş ve literatürle uyumlu bulunmuştur (45-51).

Bu çalışmada ekinokandin grubu antifungallerden kaspofungin duyarlılığına bakılmıştır. CLSI dökümanında MİK değeri $>2\mu\text{g/ml}$ olduğu zaman suşun duyarlı olmadığı yorumunun yapılması önerilmektedir (33). Bu çalışmada bu öneri dikkate alındığında sadece bir *C. guilliermondii* suşunda $>2\mu\text{g/ml}$ MİK elde edilmiş, diğer bütün suşlar duyarlı bulunmuştur. Ekinokandinlerin güvenilir kullanım sınırları tam bilinmediğinden direnç kavramı tam oturmamıştır. Bu nedenle yüksek MİK değerinde duyarlı değil denmektedir. *C. guilliermondii* suşlarının yüksek MİK değerleri oluşturdukları literatürde belirtilmektedir. *C. parapsilosis* suşlarında da yüksek MİK'lerden bahsedilmekle birlikte bu çalışmada $>2\mu\text{g/ml}$ değer saptanmamıştır (16). Vorikonazol ile beraber en duyarlı ilaç olarak kaspofungin bulunmuştur. *In*

vitro sonuçlara ek olarak, kaspofungin hem fungisitik hem de hücre duvarına etkili olduğundan kandidozlarda tercih edilen ilaç olmuştur (16, 44).

Kaspofungin için iki yöntem arasındaki uyum bu çalışmada çok iyi bulunmamıştır. Bununla beraber büyük uyumsuzluk söz konusu değildir. Bu nedenle zorda kalındığında E-testten de yararlanılabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada beş antifungalın 444 kandidemi etkeni olarak izole edilen suşlara etkinliğine bakılmıştır.

- En etkin ilaçların vorikonazol ve kaspofungin olduğu;
- İki *C. albicans*, iki *C. glabrata*, bir *C. parapsilosis* suşunda flukonazol direnci olduğu;
- Flukonazole dirençli suşlarda sadece bir *C. glabrata* suşunda vorikonazol direnci olduğu;
- Amfoterisin B duyarlılığında E-test yönteminin daha iyi olduğu;
- *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarında yüksek amfoterisin B MİK'leri olabileceği saptanmıştır.

In vitro antifungal testleri günümüzde hem rutin hizmet açısından, daha önemlisi epidemiyolojik veri elde etmek açısından büyük hastanelerin laboratuvarlarında yapılması gereken testler haline gelmiştir. E-test referans yöntemine hızlı bir alternatif olabilir.

KAYNAKLAR

1. Ener B. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak mantarlar. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 1123-8.
2. Toscano CM, Jarvis WR. Epidemiology and clinical aspects of unusual fungal nosocomial infections. *NFID* 1999; 2:1-7.
3. Eggiman P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosupressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:685-702.
4. Rolston K. Overview of systemic fungal infections. *Onkology* 2001; 15:11-4.
5. Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995–2005. *Current Infectious Diseases Report* 2005; 7: 429–39.
6. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalın H, et al. Epidemiology of nosocomial candidemia in a Turkish University Hospital: 12-year study. *Epidemiology and Infection* 2010; 138: 1328-35.
7. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infectious Diseases* 2003; 3:685–702.
8. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *CMR* 1996; 9:499–511.
9. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edition. Washington DC: ASM press; 2007. 1762-88.
10. Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (eds). *Atlas of clinical fungi*. 3rd edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2009.
11. Tümbay E. *Candida* türleri. In: Ustaçelebi Ş (ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 1081-6.
12. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. London: Churchill Livingstone; 2010. 3225-40.
13. Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1073-80.
14. Pauw BE. Is there need for new antifungal agents? *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:23-8.
15. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: time for a new 'gold standard'. *Clin Infect Dis* 2003; 37:415-25.
16. Arıkan S, Rex JH. Antifungal agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. Washington DC: ASM Press; 2007. 1949-60.
17. Kayaalp SO. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Kayaalp SO (ed). *Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık; 2002. 301-9.
18. Töre O. Antifungal ilaçlar. Kılıçturgay K (editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Bursa: Güneş Kitabevi; 1994. 380-91.

19. Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000; 30:653-7.
20. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (suppl 1): S1-10.
21. Purkins L, Wood N, Greenhalg K, Allen MJ, Oliver SD. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56:17-23.
22. Öztürk R. Vorikonazol: Mikrobiyolojik ve farmakolojik özellikler. *Flora* 2005; 10 (Ek 2): E1-11.
23. Johnson LB. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 2003; 36:630-7.
24. Uzun Ö. Antifungal tedavide yenilikler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2003; 7:5-10.
25. Herbrecht R. Posaconazole: a potent, extended spectrum triazole antifungal for the treatment of serious fungal infections. *Int J Clin Pract* 2004; 58:612-24.
26. Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1445-57.
27. Sable CA, Nguyen BYT, Chodakewitz JA, DiNubile MJ. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. *Transpl Infect Dis* 2002; 4:25-30.
28. Pettengell K, Mynhardt J, Kluyts T, Lau W, Facklam D, Buell D. Successful treatment of oesophageal candidiasis by micafungin: a novel systemic antifungal agent. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:475-81.
29. Pfaller MA. Anidulafunin: an echinocandin antifungal. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13:1183-97.
30. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 (Suppl 1):S13-5.
31. Pfaller, MA. New developments in the antifungal susceptibility testing of *Candida*. *Curr Fungal Infect Reports* 2008; 2:125-7.
32. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 2002; 35:982-5.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, CLSI document M27-A3. 3rd edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; informational supplement, CLSI document M27-S3. 3rd edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, CLSI document M38-A2. 2nd edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, CLSI document M44-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

37. Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; informational supplement, CLSI document M44-S2. 2nd edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; Proposed guideline. CLSI document M51-P. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
39. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 398–405.
40. Baddley JW, Patel M, Jones M, et al. Utility of real-time antifungal susceptibility testing for fluconazole in the treatment of candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50:119-22.
41. Collins CD, Eschenauer GA, Salo SL, Newton DW. To test or not to test: a cost minimization analysis of susceptibility testing for patients with documented *Candida glabrata* fungemias. J Clin Microbiol 2007; 45:1884-89.
42. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009; 48:503-11.
43. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. J Clin Microbiol 2010; 48: 1366-77.
44. Pfaller MA; Boyken L, Hollis RJ, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. J Clin Microbiol 2008; 46:3184-5.
45. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, et al. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cut-off values. J Clin Microbiol 2011; 49:845-50.
46. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol 2010; 48:1592-9.
47. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, Baere TD, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test and disk diffusion for application in the routine laboratory. J Clin Microbiol 2002; 40:918-21.

48. Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the E-test and disk diffusion methods determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1875-80.
49. Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A, Odds FC, Rex JH. Multisite reproducibility of the E-test MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1691-3.
50. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2520-2.
51. Lozano-Chiu M, Paetznick VL, Ghannoum MA, Rex JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:2817-21.
52. Cornelius J, Nguyen C, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1289-90.
53. Peyron F, Favel A, Nguyen AM, Gilly M, Regli P, Bolmström A. Improved detection of amphotericin B resistant isolates of *Candida lusitanae* by E-test. *J Clin Microbiol* 2001; 39:339-42.
54. Pfaller MA, Jones RN, Microbiology Resource Committee, College of American Pathologists. Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: report from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program (2001-2003). *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130:767-75.
55. Morace G, Amato G, Bistoni F, et al. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-a broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2953-9.
56. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:4577-9.
57. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, et al. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2155-8.
58. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:467-72.

59. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45:796-802.
60. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3522-7.
61. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1440-6.
62. de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *CID* 2008; 46: 1813–21.
63. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *CMR* 2007; 20: 133–163.
64. Bakır M, Çerikçioğlu N, Barton R, Yağcı A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *APMIS* 2006; 114:601–10.
65. Colombo AL, Hadley S, Martinez JA et al. Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2816–23.
66. Yapar N, Uysal Ü, Yücesoy M, Çakır N, Yüce A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish university hospital. *Mycoses* 2005; 49: 134–138.
67. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 153-6.
68. Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 213-20.
69. Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, Rinaldi MG, Guerra C. Mycoses caused by *Candida lusitanae*. *Rev Infect Dis* 1987; 9:1006-12.
70. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998; 177: 425-30.
71. Rex JH, Cooper CR, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B resistant *Candida* isolates in a broth based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:906-9.
72. Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Moller N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 521-6.

73. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2520-2.
74. Goldman M, Pottage JC Jr, Weaver DC. *Candida krusei* fungemia. Report of 4 cases and review of the literature. *Medicine* 1993; 72: 143-50.
75. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. tested by Clinical and Laboratory Standards Institute – recommended broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 70–75.
76. St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 949-53.
77. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-58.

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki hem öğrencilik hem de uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof Dr Okan Töre'ye, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof Dr Güher Göral'a, her konuda ilgisini ve desteğini gördüğüm tez danışmanım sayın Prof Dr Beyza Ener'e, yetişmemde emekleri olan hocalarım Prof Dr Suna Gedikoğlu'na, Prof Dr Safiye Helvacı'ya, Prof Dr Reşit Mıstık'a, Prof Dr Halis Akalın'a, Prof Dr Barbaros Oral'a, Doç Dr Cüneyt Özakin'a, Doç Dr Yasemin Heper'e, Doç Dr Melda Sınırtaş'a, Doç Dr Emel Yılmaz'a, Uzm Dr Sevim Akçağlar'a, Uzm Dr Oktay Alver'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın diğer tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca buraya kadar gelmemde büyük emeği olan aileme, her zaman desteğini ve sevgini yanıbaşımnda hissettiğim eşim Tülin Özkan'a ve bir gülüşünün bana her şeyi unutturduğu canım oğlum Baybars Özkan'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

20.09.1973 tarihinde Ereğli'de doğdum. İlköğrenimimi Sümer İlkokulu'nda, orta öğrenimimi Ereğli Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladım. Eğitimime 1990 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde devam ettim. 1998 yılında mezun olduktan sonra Bartın İli Ulus İlçesi Zafer Sağlık Ocağı Tabibliği'ne atandım.2001-2004 yıllarında Afyon İli Dinar İlçesi Sağlık Ocağı Tabibliği, 2004-2006 yılında Trabzon İli Sürmene İlçesi Sağlık Ocağı Tabibliği'nde görevime devam ettim. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım. Evliyim, bir çocuk babasıyım.