

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA
TÜRLERİNİN FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON
YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Gonca AYDEMİR**

**Danışman
Prof. Dr. A. Nedret KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSY-11-3704 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Gonca AYDEMİR

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kan Kùltürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemiyle Tanımlanması Ve Antifungal Duyarlılıklarının Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Gonca AYDEMİR

Danışman
Prof.Dr.A.Nedret KOÇ

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.A.Hüseyin KILIÇ

Prof.Dr.A.Nedret KOÇ Danışmanlığında **Gonca AYDEMİR** tarafından hazırlanan “**Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemiyle Tanımlanması Ve Antifungal Duyarlılıklarının Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../ 2015

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof.Dr.A.Nedret KOÇ (Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Üye : Doç.Dr.M.Altay ATALAY (Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Üye : Doç.Dr.Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK (Recep Tayip Erdoğan Ün.
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sűresince bilgi ve desteęini esirgemeyen deęerli hocalarım Prof. Dr. A.Nedret KOÇ ve Doç. Dr.M.Altay ATALAY'a, laboratuvar çalıŐmalarında yardımlarını esirgemeyen Mikoloji laboratuvarındaki arkadaşlarıma, Dr.Filiz TEKİNŐEN'e ve emeęi geçen dięer bűtűn hocalarıma teŐekkűr ederim. Yűksek Lisans eęitimim sırasında her zaman bűyűk destekleri olan aileme ve eŐim Dr.Uęur AYDEMİR'e teŐekkűr ederim.

Gonca AYDEMİR

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gonca AYDEMİR

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2015
Danışman: Prof.Dr.A.Nedret KOÇ**

ÖZET

Son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde kalan, organ nakli yapılan, immunosupresif tedavi alan ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanan hastaların sayısının artması sistemik kandidoz insidansını artırmıştır. Kandidoz içinde de en sık görülen klinik gösterge kandidemidir.

Bu çalışmada; kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, Peptid nükleik asit fluoresan in situ hibridizasyon (PNA FISH), kromojenik agar yöntemlerinin değerlendirilmesi ve suşların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi, referans mikrodilüsyon ve Etest yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Temmuz 2011 - 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısıyla takip edilen ve kan kültüründe maya üreyen 50 hasta çalışmaya alındı. Üreyen *Candida* suşlarının tanımlanması; makroskobik morfolojisi ve mikroskobik morfolojisi için lam kültürü, germ tüp testi, sikloheksimid hassasiyeti, üreaz testi, karbonhidrat asimilasyonu testi için API 20C AUX (Biomerieux) testleri göre yapıldı. Kromojenik besiyeri olarak Brilliance™ *Candida* Agar (Oxoid, England) kullanıldı. PNA FISH yöntemi için Yeast Traffic Light® PNA FISH® (AdvanDx, USA) kiti kullanıldı. Çalışmaya alınan *Candida* suşlarının amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin ve vorikonazol antifungal duyarlılığı referans mikrodilüsyon yöntemi (CLSI M27-A3 ve M27-S4) ve Etest (Biomerieux, France) kullanıldı.

İzole edilen 50 *Candida* suşu morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere (konvansiyonel yöntemler) göre; %38'i *C.albicans*, %24'ü *C.glabrata*, %10'u *C.parapsilosis*, %10'u *C.kefyr*, %8'i *C.krusei*, %4'ü *C.guilliermondi*, %4'ü *C.tropicalis*, %2'i *C.lusitaniae* olarak tanımlandı. Konvansiyonel yöntemler ile kromojenik besiyeri karşılaştırıldığında; kromojenik besiyerinin tanımlayamadığı 5 *C.kefyr*, iki *C.guilliermondi* ve bir *C.lusitania* suşu hariç tüm suşlar (%100) uyumluydu. Konvansiyonel yöntemler ile PNA FISH karşılaştırıldığında; PNA FISH değerlendirme prospektüsünde olmayan 5 *C.kefyr*, iki *C.guilliermondi*, bir *C.lusitania* suşunu ve testin tanımlayabildikleri arasında da bir *C.tropicalis* suşu haricindeki suşlar (%97.6) uyumluydu. Suşların *in vitro* duyarlılıkları referans mikrodilüsyon yöntemine göre; MİK50,

MIK90 ve MIK aralıkları sırasıyla; amfoterisin B için 0.125, 0.25, 0.3-0.50; flukonazol için 0.50, 16, 0.125-125; vorikonazol için 0.03, 0.25,0.03-0.50 olarak bulundu Suşların *in vitro* duyarlılıkları Etest yöntemine göre; MIK50, MIK90 ve MIK aralıkları sırasıyla; amfoterisin B için 0.064, 0.50, 0.002-0.50; flukonazol 1, 16, 0.016-16 ; vorikonazol için 0.016, 0.25, 0.002-0.50 ve kasfofungin için 0.064, 0.25, 0.002-0.50 olarak bulundu.

Suşların antifungallere *in vitro* duyarlılıkları Etest yönteminin referans mikrodilüsyon yöntemle karşılaştırıldığında; tüm antifungaller açısından temel uyumu %72, kategorik uyumu %95 olarak belirlendi. Temel ve kategorik uyum antifungallere göre sınıflandığında sırasıyla; amfoterisin B için %77-%100; flukonazol için %68-%82 ve vorikonazol için %64-%100 idi. Antifungallere göre Etest yönteminin referans yöntemle karşılaştırıldığında; tüm kategorik hataların küçük hatada (%9,2) yoğunlaştığı görülmüştür. Büyük hatanın görüldüğü tek antifungal flukonazol (%5,2) dü. Çalışmamızda çok büyük hata yoktu.

Sonuç olarak; hastanemizde kan kültürlerinden en sık izole edilen tür *C.albicans* olarak bulunmasıyla birlikte *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* suşlarında sıklığı artmıştır. Kan kültürlerinden *Candida* türlerini tanımlamada hem kromojenik besiyeri hem de PNA FISH yöntemlerinin kolay ve güvenilir olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanılabileceği belirlendi. İzole edilen suşlara karşı antifungaller (flukonazole karşı doğal dirençli olan *C.krusei* ve doza bağlı duyarlı olan *C.glabrata* haricinde) amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine duyarlı olarak belirlendi.

Candida türlerine karşı antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde Etest yönteminin referans mikrodilüsyon yöntemi göre kategorik uyumun yüksek olması ve çok büyük hatanın olmamasından dolayı rutin laboratuvarlarda güvenle kullanılabilecek kolay bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Candida*, Antifungal Duyarlılık, Kromojenik Besiyeri, Peptid nükleik asit fluoresan *in situ* hibridizasyon.

**DETERMINATION OF CANDIDA SPECIES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES
WITH FLORESAN IN SITU HIBRIDIZATION METHOD AND INVESTIGATION OF
ANTIFUNGAL SUSCEPTILTY**

Gonca AYDEMİR

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Microbiology

M.Sc. Thesis, August 2015

Supervisor: Prof. Dr.A.Nedret KOÇ

ABSTRACT

In the recent years, incidence of systemic candidiasis have been increased due to increase in numbers of patients having intensive care, immunosuppressive therapy, broad-spectrum antibiotics and patients who had organ transplantation. Within Candidiasis, the most common clinical indicator is candidemia. In this study; We aimed to compare , peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH) test, chromogenic agar methods, determination of antifungal susceptibility of strains, reference microdilution and Etest methods for the identification of the *Candida* species that isolated from blood cultures.

From July, 2011 to July, 2012, at Gevher Nesibe Research and Application Hospital Clinics, 50 patients who were followed with the pre-diagnosis of systemic fungal infections and yeast isolated from blood cultures were enrolled in the study. In order to identify isolated *Candida* strains, macroscopic and microscopic morphology, culture slides, germ tube test, cycloheximide sensitivity, urease test, carbohydrate assimilation test and API 20C AUX (Biomérieux) tests were used. For Chromogenic broth, Brilliance™ Candida Agar (Oxoid, England) was used. For PNA FISH method, Yeast Traffic LIGHT® PNA FISH® (AdvanDx,USA) kit was used. *Candida* strains were evaluated for antifungal susceptibility to amphotericin B, fluconazole, caspofungin and voriconazole using reference microdilution method (CLSI M27-A3 and M27-S4) and Etest (Biomérieux, France).

Fifty *Candida* strains were isolated and identified as follows according to morphological, biochemical methods (conventional methods); *C. albicans* (% 38) , *C. glabrata* (% 24), *C.parapsilosis* (% 10), *C.kefyr* (% 10), *C.krusei* (% 8), *C.guilliermondi* (% 4), *C.tropicalis* (% 4) and *C.lusitania* (% 2). When the chromogenic media was compared with conventional methods, except for 5 *C.kefyr*, two *C.guilliermondi* and, one *C.lusitania* strains which were could'nt be identified by chromogenic media, all strains were consistent. When the PNA FISH was compared with conventional methods; except for 5 *C.kefyr*, two *C.guilliermondi* and, one *C.lusitania* strains that were not in the PNA FISH assessment prospectus and one *C.tropicalis* strain, all stains were (97.6%) consistent. In vitro susceptibility of strains were found out to be

according to the reference microdilution methods; MIC50, MIC90 and MIC ranges, respectively; For amphotericin B 0.125, 0.25, 0.3-0.50; for fluconazole 0.50, 16, 0.125-125; For voriconazole 0.03, 0.25, 0.03-0.50. In vitro susceptibility of strains were found out to be according to the Etest method; MIC50, MIC 90 and MIC ranges, respectively; For amphotericin B 0.064, 0.50, 0.002-0.50; for fluconazole 1, 16, 0.016-16; for voriconazole 0.016, 0.25, 0.002-0.50 and for caspofungin 0.064, 0.25, 0.002-0.50. When the Etest and reference microdilution method results were compared according to in vitro antifungal susceptibility of strains; compliance was determined as % 75 in terms of all antifungals and, categorical agreement was determined as 95%. When the essential and categorical agreement classified according to antifungals: for amphotericin B; % 77- % 100, for fluconazole; % 68- % 82 and, for voriconazole; It was % 64- % 100. According to Antifungals, When the Etest and reference method were compared, all categorical errors were found to concentrate on minor error (% 9.2). Only antifungal that major error was seen was fluconazole (5.2%). In our study, there wasn't very major error.

Conclusion; In our hospital, while the most common isolated strain was *C. albicans*, frequency of *C.glabrata* and *C. parapsilosis* species were increased. For the identification of *Candida* species from blood cultures, both chromogenic media and PNA FISH methods, which were easy and reliable, were determined that they could be used at routine laboratories. Isolated strains were identified as sensitive to antifungals; (except those, *C.krusei* which is naturally resistant to fluconazole and *C.glabrata* which is dose-dependently susceptible) amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin. For the determination of antifungal susceptibility of *Candida* species, Etest when compared to reference microdilution method was thought to be an easy and reliable method in routine laboratory because of higher categorical agreement and lack of major errors.

Key Words: *Candida*, Antifungal susceptibility, Chromogenic Media, Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR.....	xiii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	xiviv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TARİHÇE.....	3
2.2. SINIFLANDIRMA.....	4
2.3. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ.....	4
2.4. ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.5.ANTİJENİK YAPI.....	5
2.6. <i>CANDIDA</i> TÜRLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ.....	6
2.7. PATOGENEZ.....	7
2.8. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	8
2.9. EPİDEMİYOLOJİ.....	9
2.10. <i>CANDIDA</i> TÜRLERİNİN LABORATUVAR TANISI.....	11
2.10.1. Direkt Bakı ve Kültür.....	12
2.10.2. Tanımlama.....	12
2.10.3. Hif, Blastospor ve Klamidospor Yapımı.....	12
2.10.4. Germ Tüp Testi.....	13
2.11. BİYOKİMYASAL TESTLER.....	15
2.11.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testi.....	15
2.11.2. Nitrat Asimilasyon Testi.....	15
2.11.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi.....	15

2.11.4. Üreaz Testi.....	15
2.12. KROMOJENİK BESİYERİ.....	15
2.13. SEROLOJİK YÖNTEMLER.....	16
2.13.1. 1,3 Beta Glukan (BG).....	16
2.13.2 Mannan.....	16
2.14.MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ.....	17
2.14.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	17
2.14.2 PNA FISH.....	17
2.15. ANTİFUNGAL AJANLAR.....	17
2.15.1 Amfoterisin B.....	18
2.15.2 Flukonazol.....	18
2.15.3. Vorikonazol.....	19
2.15.4. Ekinokandinler.....	20
2.16. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	20
2.16.1. Antifungal duyarlılık test yöntemleri:.....	22
2.16.1.1. Dilüsyon temeline dayalı yöntemler:.....	22
2.16.1.3. Akım sitometri (Flowcytometry) temeline dayanan yöntemler.....	23
2.16.1.4. Diğer yöntemler.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. ÖRNEKLER.....	24
3.2.İZOLASYON.....	24
3.3.TANIMLAMA.....	25
3.3.1.Germ Tüp Testi.....	25
3.3.2. Üreaz testi:.....	25
3.3.3.Mısır Unu Eksteresi- Tween 80 Agar ile Lam Kültürü.....	25
3.3.4.API 20C AUX Maya Tanımlama Sistemi.....	26
3.3.5. Kromojenik Besiyeri (KB).....	27
3.3.6. PNA FISH yönteminin uygulanması.....	28
3.4ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....	29
3.4.1 Mikrodilüsyon Yöntemi.....	29
3.4.2. ETEST.....	33

4.BULGULAR	35
4.1 MAYALARIN TANIMLANMASI	36
4.1.1 Kromojenik Besiyeri Sonuçları:	36
4.1.2 PNA FISH Sonuçları:	37
4.1.3 Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması:	38
4.2 DUYARLILIK SONUÇLARI:	40
4.2.1. Mikrodilüsyon sonuçları:.....	42
4.2.2. Etest Sonuçları:.....	42
4.2.3. Referans yönteme göre hata değerlendirmesi:	44
4.2.4. Referans yönteme göre uyum değerlendirmesi:	44
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6.KAYNAKLAR	54
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
PNA FISH	: Peptid nükleik asit fluoressan in situ hibridizasyon
GİS	: Gastrointestinal Sistem
SDA	: Sabouraud dekstoz agar
Fe	: Demir
Zn	: Çinko
Ca	: Kalsiyum
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
KMK	: Kronik mukokutenöz kandidoz
BOS	: Beyin Omulik Sıvısı
PAS	: Periyodik asit-schiff
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
IV	: Intra Venöz
BDG	: (1→3)-β-D-Glukan
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
MIK	: Minimal Inhibitör Konsantrasyon
DMSO	: Dimetilsülfoksit
MOPS	: 3-morfolino propan sülfonik asit
KOH	: Potasyum hidroksit
DM	: Diabetes mellitus

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Klinik örneklerden sık izole edilen <i>Candida</i> türleri ve biyokimyasal özellikleri	20
Tablo 2.2.	Mayalar için referans yöntem (CLSI M27-A3,M27-S4).....	25
Tablo 3.1.	Brilliance™ <i>Candida</i> Agar içeriği	39
Tablo 3.2.	Brilliance™ <i>Candida</i> selectivesupplement içeriği	40
Tablo 3.3.	Brilliance™ <i>Candida</i> Agarda kullanılan enzimler ve türlere göre renk dağılımı.....	44
Tablo 3.4.	<i>Candida</i> türleri için flukonazol ve vorikonazol klinik direnç sınır değerleri	45
Tablo 3.5.	<i>Candida</i> türleri için ekinokandin klinik direnç sınır değerleri	47
Tablo 4.1.	Hasta gruplarının kliniklere göre dağılımı	47
Tablo 4.2.	<i>Candida</i> türlerinin dağılımı	48
Tablo 4.3.	<i>Candida</i> suşlarının üç yöntemle gösterilmesi.....	49
Tablo 4.4.	Mikrodilüsyon ve Etest yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları.....	49
Tablo 4.5.	Mikrodilüsyon ve Etest yöntemi antifungallere göre MİK50/MİK90 değerleri ve MİK aralıkları.....	50
Tablo 4.6.	CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 broth mikrodilüsyon referans alınarak Etest yöntemindeki hataların değerlendirilmesi... ..	52
Tablo 4.7.	CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 broth mikrodilüsyon referans alınarak Etest yöntemindeki uyumun değerlendirilmesi.....	52
Şekil 4.1.	a) Kromojenik Besiyerinde <i>C.albicans</i> (yeşil), <i>C.parapsilosis</i> (krem- kahverengi), <i>C.krusei</i> (kuru pembemsi), <i>C.tropicalis</i> (mavi) b) Kromojenik Besiyerinde <i>C.albicans</i> (yeşil)	37
Şekil 4.2.	PNA FISH Yeşil: <i>C.albicans</i> , Kırmızı: <i>C.glabrata</i>	37

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri insanlarda görülen en yaygın patojen mantarlardandır. Doğada geniş bir dağılım gösteren *Candida* türleri insan ve hayvanların normal florasında da bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar invaziv olmayan yüzeysel enfeksiyonlardan, derin dokuları tutan enfeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptirler (1). Son yıllarda kemoterapi ve diğer immunosupresif tedavi alan hastaların sayısının artması, transplantasyon cerrahisinin gelişmesi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı yoğun bakım ünitelerinde kalan hasta sayısının artması ve hastalara uygulanan invaziv işlemler nedeniyle hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonlarının insidansı artmıştır (2,3). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastanelerinde "Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Surveyans Sistemi" verilerine göre *Candida* türleri hastane kaynaklı mantar enfeksiyonlarının %80'ine neden olmakta ve tüm hastane enfeksiyonlarında %5'lik bir oranda yer almaktadır (4). *Candida* türleri hastane kaynaklı sistemik enfeksiyonlara sebep olan patojenler arasında koagülaz negatif stafilokoklar ve enterekok türlerini takiben en sık izole edilen dördüncü etken olup ciddi morbidite ve mortalite nedenidir (5).

Mikoloji laboratuvarında kan kültürlerinden mayaların tanımlanması 1-4 gün kadar sürmektedir. Serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanım alanı sınırlıdır. Son yıllarda özellikle hızlı tanı için kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Maliyet unsurunun ağır bastığı ve laboratuvar olanaklarının sınırlı olduğu birimlerde rutin tanı algoritmasında konvansiyonel yöntemler ve kromojenik agar gibi pratik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (6). Ayrıca biyokimyasal özelliklerine göre tanımlamayı sağlayan ticari kitlerde kullanıma girmeye başlamıştır. Bu nedenle hızlı tanı sağlayabilen özgülüğü ve duyarlılığı yüksek laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda dünya genelinde antifungal ilaçlara dirençli mantarların sayısında artış görülmektedir. Bu nedenle in vitro antifungal duyarlılık testleri uygun tedaviyi seçmede klinisyene oldukça yardımcı olmaktadır (7). Farklı coğrafi bölgelerde ve hastane merkezlerinde yapılan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılık profilleri ile ilgili çalışmaların yayınlandığı uluslararası raporlarda belirgin farklılıklar bulunmaktadır (8). Antifungal duyarlılık testi için kullanılan yöntemler makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, spektrofotometrik mikrodilüsyon, agar makrodilüsyon, agar difüzyon ve Etest olarak sınıflandırılabilir (9,10). Mikrodilüsyon yöntemi referans yöntem olarak kullanılırken, Etest yöntemi referans yönteme alternatif, pratik, güvenilir, daha erken sonuç veren, kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (11).

Bu çalışmada; kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, Peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH), kromojenik agar yöntemlerinin değerlendirilmesi ve suşların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi, referans mikrodilüsyon ve Etest yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Milattan önce 4. yüzyılda iki hastada pamukçuk adı verilen bir ağız enfeksiyonu görüldü. Bunu Hippocrates epidemi olarak tanımladı. Pamukçuğun modern tıptaki ilk tanımı 1771'de Rosenstein tarafından yapıldı ve daha sonra 1784'de Underwood tarafından pediatrik bir problem olarak tanımlandı. Veron 1935'de yenidoğanların doğum esnasında gastrointestinal sistem (GİS) yolunun enfekte olduğunu öne sürdü. Pamukçuk ve mantarlar hakkındaki doğru ilişki ancak 3 yıl sonra 1842'de mikroorganizmayı '*Sporotrichum*' olarak sınıflandıran Gruby tarafından yapıldı. Bennett 1844'de bir tüberküloz hastasının balgamından, Wilkinson 1849'da vajinadan, Robin 1853'de sistemik bir enfeksiyondan, Zenker 1861'de beyin enfeksiyonundan izole etti (12,13).

Dubendorfer 1904'de onikomikozu, Jakobi 1907'de dermatitisi, Forbes 1923'de kronik mukokutanöz kandidozu, 1910'da Rafin sistiti tanımladı ve daha sonra Conner 1928'de osteomyeliti, Joachim ve Polayes 1940'da endokarditi tanımladı. Suthin 1943'de endokrin sistem ve *Candida* enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi gösterdi (14). Castellani 1912'de *C.albicans* dışındaki *Candida* türlerinin patojenik olabileceğini öne sürdü. Hastalardan izole edilen mayaların isimlendirilmesi sık sık değiştirildi. Robin '*Oidium albicans*' ismini 1853'de, Quinquad '*Syngospora robini*' 1868'de ve Reess '*Saccharomyces albicans*' ismini 1975'de verdi. Grawitz 1977'de yayınlanan mikoloji çalışmalarında *Candida* cinsi'nin morfolojik formlarını tanımladı Zopf tarafından 1890'da uzunca bir zaman kabul gören ve kimi zaman hala kullanılan '*Monilia albicans*' tanımlandı. Berkhout 1923'de çürümüş meyve ve sebzelerden ve tıbbi

vakalardan izole edilen ‘*Monilia spp.*’ arasındaki farkları kabul ettikten sonra *Candida* cinsini oluşturdu (12,13).

2.2. SINIFLANDIRMA

Candida ismi 1959’da Montreal’de “Uluslararası Botanik Kongresi’nde” *Basidiomycota*’ya ait olanlar ayrı tutularak *Ascomycota* içine alındı. *Candida* türleriyle ilgili hem klasik hem moleküler araştırmalar *Candida* türlerinin teleomorflarının keşfedilmesini ve genus içindeki bazı türlerinde aşamalı olarak silinmesini sağladı (15,16). *Candida* türleri; *Candida albicans* dışında *C.tropicalis*, *C.keyfr*, *C.parapsilosis*, *C. krusei*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii* gibi diğer önemli 200 tane tür içermektedir (17). *Candida* türleri *Ascomycota* şubesinde, *Hemiascomycetes* sınıfında, *Saccharomycetales* ordusunda ve *Candidiaceae* ailesinde bulunur (18).

2.3. MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Candida türleri tek hücreli, hücre duvarında kitin ve/veya selüloz içeren, 80S ribozomları olan ökaryotik kemoheterotrof organizmalardır. Tomurcuklanma (blastospor) veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar (1). *Candida* türleri genellikle çapları 4-6 pm arasında değişen yuvarlak veya oval maya mantarlarıdır (19). *Candida* türlerinde oluşan blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan birbiri ardı sıra uzayarak yalancı hif (pseudohif), hücre duvarları birbirine paralel gerçek hif ve bir hifin ucunda veya arada bulunan tek hücreli, kalın duvarlı, oval geniş yapı olan klamidospore oluşturabilirler. Blastokonidyum, yalancı hif, klamidospore, germ tüp oluşumu ve askospore oluşumu tür tanımında önemlidir (1,20).

Candida türleri Gram ile boyandıklarında pozitifdir. Maya elemanlarının örnekler içinde aranmasında %10 potasyum hidroksit (KOH) veya kalkoflor beyazı floresan boyama kullanılır. Maya hücre duvarındaki kitin ve selülozla nonspesifik bağlanan kalkoflor beyazı floresan boyası, yeşilden maviye değişen renklerde floresan verir (1,20).

2.4. ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Candida türlerinin çoğu yaygın kullanılan kan kültürü şişelerinde ve agarlı besiyerlerinde özel mantar besiyerlerine gerek duymadan kolaylıkla üreyebilirler. Koloniler genellikle 24 saatte oluşmasına rağmen, belirgin üreme genellikle 48-72 saat arasında gerçekleşir. 37°C de üreyebilmeleri önemli özelliklerindedir. Özellikle patojen olan türler 25-37°C de, saprofitler ise daha düşük ısıda üreyebilirler (20-22). *Candida* türleri Sabouraud dekstoz agar (SDA) gibi primer izolasyon besiyerlerinde

üreyip genellikle kirli beyaz veya krem rengi, yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu S tipi koloniler oluştururlar (20). *Candida* kolonileri S formundan R formuna kendiliğinden dönüşebilir. Bu durum daha çok miçellerin artması ile ilgilidir (23,24). Bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılayarak, seçicilik sağlamak amacıyla primer izolasyon besiyerinin bileşimine sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol gibi antibiyotikler eklenebilir (25).

Candida 'ların üreyebilmesi için besiyeri ortamında glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biyotin ve serbest metallerin (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması, ortam pH' sının 2-8 arasında olması yeterlidir (21). *Candida* türleri kemoheterotrofturlar, organik bir azot ve karbon kaynağına gereksinimleri vardır. Oksijen varlığında spesifik karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Besinlerini absorpsiyon yolu ile buldukları ortamdan kolayca sağlayabilmeleri için ortamın nem oranının %95-100 arasında olması gerekir (1,20,21,23).

2.5. ANTİJENİK YAPI

C.albicans hücre duvarında bulunan ve potent immunojen olan mannanın yapısal farklarına göre A ve B olmak üzere 2 serotipi vardır (18,26). Hemen hemen immun sistemi çalışan bireylerde eşit olarak bulunur. Fakat serotip B immun sistemi baskılanmamış hastalarda daha yoğundur. Ancak son yıllarda AIDS'liler ve diğer bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler arasında serotip B'nin insidansı artmıştır (26). Bu gözlemin öneminin ne olduğu çok net değildir. B serotipi A serotipinden fizyolojik olarak farklıdır ve B serotipi daha geniş bir karyotip çeşitliliği gösterir. 5-florositozine daha dayanıklıdır. İki serotipin coğrafik olarak nasıl dağıldığı çok net değildir (37).

A ve B serotipleri için hücre duvarındaki mannan bileşeni arasındaki farklılık Hasenclever ve Mitchell tarafından 1961'de ortaya konmuştur. A serotipi antijenik olarak *C.tropicalis* ile B serotipi *C.stelloidea* ile ve *C.albicans* türleriyle ilişkilidir (12,29). Hücre duvarının yapısına katılan β glukoz kitin ve mannoprotein kuvvetli antijeniktir (30).

Mannoproteinlerin hem karbonhidrat hem de protein kısımlarına karşı bağışık yanıt oluşur. *Candida* cinsi'ne karşı oluşan hücresel bağışıklığın temel hedefi mannoproteinlerdir ve bu protein başlıca T hücre uyarandır. Hücre duvarında bulunan mannan enfeksiyon sırasında duvardan ayrılır, immünglobülin ile birleşir ve dolaşımdan uzaklaştırılır; fakat bağışık yanıt yetersizse mannan antijenemisi oluşur (30).

2.6. *CANDIDA* TÜRLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Candida Enfeksiyonları ve Tanısı

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan enfeksiyonlara yol açabilir (31).

A) Yüzeysel *Candida* Enfeksiyonları

a) Oral Kandidoz

- Akut pseudomembranöz oral kandidoz (pamukçuk)
- Kronik atrofik kandidoz
- Kronik hiperplastik kandidoz

b) *Candida* Özofajiti

c) *Candida* Vulvovajiniti ve Balanit

B) Primer Kutanöz Kandidoz

- İntertrigo
- Ayak parmak aralarının *Candida* enfeksiyonunda
- Konjenital kutanöz kandidoz
- Diyaper raş

a) Onikomikoz ve paronikya (dolama)

b) Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK)

C) İnvaziv *Candida* Enfeksiyonları

a) Kandidemi

b) Akut dissemine kandidoz

c) Kronik dissemine kandidoz

d) Gastrointestinal kandidoz

e) Pulmoner kandidoz

f) Trombofilebit

D) Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları

- Menenjit
- Beyin apsesi ve metastatik ensefalit

E) Kardiyovasküler Enfeksiyonlar

- Endokardit

- Miyokardit
- Perikardit

F) Üriner Sistem Enfeksiyonları

- Renal Kandidoz
- Alt Üriner İnfeksiyon

G) Kemik ve Eklem Enfeksiyonu

- Osteomyelit
- Artrit

H) Oküler Enfeksiyon

- Endoftalmit

I) Allerjik Kandidoz İd Reaksiyonları (31-33).

2.7. PATOGENEZ

Candida türleri insan ve hayvanların GİS yaygın olarak bulunan maya grubu mantarlardan patojenik potansiyeli olan fırsatçı patojenlerdir (34,35). Bu nedenle *Candida* enfeksiyonları çoğu kez endojendir (34,36). Konak savunma mekanizmaları ve mikroorganizmanın virülansı *Candida* enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynar. Sağlam deri ve mukozaların *Candida* enfeksiyonlarının gelişimini önlemede rolü büyüktür. Deri maserasyonuna neden olan her türlü olay, sağlıklı kişilerde de duyarlı bölgelerde *Candida* invazyonuna izin verir. *Candida* türleri deriye veya kan dolaşımına geçtiğinde polimorfonükleer lökositler savunmaya katılır. Nötrofillerden başka monosit ve eozinofiller fagositozda yer alır (37,38).

Doku makrofajlarının ve yerleşik retiküloendotelyal hücrelerin de *Candida* türlerini öldürme kapasiteleri vardır (25,37). Enfeksiyona karşı direnç gelişiminde deri önemli bir rol oynar. Deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması, deriyi invazyona duyarlı hale getirir. *Candida* hücreleri deriye invaze olup, dolaşıma girerlerse nötrofiller, monositler ve eozinofiller ile karşılaşılır (38,39). Enfeksiyona ilk tepkiyi monosit ve makrofajlardan ziyade nötrofiller verir. Nötrofillerin öldürme mekanizmaları süperoksit, hidrojen peroksit, monokloramin gibi oksidatif maddeler aracılığı ile olabildiği gibi, defensin, laktoferrin, lizozim, azuridin gibi oksidatif olmayan granüller aracılığıyla da gerçekleşebilir (40). Yerleşik floradaki bakteriler, besin maddelerini hızla tüketerek, çevre koşullarını *Candida* türleri için uygun olmayacak şekilde değiştirir veya toksik maddeler üreterek *Candida* türlerinin çoğalmasını engeller (41,42).

Hipoparatiroidizm, adrenal yetmezlik, kronik lenfositik troidit, diabet, over hipofonksiyonu ve adrenokortikotropik hormon eksikliği gibi endokrin bozukluklar kronik mukokutenöz *Candida* enfeksiyonları ile ilişkilidir (41, 43, 44).

Candida türlerine karşı humoral ve hücrel bağışıklık gelişmekle beraber hücrel bağışıklığın rolü daha büyüktür. Genel olarak yüzeysel deri enfeksiyonlarında hücrel bağışıklığın, sistemik enfeksiyonlarda ise doğal direncin yanında humoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (37,43,45).

Diabetes mellitus (DM)'ta glikoz düzeyinin yükselmesi doku invazyonu olmaksızın fungal üremeyi artırır. Ciddi yanık lezyonlarında *Candida* türleri kolonize olduğunda, deri bütünlüğü bozulmuş olduğundan doku invazyonu gelişebilir. Gebelikte östrojen ve vajinal glikojen miktarının artması, vajinal kolonizasyona sebep olabilir (45,46). *Candida* türlerinin glikoprotein yapısındaki toksinleri patojenitede rol oynayan virulans faktörlerindedir. Bakteri toksinleri gibi pirojen olup hayvanlarda anaflaktik şoka neden olabilir, ancak bakteri toksinleri kadar etkin değildir (47,48).

Kemoterapi ve radyoterapi sonrası maserasyona bağlı doku invazyonu gelişebilir. Hiperalimentasyon sıvıları intravasküler hiperglisemik ortam sağlayarak *Candida* enfeksiyonlarını kolaylaştırır. İntravasküler kateterler, basınç izleme aletleri, prostetik kalp kapakları ve pacemaker yerleştirilmesi dissemine kandidoza yol açar. Geniş spektrumlu antibiyotiklerle flora bakterilerinin baskılanması *Candida* enfeksiyonlarına yol açabilir (41, 45).

2.8. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Candida türlerinin virulansı enfeksiyon oluşturmada en önemli faktörlerdendir (36).

Candida türlerinin virülans faktörleri;

- Adherans
- Germ tüp oluşumu
- Dimorfizm
- Enzimler
- Slime faktör

- Fenotipik değişim

Sonuçta *Candida* türlerinin mukoza yüzeyine yapışma, çoğalma *C.albicans* olgularında germ tüp oluşumu patojeniteye karışır ve enzimlerin üretimi sayesinde doku hasarı ve invazyon gibi olaylar gerçekleşir.

2.9. EPİDEMİYOLOJİ

Candida türleri insanlarda GİS, üretra ve vajinada normal flora üyesi olarak bulunmaktadır. Ayrıca doğada hava, su ve toprakta, cansız objelerde, yiyecekler üzerinde ve hastane ortamında da kolaylıkla canlılıklarını sürdürebilirler (23, 49).

Sağlıklı bireylerde *Candida* taşıyıcılığı %25-50 arasındadır. Bu oran hastanede yatan hastalarda ve kemoterapi alanlarda daha yüksektir. Flora elemanı olarak buldukları bölgelerde, yoğunluklarının arttığı ve gastrointestinal mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, kana karışma olasılıkları yüksektir. Ayrıca kemoterapi nedeniyle veya cerrahi girişimler sonucu bozulan epitel dokulardan kana karışırlar. *Candida* enfeksiyonları büyük çoğunlukla endojen kaynaklıdır (49). Ancak insandan insana ellerle bulaşma da mümkündür (23,50). Tüm nozokomiyal fungal enfeksiyonlar arasında *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlar %80 olarak bildirilmekte ve kan kültürlerinden izole edilen etkenler arasında dördüncü sırada bulunmaktadır (51,52).

Yapılan çalışmalara göre, hastane personelinin ellerinde %33-75 oranında çeşitli *Candida* türleri taşınabilmektedir (53). ABD’ de mikozların ulusal epidemiyolojisini araştıran bir çalışmada da yedi cerrahi yoğun bakım birimi ile altı yenidoğan yoğun bakım biriminde hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etkenler arasında *Candida* türlerinin dördüncü sırada bulunduğu, etken olarak *C.albicans* (%48), *C.glabrata* (%24), *C.tropicalis* (%19), *C.parapsilosis* (%7), ve diğer türlerin (%3) soyutlandığı, sağlık çalışanlarının üçte birinin ellerinde *Candida* bulunduğu bildirilmiştir (54).

Üç yıllık bir süre içersinde 49 hastanede görülen onbinden fazla hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonu olgusunun analizi yapılmış, *Candida* türlerinin etken mikroorganizmalar arasında dördüncü sırada (%7.6) bulunduğu, ancak bunun mortalite oranı en yüksek (%40) olan patojen olduğu ve en sık karşılaşılan türlerin *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* olduğu saptanmıştır (55).

Hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonlarında özellikle son yıllarda görülen artıştan bir takım faktörler sorumludur. Bunlar içinde AIDS, kanser ve DM gibi çeşitli hastalıklar nedeni ile bağışıklık sistemi bozulmuş veya bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonunun artmış olması en önemlisidir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve kemoterapötik ajanların kullanımı, yoğun bakım ünitelerindeki yaşam destekleyici sistemlerin giderek artması diğer önemli faktörlerdendir (55,56). Diğer risk faktörleri arasında sentral venöz kateter kullanımı, total parenteral beslenme, yoğun bakım ünitelerinde yatış süresinin uzaması, hemodiyaliz, ağır yanıklar, mekanik ventilasyon, nötropeni, organ nakilleri (kemik iliği ve solid organ) ve idrar kateteri varlığı sayılmaktadır (56,57).

Karın içi cerrahi işlemlerin de kandidoz açısından risk faktörü oluşturduğu bildirilmektedir. Geniş etki spektrumlu antibiyotik kullanımı ile gastrointestinal ve kutanöz bakteriyel floranın azalması *Candida* sayısının artması ve cerrahi işlemin de penetrasyonda ve yayılımında kolaylaştırıcı olduğu düşünülmektedir (58).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında 1990'ların ilk yıllarına kadar *C.albicans* etken olarak başı çekerken, bu yıllardan sonra *non-albicans Candida* türlerinin sıklığı artmıştır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, *C.albicans* %40-50 oranında görülürken, *C.tropicalis* %8-43, *C.glabrata* %5-35 oranında bildirilmiştir (49). Özellikle antifungal profilaksiler ve azol türevlerinin yoğun kullanımları *C.albicans* ve *C.tropicalis* türlerinde azalmaya neden olurken azollere dirençli *C.glabrata* ve *C.krusei* türlerinde artışlara yol açmıştır (59). *Candida* türlerinin dağılımı aynı zamanda yaşla ilişkilidir. Yenidoğan kandidemilerinde *C.albicans* ve *C.parapsilosis* baskınken, *C.glabrata* ve diğer türler nadirdir. Erişkinlerde ise *C.albicans* ve *C.glabrata* en sık izole edilen türlerdir (60).

Flukonazole olan doğal direnci nedeniyle önemli bir tür olan *C.krusei*, özellikle flukonazol profilaksisi uygulanan merkezlerde sorun oluşturmaktadır. *C.krusei*'ye bağlı enfeksiyonlar en sık nötropenik kanser hastalarında görülüp, bunlar içinde lösemiler ilk sıradadır. *C.krusei* ilk kez 1991 yılında flukonazol profilaksisi alan nötropenik ve kemik iliği transplantasyonu geçiren hastalarda bildirilmiştir (61).

Kandidemiler arasında etken olarak nadiren izole edilen *C.lusitaniae* amfoterisin B'ye doğal dirençli olması nedeniyle önemlidir (62). *C.glabrata*, ABD ve Kanada'da *C.albicans*'tan sonra en sık izole edilen türdür. Birçok çalışma *C.glabrata*'nın

yenidoğan ve çocuklarda nadir olduğunu, yaş ilerledikçe görülme olasılığının arttığını göstermektedir (63).

C.parapsilosis vasküler kateterler ile ilişkili olup, hastane çalışanlarının elinde en fazla bulunan türdür (64). ‘‘Slime’’ oluşturmaları ve sentetik yüzeylerde kolaylıkla kolonize olmaları sebebi ile uzun süreli santral venöz kateter kullanımı ve total parenteral beslenme bu türün neden olduğu kandidemiler için risk faktörü olarak gösterilmiştir. Bu tür özellikle çocuklarda sık görülmektedir (65,66).

C.tropicalis özellikle kanser hastalarında ve kemik iliği alıcılarında kandidemi ve invaziv kandidiyazisten sorumlu olan türdür (63,67). En yüksek risk faktörü olarak nötropeni bildirilmiştir (67).

2.10. CANDİDA TÜRLERİNİN LABORATUVAR TANISI

Candida türlerinin normal florada da bulduklarından, laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üreyen *Candida* türlerinin klinik bir öneminin olup olmadığını tahmin etmek ve rapor edilip edilmemesine karar vermektir. Bu nedenle, laboratuvar verilerin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik- laboratuvar işbirliğinin kurulması gerekir (46,68-70). *Candida* türlerinin tanımlanmasında klinik örneğin uygun bir şekilde alınıp ekilmesi ve diğer laboratuvar işlemlerinin yapılması gerekir (71). Örnekler asepsi kurallarına uygun olarak alınıp hızla laboratuvara iletilmelidir (72). Klinik materyalden *Candida* türlerinin izolasyonu ve tanımlanması için bir dizi işlem yapılır (73).

Candida enfeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, eksüda, solunum yolu örnekleri, doku, biyopsi örnekleri, ağız ve vajen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri örnekleri sayılabilir (74).

Candida enfeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için;

- 1) Klinik örneklerin direkt mikroskopik bakısı
- 2) Kültürden *Candida* türlerinin soyutlanması
- 3) Organizmanın tür düzeyinde tanımlanması
- 4) Moleküler yöntemler ile *Candida* türlerinin tanımlanması ve tanımlanması
- 5) Serolojik yöntemler ile *Candida* türlerinin varlığının gösterilmesi
- 6) Dokuda bulunan *Candida* türlerinin histopatolojik olarak saptanmaları gerekmektedir (75,76).

2.10.1. Direkt Bakı ve Kültür

Klinik örneklere uygulanacak ilk işlem direkt bakıdır. Direkt bakı için yaş preparat hazırlanabildiği gibi %10'luk KOH, Gram, Wright, metilen mavisi, kalkoflor beyazı gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar da kullanılabilir. Doku örneklerindeki *Candida* türlerinin araştırılmasında ise periyodik asit-schiff (PAS), metenamin gümüş boyaları kullanılmaktadır (75,76). *Candida* türleri için önerilen primer izolasyon besiyerleri SDA, sikloheksimit gibi antimikotik ve kloramfenikol-gentamisin gibi antibiyotikler eklenmiş SDA, inhibitör mold agar, koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar olup, SDA en sık kullanılanıdır. SDA besiyerine ekilen örnekler 37°C de inkübe edilir. *Candida* türleri genellikle 24 saat içerisinde düzgün yüzeyli, hafif kubbeli, beyaz krem renkli, 1-2 mm çapında, tereyağ kıvamında maya kokulu koloniler oluşturur. *C.albicans* koyun kanlı agarda yıldız şeklinde saçaklı koloniler oluşturur (74,77,78). Kültür için alınan örnekler uygun besiyerine ekildikten sonra 25°C ve 37°C'de ayrı ayrı inkübe edilirler. Patojen *Candida* türlerinin çoğu 25°C ve 37°C'de birkaç günde ürerler. 37°C'de üreyememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir (79). Kültür tüplerinin kapakları havalanmayı sağlamak üzere hafifçe gevşetilmelidir. İnkübatör nemi %30-40'a ayarlanmalıdır (41,80).

2.10.2. Tanımlama

Geleneksel olarak *Candida* türlerini tanımlanması makroskobik ve mikroskobik olarak morfolojik karakterlerinin incelenmesi ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesiyle yapılır. Morfolojik karakterleri olarak; hücre büyüklüğü ve şekli, koloni rengi ve görünümü, hif ve/veya pseudohif üretimi, germ tüp veya klamidospore oluşturma yetenekleri gibi özellikleri değerlendirilir. Biyokimyasal özellikleri olarak ise; karbonhidrat fermantasyon ve asimilasyonu, üre hidrolizi ve nitrat asimilasyonu değerlendirilir (41,79-81).

2.10.3. Hif, Blastospor ve Klamidospor Yapımı

C.albicans hem gerçek hem de yalancı hif, blastospor ve klamidospore oluşturur. Bunun yanında *C.tropicalis* hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcuttur ve blastokonidyaları *C.albicans* suşlarından daha geniştir (77,82). Daha ileri tanımlama için mısır unu-Tween 80 agar, pirinç özütü Tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlarda lam kültürü yöntemi uygulanır (77,83). Bunun için Pirinç ekstresi-Tween 80 agar, Cornmeal-Tween 80 agar, Wolin Bevis agar, Oxgall agar

veya Czapek Dox-Tween 80 agar besiyerlerinden birine lam kültürü uygulanır (73,79, 81).

2.10.4. Germ Tüp Testi

Candida türlerinin tanımlanmasında ilk adım germ tüp testidir. Hızlı sonuç veren, uygulaması kolay, *C.albicans* 'ı diğer *Candida* türlerinden ayırmayı sağlayan basit bir testtir. *C.albicans* ve *C.dublinskiensis* türlerinin %95-97'sinde olumludur. *C.albicans* 'ın bütün türleri germ tüp oluşturmayabilir (24,84). Germ tüp, blastosporlardan orijin alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir filament olarak gözlenir. *C.tropicalis*, *C.kefyr*, *C.krusei*'de ise pseudogerm tüp oluşumu görülebilir (24,85). Pseudogerm tüpte daha büyük bir blastospor vardır ve hif ile bağlantı bölgesi daha belirgindir (19,24). Germ tüp testi için insan serumu, yumurta albümini, sığır serum albümini, koagüle tavşan plazması ve koyun serumu kullanılabilir. Rutinde en sık insan serumu kullanılır (24,86).

Tablo 2.1. Klinik örneklerden sık izole edilen *Candida* türleri ve biyokimyasal özellikleri(82)

TÜRLER	37°C'de üreme	Buyyonda zar	Yalancı veya gerçek hif	Klamidospor	Germ tüpler	Şeker asimilasyonu											Fermentasyon						Üreaz	KNO3 kullanımı	Fenol oksidaz	Askospor	
						Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktoz	Galaktoz	Melibiyoz	Selobiyoz	inozitol	Ksiloz	Rafinoz	Trehaloz	Dulcitol	Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktoz	Galaktoz					Trehaloz
<i>C.albicans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	-	-
<i>C.catenulata</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.dubliniensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	-	-
<i>C.famata</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	W	-	W	-	-	W	-	-	-	-
<i>C.glabrata</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	F	-	-	-	-	F	-	-	-	-
<i>C.guilliermondii</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	-	F	F	-	-	-	-
<i>C.kefyr</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	F	-	F	F	F	-	-	-	-	-
<i>C.krusei</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>C.lambica</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.lipolytica</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>C.lusitaniae</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	-	F	-	F	F	-	-	-	-
<i>C.parapsilosis</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.pintolopesii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.rugosa</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.tropicalis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	F	F	-	F	F	-	-	-	-
<i>C.zeylanoides</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

"-":negatif kontrole göre zayıf,"+":negatif kontrole göre kuvvetli,F:Şekeri fermente eder,W:Zayıf reaksiyon

2.11. BİYOKİMYASAL TESTLER

2.11.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testi

Mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Wickerham yöntemi, oksanografik yöntem ve ticari tanımlama kitleri kullanılarak yapılabilir (73,79). Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini API 20 C, ID 32 C ve Uni-Yeast-Tek, VITEK gibi hazır ticari test sistemleri almıştır. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlar API sistemleridir (29,87,88). Bu testler belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki turbidite artışını veya renk üretimini kullanırlar (78,89).

2.11.2. Nitrat Asimilasyon Testi

Karbonhidrat asimilasyon testine benzer ve mayaların nitrojen kaynağı olarak nitrati kullanma yeteneklerini ortaya koyar (69,74).

2.11.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımınıdır (90,91). Modifiye Wickerham tekniği ile yapılabilir. Fermantasyon tüplerindeki pH değişikliği fermantasyonu göstermez. Durham tüpünde gaz kabarcığının gözlenmesi ile ortaya konur. *Candida* türleri ile *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* gibi nonfermantatifleri ayırmada yararlıdır. Karbonhidrat asimilasyon testlerine göre kaba, zor ve daha az güvenilir olduğundan rutin tanımlamada pek önerilmez (73,79).

2.11.4. Üreaz Testi

Christensen's üre agarda üre hidrolizi üreaz aktivitesini gösterir. *C.krusei*, ve *C.lipolytica* üreyi hidroliz edebilir (73). Bu test klinik önemi olan *Candida* türlerini diğer mayalardan ayırmaktadır. Klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir (92).

2.12. KROMOJENİK BESİYERİ

Kromojenik agar koloni karakterlerine dayanan bir veya daha fazla maya türünü ayırmada olanak sağlar. Koloni tanımlamasının temeli; farklı substratlara ekzoenzimlerin kullanılmasıyla ortaya çıkan farklı kromojenik ürünlere dayanır. Bu besiyeri ile türler farklı koloni görüntüleri ortaya koymaktadır (93,94).

İnkübasyon süresi ve sıcaklığı koloni görüntüsünü önemli derecede etkiler. Tanımlamanın zor olduğu örneklerde ve karışık maya kültürü enfeksiyonlarında bu

ortam elverişlidir. Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (95,96).

2.13. SEROLOJİK YÖNTEMLER

Son yıllarda sistemik mantar hastalıklarında belirli bir artışın olması, yeni mantar antijenlerinin elde edilmesini ve yeni teknolojik gelişmelere yönelik çalışmaları yoğunlaştırmış ve serolojik testler kullanıma girmeye başlamıştır. Ancak çapraz reaksiyonların çok fazla olması; geçirilmiş enfeksiyon, kolonizasyon ve aktif enfeksiyonu ayırt etmede yetersiz kalmaları bu testlerin değerini azaltmaktadır (24,97).

2.13.1. 1,3 Beta Glukan (BG)

Mantar hücre duvarının özgün yapısı mantar serolojik testi için uygun hedefdir. BG *Candida* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere birçok maya ve küf mantarlarının hücre duvar yapısında bulunan bir moleküldür (98). Denizde yaşayan ve Horseshoecrab olarak bilinen ve bir canlıdan izole edilen Faktör G Beta glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir reaksiyon verir. BG testi bu kimyasal etkileşim sonucu ortaya çıkan bir testtir (99,100). Hastaların düzenli serolojik takiplerinde klinik olarak mantar enfeksiyon tanısından ortalama 4-12 gün önce testin pozitifleştiği gösterilmiştir. Testin pratikte bakılması uzun sürmemektedir ve 5µl serum test için yeterlidir. Testin dezavantajı sayılabilecek nokta ise mantar enfeksiyonların tanısı açısından belli bir mantar türüne özgü olmamasıdır. Hücre duvarında beta glukan düzeyi çok düşük düzeyde olan *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* enfeksiyonlarında test negatif sonuç vermektedir (101).

2.13.2 Mannan

Candida türlerinin hücre duvar komponentidir. Enfeksiyon sırasında dolaşıma geçtiği için tespit edilebilmektedir (102). Mannan antijeni pozitif sonuç invaziv kandidoz ile koreledir. Santral venöz kateterle ilgili kandidemide daha az olasılıkla pozitif bulunmaktadır. Antijenin klirensi hızlı olduğundan duyarlılığı artırmak için farklı örneklerin alınması gereklidir. Çeşitli örnek alındığında saptama oranı %40, tek örnekte ise %11 bulunmuştur. Mannan antikoru doğal florada bulunduğu için standardize edilememiştir (103).

2.14. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

2.14.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Direkt örnekten *C.albicans*'ın saptanabilmesi için 5S rDNA, kromozomal DNA'daki transkripte edilmeyen bölgenin primer olarak kullanıldığı bir PZR yöntemi tanımlanmıştır (104). Kültür ve serolojik tanının yetersiz, fungal yükün çok az olduğu evrede, PZR temelli tanı yöntemlerinin daha etkin olacağı düşünülmektedir (105).

2.14.2 PNA FISH

Son zamanlarda FDA onayı alan trafik lambası PNA FISH (Yeast Traffic Light PNA FISH, AdvanDx) pozitif kan kültürlerinde *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*'nin tanımlanması için tasarlanmış renkli, kantitatif nükleik asit hibridizasyon metodudur. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*'nin tür-spesifik ribozomal RNA'sını hedef alan floresanla etiketlenmiş peptik nükleik asit problemleri kullanır. Bu metod ile kan kültür pozitif olduğunda yapılan Gram boyamada *Candida* saptanmış ise trafik lambası PNA FISH yapılır ve sonuçlar birkaç saat içinde floresan mikroskopi kullanılarak görülür. Yeşil floresan hücreler *C.albicans* ve/veya *C.parapsilosis*, sarı floresan hücreler *C.tropicalis* ve kırmızı floresan hücreler *C.glabrata* ve/veya *C.krusei*'yi tanımlar (106).

2.15. ANTİFUNGAL AJANLAR

İlk kez 1903 yılında bir sporotrikoz vakasında, iyodidlerin ve 1939'da dermatofitlere karşı griseofulvinin tedavi maksadıyla kullanılmasından sonra, 1950'li yıllara kadar antifungal tedavide pek fazla gelişme olmamıştır. 1950'de nistatin, 1956'da amfoterisin B, 1964'de flusitozin ve 1960'ların sonlarında da azoller antifungal tedavide kullanılmaya başlanmıştır (107). 1970'li yılların sonlarında o zamana kadar tedavide kullanılan amfoterisin B ve flusitozine ek olarak intravenöz mikonazol ve oral ketokonazol tedaviye girmiştir. 1980'lerde triazollerin kullanılmaya başlaması ile sistemik antifungal seçenekleri artmış, günümüzde bu ajanlara ek olarak yeni triazoller, amfoterisin B'nin lipozomal türevleri, ekinokandinler, nikkomisinler, pradimisin ve analogları gibi yeni antifungaller de geliştirilmiştir. Ayrıca, fungal enfeksiyon tedavisinde çeşitli antifungallerin ve immunmodülatör ajanların birlikte kullanımı da gündeme gelmiştir. Tedavi seçeneklerinin bu denli genişlemiş olmasına karşın,

antifungal ajanların yaygın kullanımı ile bir veya birkaç ajana dirençli fungal patojenler ortaya çıkmıştır (108). Fungal enfeksiyonların tedavisi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinden daha zordur. Bu da mantarların insan hücreleri gibi ökaryotik olmasından ve fungal hücrelere selektif toksik etkili ajanlar bulunmasındaki zorluktan kaynaklanmaktadır. Yeni kuşak antifungal ajanların geliştirilmesinde iki hedef vardır. Biri bu enfeksiyonun patogenezi daha iyi anlayabilmek için potansiyel hedefleri belirlemek, diğeri ise insan hücrelerine zarar vermeden maya hücrelerini selektif olarak inhibe edebilen, intrinsek insan savunma mekanizmalarından (rekombinant antikor) yararlanmaktır (107) .

2.15.1 Amfoterisin B

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 (109,110). 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 (111,112). Ancak *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae* ve *C.krusei* gibi bazı türler, amfoterisin B'ye karşı direnç veya azalmış duyarlılık gösterebilir (111). 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 (109,111).

2.15.2 Flukonazol

Flukonazol 1982 yılında bulunan, diflorafenil bistriazol türevidir. Flukonazol düşük konsantrasyonlarda 14- α -demetilaz enzimini ve ergosterol sentezini inhibe edip lanosterol / ergosterol oranını yükseltir. Yüksek konsantrasyonlarda lanosterol / ergosterol oranına bağlı olarak mantar hücre membranında hızlı bir şekilde hasar oluşturarak fungisid etki gösterir. Azoller oksidatif ve peroksidatif enzim sistemlerini

inhibe ederek intrasellüler toksik reaktif peroksitlerin artışına neden olurlar (107,113). Etki spektrumu geniştir. *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.kefyr* gibi türleri ilaca duyarlıdır. *C.krusei* ve *C.glabrata* suşları ise dirençlidir. *C.krusei* suşları in vitro duyarlı bulunsalar bile intrinsek dirençli olduklarından dirençli olarak rapor edilmelidir (114). Oral yolla alınan flukonazolün tamamına yakını gastrointestinal kanaldan hızla absorbe edilir. Serum proteinlerine düşük (%12) oranda bağlanır. Dokulara ve vücut sıvılarına dağılımı iyidir ve %80' i değişmeden idrarla atılır (115).

Özellikle kanserli ve AIDS hastalarının, orofarengeal ve özofageal *Candida* tedavisinde en etkili ajanlardan biridir. Ancak AIDS hastalarının %33' ünde flukonazole dirençli *Candida* türleri tespit edilmiştir ve çoğunda diğer azollere de çapraz direnç vardır (107). Flukonazol iyi tolere edilir. Yan etkileri genellikle hafif ve geçici olup az sayıda hastada görülür. Bulantı ve kusma en sık görülen yan etkileridir. Ketokonazolden farklı olarak adrenal ve testiküler steroid metabolizmasını etkilemez (107,113,115).

2.15.3. Vorikonazol

Sentetik flukonazol türevidir, oral ve IV formları mevcut olan yeni bir triazoldür, 14- α -demetilaz ve 24 metilen dihidro lanosterol demetilazı inhibe eder. *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium spp.*, *Penicillium marneffeii* ve dermatofitlerde etkilidir (107,116,117). Vorikonazol *Candida spp.* ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı fungistatik etki gösterirken *Aspergillus spp.* için fungisidal etki göstermektedir. Vorikonazolün *C.krusei* gibi bazı dirençli *Candida* türlerinin yanı sıra filamentöz mantarlara da genelde fungisidal etki gösteriyor olması olumlu bir özelliğidir. Flukonazole dirençli *Candida* suşlarının bir kısmı, çapraz direnç nedeniyle vorikonazole de dirençlidir. Vorikonazolün başlıca kullanım endikasyonları; özofageal kandidiyaz, nonnötropenik kandidemi ve invaziv aspergillozun tedavisidir. Yan etki olarak geçici görme bozukluğu, deride kızarıklık ve karaciğer enzimlerinde yükselme görülebilir (117,118).

2.15.4. Ekinokandinler

Siklik lipopeptid yapıda, fungusitik antifungal ajanlardır ve memelilerde bulunmayan 1,3- β -D gluklan sentetaz enzimini nonkompetatif olarak inhibe edip hücre duvar sentezini önlerler (119). Bu grupta bulunan ilaçlar; kaspofungin, mikafungin ve anidulofungindir. Ekinokandinlerin oral biyoyararlanımları sınırlıdır, bu nedenle IV formları geliştirilmiştir.

Kaspofungin: Kaspofungin etkisini mantarların majör hücre duvar komponenti olan 1,3 β -D gluklan sentezini önleyerek gösterir. *Candida* türlerine karşı fungisidaldir. *Aspergillus spp.*'ye karşı kullanılabilir. *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkisizdir. Azol ve Amfoterisin B dirençli *Candida* suşlarına etkili oluşları ve *Candida* biyofilmlerinde yeterli antifungal etki gösterebilmeleri önemli avantajlarından (120,121).

2.16. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde uzun yıllar yalnızca amfoterisin B ve flusitozin (5-FC) ile yetinilmiştir. Son yirmi yıl içerisinde enfeksiyon sıklığındaki çarpıcı artışla birlikte, 1980'li yıllarda triazol grubu antifungal ilaçların kullanıma girmesi; ardından mantarlarda direnç belirlenmesi ve tedavi seçiminde zorluklar birbirini izlemiştir (122,123). Bu durum antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi gereksinimini doğurmuştur. Antifungal duyarlılık testleri gerek in vitro sonuçlar ile klinik sonuçlar arasındaki korelasyon, gerekse yeni ilaçların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi açısından antibakteriyel duyarlılık testlerinin gerisinde kalmıştır. Ayrıca laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası uyum da tam olarak sağlanamamıştır. Bunun üzerine ilk kez 1982 yılında NCCLS (CLSI) bünyesinde antifungal duyarlılık testleri için bir alt komite oluşturulmuş ve bu konuda çok merkezli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda toplanan veriler doğrultusunda ilk kez 1992 yılında *Candida* türleri ve *C.neoformans* izolatları için referans bir yöntem önerilmiştir (NCCLS M27-P). İlerleyen yıllarda bu yöntem ile ilgili çalışmalar sürdürülerek 1995'de M27-T ve 1997 yılında *Candida* türleri ve *C.neoformans* için M27-A rehberleri yayımlanmıştır. Bu rehberde testte kullanılacak inokülüm miktarı, besiyeri içeriği, ısı ve inkübasyon süresi gibi değişkenlerin ve minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirleyen son değerlerin standardizasyonu ortaya konmuştur.

Küf mantarları için 1998’de M38-P ve yeni düzenlemesi ile 2002’de M38-A rehberleri yayımlanmıştır. Yine 2002’de daha kolay olan mikrodilüsyon yönteminin uygulanmasına yönelik değişikliklerle M27-A2 ve 2003 yılında da disk difüzyon testi için M-44P rehberleri yayımlanmıştır (122,124). Son olarak 2012 yılında *Candida* türleri ve *C.neoformans* için M27-A3 VE M27-S4 rehberi yayınlanmıştır (122,125).

Antifungal duyarlılık testlerinin hangi durumlarda uygulanması gerektiği maddelerle belirlenmiştir. Buna göre;

- 1) Etken mikroorganizmaya etkili olduğu bilinen antifungal ilaç ile tedaviye yanıt alınmadığı durumlarda
- 2) Alternatif ilaçların araştırılmasının gerektiği ve özellikle seçilen ilaca karşı mantarın direnci olduğu bilinen durumlarda
- 3) Direncin sıklıkla görüldüğü flusitozin ile tedavi öncesinde ve esnasında
- 4) Yeni ilaçların kullanıldığı durumlarda
- 5) Nötropeni v.b ağır immün sistem yetmezliği bulunan hastalarda sistemik enfeksiyon geliştiğinde
- 6) İn vitro ve in vivo uyumun belirlenmesini amaçlayan durumlarda antifungal duyarlılık testleri uygulanmalıdır (122).

Tablo 2.2. Mayalar için referans yöntem (CLSI M27-A3,M27-S4) (122,125)

Yöntem	Mikrodilüsyon
Besiyeri	RPMI1640 (L-glutarninli, sodyum bikarbonatsız)
Tampon	Morfolinopropansülfonik asit (MOPS) 0,165 M
pH	7,0
İnokulum	0.5-2.5x10 ³ cfu/MI
Süre	48 saat (<i>Candida</i>), 72 saat (<i>C.neoformans</i>)
MIK Değeri	Azoller ve flusitozin skor "2" (üremenin %80 azalması) Amfoterisin B için skor "0" (üremenin tam inhibisyonu)
Öneri	Azoller için mikroplağın okunmadan önce çalkalanması

CLSI'nin önerdiği mikrodilüsyon yöntemi ile ilgili teknik güçlükler ve görsel değerlendirmenin subjektif olması gibi nedenlerle, rutin laboratuvarlarda daha kolay uygulanabilecek alternatif yöntem arayışları tüm dünyada devam etmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntemler aşağıda gösterilmiştir.

2.16.1. Antifungal duyarlılık test yöntemleri:

2.16.1.1. Dilüsyon temeline dayalı yöntemler:

a) Buyyon makrodilüsyon yöntemi:

Genellikle pH indikatörlü RPMI 1640 besiyeri kullanılmaktadır. Antifungal ilaçlar önce uygun çözeltiler içerisinde sulandırılıp filtrelerden süzülerek steril edilirler. Mayanın steril SF içerisinde süspansiyonu hazırlanır. Hazırlanan antimikotiklerden 0,1 ml, üzerine de maya içeren solüsyondan 0,9 ml deney tüplerine eklenir ve karıştırılır. 35°C’de 46-50 saat inkübasyon sonunda ilaçlı besiyeri tüpleri, üreme kontrol tüpleri ile kıyaslanarak görsel olarak değerlendirilirler (123).

b) Buyyon mikrodilüsyon yöntemi:

Makrodilüsyon yöntemine benzer. Fakat yapılması daha kolay, daha ucuz ve daha az zaman alıcı olup 24 saatte sonuç alınabilir. Önce ilaçların ve mantarlarının uygun sulandırılmaları hazırlanır. Deneyler U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikropaklarda çalışılır. Kuyucuklara 100’er µl ilaç solüsyonu ve 100’er µl maya solüsyonu dağıtılır. Plaklar 35°C’de 24- 48 saat inkübe edilir. Test çukurları üreme kontrol çukuru ile görsel olarak değerlendirilir. Elde edilen bulanıklık 0’dan 4’e kadar rakamla ifade edilir:

0: Bulanıklık yok

1: Hafif bulanık (kontrole göre % 0- 25 bulanıklık)

2: Bulanıklıkta belirgin azalma (kontrole göre %25- 50 bulanıklık)

3: Bulanıklıkta hafif azalma (kontrole göre %75- 100 bulanıklık)

4: Bulanıklıkta azalma yok (kontrole göre %100 bulanıklık)

Bu kriterler göz önüne alındığında MİK değeri amfoterisin B için hiç bulanıklığın olmadığı 0 değeri, azoller için ise 2 değeridir (121,125).

c) Agar dilüsyon yöntemi:

Agar besiyeri hazırlanırken içerisine 1/10 oranında ilaç dilüsyonları ilave edilir. Üreme kontrolü için de ilaçsız besiyeri hazırlanır. Maya solüsyonu diğer yöntemlerdeki gibi hazırlanır. Besiyerine 1- 3 µl bu solüsyonlardan ekim yapılır. Ekimler 30°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilir. Koloninin üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir (123).

2.16.1.2. Difüzyon yöntemleri:

a) Disk difüzyon yöntemi

Kolay, hızlı, ucuz bir yöntem olup *Candida* ve diğer mayalara karşı flukonazol ve vorikonazol için direnç durumunu belirlemede kullanılır (121).

b) Etest yöntemi

Azalan dilüsyonlarda antifungal ajanın emdirildiği plastik bir stribin, test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı agar plağı yüzeyine yerleştirilmesi ve antifungalın besiyerine diffüze olmasına dayanan bir testtir. Agar yüzeyinde üreme inhibisyon zonu ile antifungal emdirilmiş stribin kesiştiği noktadan MİK değeri saptanabilir. Bu test için önerilen besiyeri MOPS (morfolinopropan sülfonik asit) ile tamponlanmış RPMI 1640 katı besiyeridir. Amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve flusitozin Etest stripleri ticari olarak mevcuttur. Yapılan çalışmalar, Etest ile tespit edilen MİK değerleri ve referans mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerleri arasında %85-100 oranında uyum olduğu göstermiş ve kantitatif sonuç alınmasında etkili bir yöntem olduğu ispatlanmıştır. Uygulama kolaylığı ve uygulama esnasında gereksinim duyulan ek malzemelerin azlığı nedeniyle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerindeki birçok rutin laboratuvarında yüksek duyarlılıklı bir antifungal test olarak kullanılmaktadır. Testin değerlendirilmesi aşamasında doğabilecek yanlış yorumlar bakımından mikrodilüsyon yöntemine göre daha güvenilirdir. Pahalı olması en önemli dezavantajıdır (123,124).

2.16.1.3. Akım sitometri (Flowcytometry) temeline dayanan yöntemler

DNA'ya bağlanan vital boyalar ile ölü ve canlı hücre ayırma temeline dayanır. Ortama eklenen floresanlı boyalar hücrelerde ilaca bağlı membran hasarı oluştuğunda hücre içine girmektedir. Bu şekilde antifungal ilaçların etkinliği ve MİK değerleri belirlenebilmektedir (123).

2.16.1.4. Diğer yöntemler

a) CLSI ile yüksek uyumlu olan ergosterol biyosentezinin engellenmesini ölçen test, azoller için kullanılır.

b) Üreme olup olmasına göre XTT, MTT gibi tetrazolyum bromür, tetrazolyum hidroksit boyalarının kolorimetrik araç olarak renk değiştirmelerine dayanan testlerdir.

c) İlacın etkinliğini hücre içi ATP yoğunluğunu ölçerek belirleyen testtir (121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1. ÖRNEKLER

Temmuz 2011- 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısıyla takip edilen ve kan kültüründe maya üreyen 50 hasta çalışmaya alındı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, altta yatan hastalığı, maya üretilmesine kadar geçen süre, servisi gibi bazı epidemiyolojik bilgileri kaydedildi.

3.2.İZOLASYON

Kan kültürleri Bact/Alert 3D otomatize sistemi ile değerlendirildi. Çocuklar için BacT/ALERT PF Pediatric FAN ve erişkinler için BacT/ALERT FA FAN® Aerobic şişeleri (Biomérieux, France) kullanıldı. Cihazda üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama sonucu maya olarak tanımlanan kan kültürü örnekleri toplandı. Kan kültürü şişeleri öncelikle PNA FISH yöntemiyle tiplendirildi ardından SDA besiyerine ekim yapıldı. Standart suş olarak *C.albicans* ATCC 90028 kullanıldı.

3.3.TANIMLAMA

Saf olduğu anlaşılan kùltùrlerden; makroskobik morfolojisi ve mikroskobik morfolojisi için lam kùltürü, germ tüp testi, sikloheksimid hassasiyeti, üreaz testi, karbonhidrat asimilasyonu testi için API 20C AUX (Biomerieux) testleri yapıldı.

3.3.1. Germ Tüp Testi

SDA besiyerinde üreyen kolonilerden 1-2 koloni öze yardımıyla alınarak endrof tüp içerisinde bulunan 0,5 ml insan serumu ile karıştırıldı. Bu karışım 37°C'de 2.5-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra lam lamel arası preparat hazırlanıp ışık mikroskobunda x40 büyütmede incelendi. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık olmayan filament şeklindeki yapılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp üreten maya kökenleri *C.albicans* olarak tanımlandı.

3.3.2. Üreaz testi

Üreaz enzimine sahip mikroorganizmalar, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalar. Amonyak ortamın alkali olmasını sağlar. Üre ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren besiyerinde üreme olduğuunda, üreaz enziminin varlığı, amonyağın oluşturduğu alkali ortamda fenol kırmızısının koyu pembe renge dönüşmesiyle saptanmaktadır. Bu test klinik önemi olan *Candida* türlerini diğer mayalardan ayırmaktadır. Klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir. *C.krusei* ve *C.lipolytica* üreyi hidroliz edebilir.

3.3.3. Mısır Unu Ekstresi- Tween 80 Agar ile Lam Kùltürü

Hazırlanışı

1000 ml sterildistile su ile 17 gr Corn-Meal agar karıştırılıp, 121°C' de 15 dakika otoklavlandı. SDA besiyerindeki saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze yardımıyla bir parça alınarak lam kùltürü düzeneğine birbirine paralel dört çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekimlerin, besiyerini yırtmadan ve özeyi dibe kadar batırmadan yapılmasına dikkat edildi. Her bir mayaya ait ekim işlemleri tamamlandıktan sonra ekim çizgileri üzerine steril lamel kapatılan lam kùltürü düzeneği 25°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekimler ışık mikroskobunda 10x, 20x ve 40x büyütmede incelendi.

3.3.4. API 20C AUX Maya Tanımlama Sistemi

SDA besiyerinde üreyen maya kolonilerinin karbondioksit asimilasyonunu değerlendirebilmek için ticari kitlerden API 20C AUX (bioMerieux, Fransa) kullanıldı.

API 20C AUX stripi, 19 asimilasyon testinin performansını gösterebilen ve dehidrate substratlar içeren 20 küpülden oluşur. Küpüller yarı-katı bir minimal madde ile inoküle edilir ve mayalar karbon kaynağı olarak her bir substratı kullanma kapasitesine sahip olduklarında çoğalabilirler. Test edilen karbonhidratlar: glukoz, gliserol, 2-keto-D-Glukonat, L-Arabinoz, D-ksiloz, ADOnitol, ksilitol, galaktoz, inozitol, sorbitol, a-Metil-D-Glukosid, asetil-D-Glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur. Mayalar inoküle edildikleri mikro kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorlarsa, o kuyucukta üreme olur. API 20C AUX'la mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri, 24. 48. ve 72. saatte değerlendirilerek sonuç verilir.

Testin uygulanması

1. **Stripin hazırlanması:** İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu, strip paketi açılarak kabın içine yerleştirildi.
2. **Inokülasyon:** SDA'daki 24 saatlik *Candida* kolonilerinden steril bir öze ile alınarak, 2 ml'lik Suspension Medium (%0.85 NaCl) içinde karıştırılarak, yoğunluğu 2 McFarland'a ayarlandı. Bu süspansiyondan 100µL kit içeriğinde olan C Medium içine aktarıldı. Steril bir pipet kullanılarak, C Medium'daki süspansiyondan strip içindeki kuyucuklara dolacak, fakat taşmayacak şekilde 300µL dağıtıldı. Strip inkübasyon kabının içine yerleştirilip, kapağı kapatıldı. 25°C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı.
3. **Stripin okunması:** Bulanıklık olan kuyucuklarda üreme pozitif kabul edildi. Negatif kontrolde üremenin olmamasına dikkat edildi. Özellikle glukoz kuyucuğunda belirgin üreme yoksa inkübasyon süresi 24 saatten 72 saate kadar uzatıldı. Üreme olan kuyucuklar not edildi.
4. **Tanımlama:** Bunun için, test prosedürüne göre, pozitif kuyucuklara değerlendirme cetvelinde 1, 2, 4 gibi numaralar verildi. Her bir grup içindeki sayılar toplandı ve sayısal profil elde edildi. Hif oluşumu için de 4 sayı eklendi. Elde edilen sayısal profil, API 20C AUX Analytical Profile Index'e göre değerlendirildi (API 20C AUX, bioMerieux, France kit prosedürü).

3.3.5. Kromojenik Besiyeri (KB)

Bu işlemin amacı *Candida* türlerinin bu besiyerlerinde üreyerek oluşturdukları koloni renkleri yardımıyla ayırt edilmesidir. Bu çalışmada Brilliance™ *Candida* Agar (Oxoid, England) kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Tablo 3.1. Brilliance™ *Candida* Agar içeriği

Tipik Formül	gram/litre
Pepton	4.0
Kromojenik mix	13.6
Agar	13.6

Tablo 3.2. Brilliance™ *Candida* selective supplement içeriği

Şişe içeriği (500 ml için)	1şişe için
Kloramfenikol	250mg

Besiyerinin hazırlanması:

- 1) 15.6 gr besiyeri 500ml steril distile su içerisinde çözüldü.
- 2) 1 şişe Brilliance *Candida* Selective Supplement içerisine 3ml % 70'lik etil alkolde çözüldü homojen hale gelince besiyeri üzerine eklendi.
- 3) İyiye karıştırıldıktan sonra sık sık çalkalanarak kaynatıldı
- 4) Otoklavlanmadı.
- 5) Besiyeri 45⁰C soğutuldu petrilere eşit olarak döküldü.

Deney için ekim yapılan suşlar 37⁰C'de 48-72 saat inkübe edildi.

Tablo 3.3. Brilliance™ *Candida* Agarda kullanılan enzimler ve türlere göre renk dağılımı

Kromojen: Enzim:	X-NAG Hexosaminidaz	BCIP Alkalen fosfataz	Tipik koloni görünümü
<i>C. tropicalis</i>	+		Koyu mavi
<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	+		Yeşil
<i>C. krusei</i>		+	Kuru, düzensiz pembe-kahverengi
<i>C. glabrata</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. lusitaniae</i>		Değişken	Bej/sarı/kahverengi

3.3.6. PNA FISH yöntemi

Bu testin amacı kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin direkt olarak kan kültürü şişesinden 90 dakika gibi kısa bir sürede tanımlanmasıdır. Bu test için Yeast Traffic Light® PNA FISH® (AdvanDx, USA) kiti kullanıldı.

Kit içeriği:

- 1) Fiksasyon solüsyonu
- 2) YTL PNA FISH probu
- 3) 60X yıkama solüsyonu
- 4) Mounting sıvısı

Testin uygulanması:

- 1) Lam üzerine 1 damla fiksasyon solüsyonu eklendi.
- 2) Kan kültürü şişesinden 10µl veya küçük bir damlayı lam üzerinde fiksasyon solüsyonu ile hafifce karıştırıldı.
- 3) Lamı ısı, alev veya metanol fiksasyonu ile fiske edildi.

- 4) Yıkama solüsyonu (4ml 60X yıkama solüsyonu + 240ml dH₂O) ve yıkama şelalesi hazırlandı. Kapağı kapatıldı. 55⁰C su banyosunda ön ısıtması başlandı.
- 5) Fiske lamların üzerine bir damla PNA probu damlatıldı. Üzerine hava kabarcığı oluşmayacak şekilde lamel kapatıldı.
- 6) Lamlar 55⁰C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- 7) Lamlar 55⁰C'de önceden ısıtılmış yıkama solüsyonuna yerleştirildi ve üzerindeki lamlar dikkatlice kaldırıldı.
- 8) 55⁰C'de 30 dk boyunca inkübe edildi.
- 9) Şale içinde lam tablası çıkarıldı ve lamların dışarıda kurumaması beklendi.
- 10) Örneğe 1 damla mounting sıvısından eklendi. Üzeri hava kabarcığı oluşmasından kaçınılarak lamelle kapatıldı.
- 11) 60X veya 100X mercek kullanılarak immersiyon yağıyla incelendi.

Testin değerlendirilmesi:

Lamları incelemek için floresan mikroskopa Dual Band filtresi (AdvanDx, USA) takıldı. *C.albicans* ve *C.parapsilosis* yeşil, *C.glabrata* ve *C.krusei* kırmızı, *C.tropicalis* sarı renkte floresan veren mayalar olarak görüldü.

3.4 ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Çalışmaya alınan *Candida* suşlarının amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin ve vorikonazol antifungal duyarlılığı araştırıldı.

3.4.1 Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 ve M27-S4 doğrultusunda hazırlandı ve uygulandı.(122,125)

Antifungal ajanlar: Amfoterisin B (Sigma, ABD), flukonazol (Pfizer, Türkiye), vorikonazol (Sigma, ABD) saf etken maddeleri kullanıldı.

Besiyeri hazırlama: Besiyeri olarak RPMI 1640 (L glutaminli) (Sigma, ABD) kullanıldı. 900 ml distile suda 10.4 gr toz besiyeri eritildi ve tampon madde olarak 34.53 gr MOPS (Sigma, ABD) eklendi. Besiyerinin homojenizasyonu sağlandıktan sonra 1M NaOH ile besiyerinin pH'ı 7'e ayarlandı. Distile su ile son hacim 1lt'ye tamamlandı. Besiyeri filtrasyon yöntemi ile sterilize edildi ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

-İlaç sulandırımı: İlaç solüsyonlarından, amfoterisin B son konsantrasyonu 0.03-16 µg/ml olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek, flukonazol son konsantrasyonu 0.125-128 µg/ml olacak şekilde steril distile su içinde çözülerek, vorikonazol son konsantrasyonu 0.125-128 µg/ml olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hazırlandı. İki kat fazla dilüsyon konsantrasyondaki mikrodilüsyonda kullanıldı.

-Maya süspansiyonlarının hazırlanması: Test edilecek izolatların SDA besiyerinde saf kültürleri elde edildikten sonra 24 saatlik kültüründen birkaç koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon vortexlendikten sonra McFarland 0.5 standardının bulanıklığına ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyonun son konsantrasyonu 0.5×10^3 - 2.5×10^3 hücre/ml 2 kat olacak şekilde dilüsyon hazırlandı.

-İnokulasyon işlemi: 96 kuyucuklu steril U mikropalak kullanıldı. İlk başta mikropalaktaki her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri konuldu. Daha sonra ilk kuyucuklara 100 µl ilaç süspansiyonlarından konuldu ve dilüsyonlarda kontrol kuyucuğu hariç hepsine seri dilüsyon uygulandı. En son olarak, sondan bir önceki kuyucuk hariç her bir kuyucuğa 100µl maya süspansiyonu ilave edildi. İlaç ve maya süspansiyonu içermeyen sondan bir önceki kuyucuk besiyeri kontrol, ilaç içermeyen son kuyucuk ise mikroorganizma kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı.

-İnkubasyon ve testin değerlendirilmesi: Mikropalaklar 35 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Mikroorganizma kontrolünde (son kuyucuk) üreme olduğu ve besiyeri kontrolünde (sondan bir önceki kuyucuk) üreme olmadığı tespit edildikten sonra, MİK değerleri CLSI'nın önerdiği kriterlere göre saptandı. Amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak tespit edildi. Flukonazol ve vorikonazol için üreme kontrol çukuruna göre bulanıklığı belirgin (~ %50) azaltan en düşük konsantrasyon MİK olarak tespit edildi. Daha sonra her antifungal için incelenen suşlarla ilgili olarak MİK50 ve MİK90 değerleri hesaplandı.

Amfoterisin B için MİK ($\mu\text{g/ml}$) > 1 ise dirençli olarak kabul edildi.

C.lusitaniae, *C.guilliermondi* ve *C.kefyr* için MİK($\mu\text{g/ml}$) > 2 ise dirençli olarak kabul edildi (126).

Tablo 3.4. *Candida* türleri için flukonazol ve vorikonazol klinik direnç sınır değerleri (122,125)

Antifungal ilaç	<i>Candida</i> türü	MİK ($\mu\text{g/ml}$)		
		S	SDD	R
Flukonazol	<i>C.albicans</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C.glabrata</i>	-	≤ 32	≥ 64
	<i>C.krusei</i>	-	-	-
	<i>C.parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C.tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8
Vorikonazol	<i>C.albicans</i>	$\leq 0,12$	0,25-0,5	≥ 1
	<i>C.glabrata</i>	-	-	-
	<i>C.krusei</i>	$\leq 0,5$	1	≥ 2
	<i>C.parapsilosis</i>	$\leq 0,12$	0,25-0,5	≥ 1
	<i>C.tropicalis</i>	$\leq 0,12$	0,25-0,5	≥ 1

S:duyarlı, R:dirençli, SDD: doza bağlı duyarlı

Tablo 3.5. *Candida* türleri için ekinokandin klinik direnç sınır değerleri(122,125)

Antifungal ilaç	<i>Candida</i> türü	MİK (µg/ml)		
		S	I	R
Kaspofungin	<i>C.albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C.glabrata</i>	≤0,125	0,25	≥0,5
	<i>C.krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C.parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C.tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1

S:duyarlı, R:dirençli, I:orta duyarlı

Antifungal Duyarlılık Çalışmalarında Kullanılan Doğruluk Yöntemleri

Doğruluk çalışmalarında kullanılan kategoriler;

- Küçük hata
- Büyük hata
- Çok büyük hata
- Temek uyum
- Kategorik uyum

Küçük Hata; Bir antifungal duyarlılık test sonucu az hassas (orta duyarlı) iken diğeri duyarlı veya dirençli sonuç vermesi küçük hata olarak değerlendirilir.(126)

$$\text{Küçük Hata} = \frac{\text{Küçük Hata Uyumsuzluklarının Sayısı}}{\text{Toplam Test}} \times 100$$

Büyük Hata; Referans antifungal duyarlılık testi duyarlı iken değerlendirilen test dirençli sonuç vermesi büyük hata olarak değerlendirilir. (126)

$$\text{Büyük Hata} = \frac{\text{Büyük Hata Uyumsuzluklarının Sayısı}}{\text{Toplam Test}} \times 10$$

Çok Büyük Hata; Referans antifungal duyarlılık testi dirençli iken değerlendirilen test duyarlı sonuç çok büyük hata olarak değerlendirilir.(126)

Çok Büyük Hata = Çok Büyük Hata Uyumsuzluklarının Sayısı / Toplam Test X 100

Temel Uyum; Test edilen antifungal duyarlılık testinin MİK'lerinin mevcut referans antifungal duyarlılık testiyle ± 1 çift kat dilüsyon içindeki uyumu temel uyum olarak kabul edilir.(126)

Temel Uyum= MİK'in ± 1 Dilüsyon İçinde Olan Karşılaştırmalarının Sayısı / Toplam Test Sonuçlarının Sayısı

Kategorik Uyum; Test edilen antifungal duyarlılık testinin referans test kriterlere göre yorumlanan duyarlılık sonuçlarının (duyarlı, az duyarlı, dirençli) mevcut referans antifungal duyarlılık testine göre uyumdur.(126)

Kategorik Uyum= Örtüşen kategorik sonuçların sayısı / Toplam test sonuçlarının sayısı X100

3.4.2. ETEST

Antifungal ajanlar

Bu yöntemde amfoterisin B, kaspofungin ve vorikonazolün 0.002-32 $\mu\text{g/ml}$ flukonazolün 0.016-256 arasında değişen konsantrasyonlardaki Etest antifungal gradient stripleri (Biomerioux, France) kullanıldı. Etest stripleri kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

Besiyeri:

Besiyeri olarak MOPS (3-morfolinopropan sülfonik asit) (MerckKGaA, Almanya) ile tamponlanmış, %0.2 glukoz ve %1,5 agar kullanılmış RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyumbikarbonatsız) (Sigma Chemical CO, StLois, MO, ABD) toz besiyeri kullanıldı.

MOPS tamponlu RPMI 1640 agar besiyerinin hazırlanması:

- 1) 34,53 g MOPS 1 lt distile suda çözüldü. (0,165 M)
- 2) 15 g agar (Himedia, Hindistan), 450 ml 0,165 M MOPS ilave edilerek eritildi ve 1 M NaOH ile pH7.0'a ayarlandı. Son hacim MOPS buffer ile 500 ml'ye tamamlandı.

3) 10,4 g RPMI 1640 toz besiyeri ve 18 g glukoz 450 ml 0,165 M MOPS ilave edilip eritildi ve 1M NaOH ile pH 7,0'a ayarlandı. Son hacim MOPS buffer ile 500 ml'ye tamamlandı.

4) İki solüsyon karıştırılarak hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Doksan mm çapındaki petrilere yüksekliği 4-5 mm olacak şekilde yaklaşık 25'er ml dağıtıldı..

5) Kullanılincaya kadar +4 °C'de saklandı.

Maya inokülumunun hazırlanması

Test öncesi tüm suşlar SDA besiyerine pasajlanıp, 35°C'de inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saatlik taze kültürden alınarak steril serum fizyolojik içerisine inoküle edildi 0,5McFarland bulanıklığa ayarlandı. Bu işlemle hazırlanan maya süspansiyonunun her mililitrede $1-5 \times 10^6$ hücre/ml içermesi amaçlandı.

İnokülasyon, inkübasyon ve değerlendirme;

0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonu, pamuk uçlu steril eküvyon çubuklarla 90 mm çaplı RPMI 1640 agar plaklarına yayıldı. Plakların kuruması için yaklaşık 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra her üç antifungal strip (amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin ve vorikonazol) plaklar yerleştirildi. Tüm plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon elipsleri değerlendirilirken, üretici firma ve CLSI önerileri doğrultusunda amfoterisin B için üremenin tam inhibe olduğu (%100 inhibisyon) değer; vorikonazol, flukonazol ve kaspofungin için ise üremenin %80 inhibe olduğu değer, o antifungal için MiK değeri olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Temmuz 2011 - 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerinde takip edilen 50 hastadan alınan maya pozitif kan kültürü örnekleri ve bir standart suş çalışmaya alındı.

Tablo 4. 1. Hasta gruplarının kliniklere göre dağılımı

Servisler	Hasta Sayısı	(%)
Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	12	24
Göğüs Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	11	22
Hematoloji-Onkoloji Servisi	7	14
Pediyatri Servisleri	5	10
Gastroenteroloji Servisi	4	8
Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi	3	6
Kalp Damar Cerrahisi Servisi	3	6
Kulak Burun Boğaz Servisi	2	2
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	2	2
Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesi	1	2
TOPLAM	50	100

Çalışmada kullanılan 50 hastanın 8'i (%16) çocuk, 42'si (%84) erişkindi. Çocuk hastaların yaş ortalaması $4 \pm 3,89$ 'du. Erişkin hastaların 27 (%64,2) si erkek, 15 (%35,8) tanesi kadındı. Erişkin hastaların yaş ortalaması $56,9 \pm 23,7$ idi. Çalışmaya alınan hastaların kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

4.1 MAYALARIN TANIMLANMASI

İzole edilen 50 *Candida* suşu morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere (konvansiyonel yöntemler) göre, 19 (%38) *C.albicans*, 12 (%24) *C.glabrata*, 5 (%10) *C.parapsilosis*, 5(%10) *C.kefyr*, 4(%8) *C.krusei*, iki(%4) *C.guilliermondii*, iki(%4) *C.tropicalis*, bir(%2) *C.lusitaniae* olarak tanımlandı. *Candida* türlerinin dağılımı Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.*Candida* türlerinin dağılımı

Candida türü	Sayı	% (yüzde)
<i>C.albicans</i>	19	38
<i>C.glabrata</i>	12	24
<i>C.parapsilosis</i>	5	10
<i>C.kefyr</i>	5	10
<i>C.krusei</i>	4	8
<i>C.guilliermondii</i>	2	4
<i>C.tropicalis</i>	2	4
<i>C.lusitaniae</i>	1	2
Toplam	50	100

4.1.1 Kromojenik Besiyeri Sonuçları:

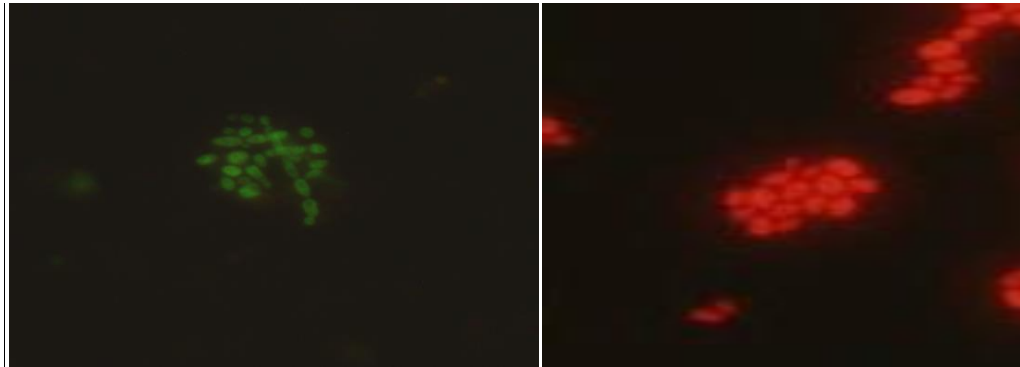
Kromojenik besiyerinde yeşil renkli pigment veren koloniler oluşturan 19 suş *C.albicans*, sarı- kahverengi pigment veren koloniler oluşturan 17 suş *C.glabrata* veya *C.parapsilosis*, pembemsi pigment veren kuru koloniler oluşturan 4 suş *C.krusei*, mavi renkli pigment veren koloniler oluşturan iki suş *C.tropicalis* ve pigment vermeyen koloniler oluşturan 8 suş diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi. ATCC 90028 *C.albicans* standart suşu kromojenik besiyerinde yeşil renkli görüldü. *Candida* suşlarının kromojenik besiyerindeki dağılımı Tablo 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. a) Kromojenik Besiyerinde *C.albicans* (yeşil), *C.parapsilosis* (krem-kahverengi), *C.krusei* (kuru pembemsi), *C.tropicalis* (mavi)
b) Kromojenik Besiyerinde *C.albicans* (yeşil)

4.1.2 PNA FISH Sonuçları:

PNA FISH yöntemiyle tanımlama yapıldığında; yeşil renkli floresan veren 25 suş *C.albicans* veya *C.parapsilosis*, kırmızı renkli floresan veren 16 suşun küçük yuvarlak mayaları olan 12 suş *C.glabrata* ve oval büyük mayaları olan 4 suş *C.krusei*, sarı renkli floresan veren bir suş *C.tropicalis* olarak değerlendirilirken floresan vermeyen 8 suşta diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi. ATCC 90028 *C.albicans* standart suşu PNA FISH yöntemiyle değerlendirildiğinde yeşil renkli görüldü. *Candida* suşlarının PNA FISH sonuçları Tablo4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. PNA FISH Yeşil: *C.albicans*, Kırmızı: *C.glabrata*

4.1.3 Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması:

Konvansiyonel yöntemler ile kromojenik besiyeri karşılaştırıldığında; kromojenik besiyerinin tanımlayamadığı 5 *C.kefyr*, iki *C.guilliermondi* ve bir *C.lusitania* suşu hariç tüm suşlar uyumluydu.

Konvansiyonel yöntemler ile PNA FISH karşılaştırıldığında; PNA FISH değerlendirme prospektüsünde olmayan 5 *C.kefyr*, iki *C.guilliermondi*, bir *C.lusitania* suşunu tanımlayamadı. Ayrıca *C.albicans* olarak tanımlanan bir *C.tropicalis* suşu haricindeki suşlar uyumluydu.

Kromojenik besiyeri ve PNA FISH sonuçları karşılaştırıldığında; tanımlayamadığı türler aynıydı. Sadece kromojenik besiyerinde *C.tropicalis* olarak tanımlanan bir suş PNA FISH yöntemiyle *C.albicans* olarak yanlış olarak tanımlandı.

Tablo 4. 3.*Candida* suşlarının üç yöntemle gösterilmesi

Suş no	Konvansiyonel yöntemler	Kromojenik besiyeri*	PNA FISH**
1	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
2	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
3	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
4	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
5	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
6	<i>C.guilliermondi</i>	Krem rengi	-
7	<i>C.parapsilosis</i>	Sarı-Kahverengi	Yeşil
8	<i>C.krusei</i>	Kuru pembemsi	Kırmızı
9	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
10	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
11	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
12	<i>C.tropicalis</i>	Mavi	Yeşil
13	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
14	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
15	<i>C.parapsilosis</i>	Sarı-Kahverengi	Yeşil
16	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
17	<i>C.parapsilosis</i>	Sarı-Kahverengi	Yeşil
18	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
19	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
20	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
21	<i>C.kefyr</i>	Krem rengi	-

22	<i>C.keyfr</i>	Krem rengi	-
23	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
24	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
25	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
26	<i>C.krusei</i>	Kuru pembemsi	Kırmızı
27	<i>C.lusitaniae</i>	Krem rengi	-
28	<i>C.kefyr</i>	Krem rengi	-
29	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
30	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
31	<i>C.krusei</i>	Kuru pembemsi	Kırmızı
32	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
33	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
34	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
35	<i>C.kefyr</i>	Krem rengi	-
36	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
37	<i>C.guilliermondi</i>	Krem rengi	-
38	<i>C.parapsilosis</i>	Sarı-Kahverengi	Yeşil
39	<i>C.krusei</i>	Kuru pembemsi	Kırmızı
40	<i>C.kefyr</i>	Krem rengi	-
41	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
42	<i>C.parapsilosis</i>	Sarı-Kahverengi	Yeşil
43	<i>C.tropicalis</i>	Mavi	Sarı
44	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
45	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
46	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
47	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
48	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil
49	<i>C.glabrata</i>	Sarı-Kahverengi	Kırmızı
50	<i>C.albicans</i>	Yeşil	Yeşil

***Kromojenik besiyeri sonuçları** Yeşil koloniler: *C.albicans*; Sarı-Kahverengi koloniler: *C.glabrata*, *C.parapsilosis*; Kuru pembemsi koloniler: *C.krusei*; Mavi koloniler: *C.tropicalis*, Krem rengi koloniler: Kromojenik besiyerinde tanımlanamayan türler

****PNA FISH sonuçları** Yeşil: *C.albicans*, *C.parapsilosis*; Kırmızı: *C.glabrata*, *C.krusei*; Sarı: *C.tropicalis*

"- "Test kit prosedüründe değerlendirilmede bulunmayan türler

4.2 DUYARLILIK SONUÇLARI:

Duyarlılık sonuçlarına bakıldığında izole edilen 50 *Candida* suşunun antifungal duyarlılık testleri mikrodilüsyon ve Etest yöntemiyle yapıldı. Mikrodilüsyon ve Etest yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları Tablo 4,4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Mikrodilüsyon ve Etest yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları

Yöntem		Mikrodilüsyon			Etest			
Antifungaller*		Amp	Flu	Vo	Amp	Flu	Vo	Kas
SUŞ NO	TÜR							
1	<i>C.albicans</i>	0.06	0.25	0.03	0.032	0.125	0.064	0.004
2	<i>C.albicans</i>	0.03	0.25	0.03	0.064	0.125	0.032	0.002
3	<i>C.albicans</i>	0.125	0.125	0.03	0.125	0.125	0.032	0.002
4	<i>C.albicans</i>	0.125	0.5	0.03	0.064	0.064	0.064	0.002
5	<i>C.albicans</i>	0.06	0.25	0.03	0.032	0.25	0.125	0.008
6	<i>C.albicans</i>	0.125	0.25	0.03	0.25	0.50	0.008	0.016
7	<i>C.albicans</i>	0.125	0.25	0.03	0.016	1	0.032	0.064
8	<i>C.albicans</i>	0.06	0.5	0.03	0.50	8	0.25	0.125
9	<i>C.albicans</i>	0.125	0.25	0.03	0.004	0.50	0.064	0.016
10	<i>C.albicans</i>	0.25	2	0.25	0.064	0.016	0.064	0.125
11	<i>C.albicans</i>	0.125	0.25	0.03	0.008	0.50	0.064	0.004
12	<i>C.albicans</i>	0.125	0.25	0.03	0.064	0.25	0.032	0.004
13	<i>C.albicans</i>	0.125	0.5	0.03	0.032	0.125	0.032	0.008
14	<i>C.albicans</i>	0.06	0.125	0.03	0.016	0.064	0.064	0.016
15	<i>C.albicans</i>	0.03	0.25	0.03	0.032	0.125	0.008	0.008
16	<i>C.albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.064	0.125	0.032	0.002
17	<i>C.albicans</i>	0.03	1	0.125	0.002	0.25	0.002	0.004
18	<i>C.albicans</i>	0.125	0.5	0.03	0.008	0.125	0.50	0.004
19	<i>C.albicans</i>	0.25	1	0.06	0.064	16	0.064	0.25
20	<i>C.glabrata</i>	0.25	8	0.25	0.064	4	0.25	0.125

21	<i>C.glabrata</i>	0.125	8	0.125	0.50	16	0.25	0.125
22	<i>C.glabrata</i>	0.125	0.125	0.03	0.50	0.125	0.064	0.004
23	<i>C.glabrata</i>	0.25	8	0.5	0.008	16	0.25	0.125
24	<i>C.glabrata</i>	0.06	0.125	0.03	0.125	16	0.064	0.25
25	<i>C.glabrata</i>	0.06	125	0.03	0.064	0.50	0.125	0.032
26	<i>C.glabrata</i>	0.25	8	0.125	0.25	4	0.008	0.064
27	<i>C.glabrata</i>	0.125	4	0.03	0.25	4	0.25	0.50
28	<i>C.glabrata</i>	0.125	2	0.03	0.125	8	0.125	0.125
29	<i>C.glabrata</i>	0.25	1	0.03	0.002	8	0.002	0.50
30	<i>C.glabrata</i>	0.125	1	0.06	0.50	4	0.125	0.064
31	<i>C.glabrata</i>	0.03	1	0.03	0.016	0.064	0.004	0.002
32	<i>C.parapsilosis</i>	0.06	2	0.125	0.004	4	0.064	0.004
33	<i>C.parapsilosis</i>	0.03	0.125	0.06	0.064	0.25	0.25	0.016
34	<i>C.parapsilosis</i>	0.25	2	0.125	0.032	0.25	0.125	0.016
35	<i>C.parapsilosis</i>	0.125	0.5	0.06	0.008	1	0.25	0.032
36	<i>C.parapsilosis</i>	0.03	1	0.03	0.008	0.125	0.002	0.016
37	<i>C.kefyr</i>	0.25	1	0.03	0.064	0.064	0.032	0.016
38	<i>C.kefyr</i>	0.25	1	0.03	0.50	0.25	0.125	0.016
39	<i>C.kefyr</i>	0.25	1	0.03	0.002	16	0.002	0.064
40	<i>C.kefyr</i>	0.5	2	0.03	0.125	16	0.125	0.25
41	<i>C.kefyr</i>	0.25	1	0.03	0.125	0.50	0.125	0.016
42	<i>C.krusei</i>	0.06	4	0.25	0.25	16	0.125	0.125
43	<i>C.krusei</i>	0.25	4	0.125	0.50	8	0.125	0.016
44	<i>C.krusei</i>	0.25	4	0.5	0.008	16	0.064	0.25
45	<i>C.krusei</i>	0.25	4	0.06	0.50	16	0.25	0.25
46	<i>C.guilliermondii</i>	0.125	2	0.06	0.125	4	0.25	0.032
47	<i>C.guilliermondii</i>	0.06	2	0.06	0.008	0.50	0.50	0.032
48	<i>C.tropicalis</i>	0.25	0.5	0.25	0.25	16	0.002	0.064
49	<i>C.tropicalis</i>	0.125	0.5	0.03	0.064	0.064	0.016	0.008
50	<i>C.lusitaniae</i>	0.125	1	0.06	0.50	16	0.002	0.125

*Amp B: amfoterisin B, Flu: flukonazol, Vo: vorikonazol

4.2.1. Mikrodilüsyon sonuçları:

CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 Broth Mikrodilüsyon referans yöntemine göre antifungal duyarlılık sonuçları MİK50, MİK90 değerleri ve MİK aralıkları tablo 4.5'de verilmiştir. Kaspofungin etken maddesi temin edilemediği için mikrodilüsyon yönteminde kullanılamamıştır.

4.2.2. Etest Sonuçları:

Etest antifungal duyarlılık sonuçları MİK50, MİK90 değerleri ve MİK aralıkları Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Mikrodilüsyon ve Etest yöntemi antifungallere göre MİK50/MİK90 değerleri ve MİK aralıklar

		Amfoterisin B			Flukonazol			Vorikonazol			Kaspofungin		
		MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı
<i>C.albicans</i> (19)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,125	0,25	0,03-0,25	0,25	1	0,125-2	0,03	0,125	0,03-0,25	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,032	0,125	0,002-0,50	0,125	1	0,016-1	0,008	0,125	0,002-0,25	0,064	0,25	0,002-0,50
<i>C.glabrata</i> (12)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,125	0,25	0,03-0,25	2	8	0,125-125	0,03	0,25	0,03-0,50	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,125	0,50	0,002-0,50	4	16	0,125-16	0,125	0,50	0,002-0,50	0,125	0,25	0,002-0,25
<i>C.parapsilosis</i> (5)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,06	0,125	0,03-0,25	0,25	2	0,125-2	0,06	0,125	0,03-0,125	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,008	0,032	0,004-0,064	1	1	0,125-4	0,016	0,016	0,004-0,032	0,125	0,25	0,002-0,25
<i>C.kefyr</i> (5)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,25	0,25	0,25-0,50	1	1	1-2	0,03	0,03	0,03-0,03	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,125	0,125	0,002-0,50	0,50	16	0,064-16	0,016	0,064	0,016-0,25	0,125	0,125	0,002-0,125
<i>C.krusei</i> (4)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,25	0,25	0,06-0,25/	4	4	4-4	0,125	0,25	0,06-0,50	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,25	0,50	0,008-0,50	16	16	8-16	0,125	0,25	0,016-0,25	0,125	0,125	0,064-0,25
<i>C.guilliermondii</i> (2)	<i>Mikrodilüsyon</i>	-	-	0,06-0,125	-	-	2-2	-	-	0,06-0,06	-	-	-
	<i>Etest</i>	-	-	0,008-0,125	-	-	0,50-4	-	-	0,032-0,032	-	-	0,25-0,50
<i>C.tropicalis</i> (2)	<i>Mikrodilüsyon</i>	-	-	0,125-0,25	-	-	0,50-0,50	-	-	0,03-0,25	-	-	-
	<i>Etest</i>	-	-	0,064-0,25	-	-	0,064-16	-	-	0,008-0,064	-	-	0,002-0,016
<i>C.lusitaniae</i> (1)	<i>Mikrodilüsyon</i>	-	-	0,125	-	-	1	-	-	0,06	-	-	-
	<i>Etest</i>	-	-	0,50	-	-	16	-	-	0,125	-	-	0,002
TOPLAM (50)	<i>Mikrodilüsyon</i>	0,125	0,25	0,03-0,50	0,50	16	0,125-125	0,03	0,25	0,03-0,503	-	-	-
	<i>Etest</i>	0,064	0,50	0,002-0,50	1	16	0,016-16	0,016	0,25	0,002-0,50	0,064	0,25	0,002-0,50

MİK50: Test popülasyonunun %50 kadarının inhibe eden değer, **MİK90:** Test popülasyonunun %50 kadarının inhibe eden değer

MİK aralığı: En düşük ve en yüksek konsantrasyondaki MİK değerleri

4.2.3. Referans yönteme göre hata değerlendirilmesi:

CLSI M27-A3 ve M27-S4 broth mikrodilüsyon referans alındığında tüm kategorik hataların küçük hatada yoğunlaştığı görülmüştür. Amfoterisin B için orta duyarlılık değeri bulunmadığı için küçük hata hesaplanamadı. Büyük hatanın görüldüğü tek antifungal flukonazoldü. Çalışmamızda çok büyük hata yoktu. Tüm değerler Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6. CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 broth mikrodilüsyon referans alınarak Etest yöntemindeki hataların değerlendirilmesi

	Etest					
	Toplam hata					
	Küçük Hata		Büyük Hata		Çok Büyük Hata	
	Toplam sayı/ Hata sayısı	%	Toplam sayı/ Hata sayısı	%	Toplam sayı/ Hata sayısı	%
Amfoterisin B	-	-	50/0	0	50/0	0
Flukonazol	46/5	10	46/7	15	46/0	0
Vorikonazol	30/2	7	38/0	0	33/0	0
Toplam(%)	76/7	9,2	134/7	5,2	129/0	0

"-" uygulanamadı

4.2.4. Referans yönteme göre uyum değerlendirilmesi:

Kategorik uyum; Amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için toplam kategorik uyum Tablo4.7.da gösterilmiştir. CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 broth mikrodilüsyon referans yöntemine göre *C.glabrata* için vorikonazol ve *C.krusei* için flukonazol çalışılması önerilmediği için hesaplanmamıştır.

Temel uyum; Amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için toplam temel uyum Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 broth mikrodilüsyon referans alınarak Etest yöntemindeki uyumun değerlendirilmesi

Test yöntemi	<i>Candida</i> türleri	İzolasyon sayısı	% Kategorik uyum				% Temel uyum			
			Amp*	Flu	Vo	Toplam	Amp	Flu	Vo	Toplam
Etest	<i>C.albicans</i>	19	100	94	100	98	68	78	84	77
	<i>C.glabrata</i>	12	100	75	-	87,5	83	66	66	72
	<i>C.parapsilosis</i>	5	100	100	100	100	40	60	80	60
	<i>C.kefyr</i>	5	100	60	100	87	80	40	80	67
	<i>C.krusei</i>	4	100	-	100	100	75	100	75	83
	<i>C.guilliermondii</i>	2	100	100	100	100	50	100	50	67
	<i>C.tropicalis</i>	2	100	50	100	84	100	0	50	50
	<i>C.lusitaniae</i>	1	100	0	100	67	100	0	0	33
	TOPLAM	50	100	82	100	95	77	68	64	72

***Amp B:** amfoterisin B, **Flu:** flukonazol, **Vor:** vorikonazol, "-" uygulanamadı

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastane kökenli enfeksiyon etkenlerinin arasında mantarların sıklığı giderek artmaktadır (127). *Candida* içeren sistemik kandidozun sıklığı gün geçtikçe önem kazanmaktadır (128). *Candida* türleri yatan hastalarda invaziv fungal enfeksiyonlarda en yaygın nedendir ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'n de nozokomial kandidoz 4. sıklıkta etkindir (5). Kandidemi, zor tanı konulan, sistemik tedavi gerektiren, hastanede kalış süresini uzatan ve sıklıkla ölümlü sonuçlanan enfeksiyonlardır (129). *C.albicans* bu tip enfeksiyonlara neden olan en sık *Candida* türü olsa da diğer *Candida* türleri yaygın olarak kandidemi olgularının %50'sinden fazlasının etkeni olarak görülmektedir (130). Bizim çalışmamızda 50 hastadan alınan kan kültürü örneğinde üreyen *Candida* türü konvansiyonel tanı yöntemleri sonucunda; 19(%38)'u *C.albicans*, 12(%24)'si *C.glabrata*, 5(%10)'i *C.parapsilosis*, 5(%10)'i *C.kefyr*, 4(%8)'ü *C.krusei*, iki(%4)'si *C.guilliermondi*, iki(%4)'si *C.tropicalis* ve bir (%2)'i *C.lusitaniae* olarak tanımlandı. Gültekin ve arkadaşları (131) kan kültürlerinden 46 *Candida* suşunu tanımladıklarında en fazla izole edilen türü *C.albicans* iken ikinci sırada *C.parapsilosis* olarak rapor etmişlerdir. Kocaeli üniversitesinde yapılan diğer bir çalışmada benzer veriler elde edilmiştir (132). Toplamda 216 kan kültüründe üreyen maya türünün izole edildiği çalışmada en fazla etken *C.albicans* (%18) iken ikinci sırada *C.glabrata* (%15,20) olarak rapor edilmiştir (133). Lockhard arkadaşlarıyla (134) 2008-2011 yılları arasında 2329 kan kültürü *Candida* izolasyonu yaptıkları süveyans çalışmasında sıralamayı *C.albicans* (%38), *C.glabrata* (%29), *C.parapsilosis* (%17) ve *C.tropicalis* (%10) olarak bildirmişlerdir. Bu yapılan çalışmalarda kan kültüründe *C.guilliermondi*, *C.krusei*, *C.famata* türlerine de rastlanmıştır (131-133).

Geleneksel morfolojik ve biyokimyasal yöntemler *Candida* organizmalarını tanımlarken süreç uzun sürmektedir. Bu yüzden hızlı, güvenilir ve doğru yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla yeni kültür sistemleri geliştirilmiştir (135). Bunlardan biri türlerin farklılığını koloni rengine göre veren kromojenik besiyerleridir. Bu çalışmada, kromojenik besiyerleri olarak Brilliance™ *Candida* Agar kullanılarak; yeşil koloni yapan 19(%38) suş *C.albicans*, sarı-kahverengi koloni yapan 17(%34) suş *C.glabrata* veya *C.parapsilosis*, kuru pembemsi koloniler yapan 4(%8) suş *C.krusei*, mavi koloniler oluşturan iki (%4) suş *C.tropicalis* ve pigment vermeyen krem rengi koloniler oluşturan 8 suş diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi. Yöntem 50 *Candida* suşundan 42(%84)'sini tanımlarken 8(%16) tanesini prosedüründe bulunmamasından dolayı tanımlayamamıştır. Tanımladığı 42 *Candida* suşunda %100 (42/42) doğruluk sağlamıştır.

Candida türlerinin tanımlandığı, *Candida* ID (Biomerieux), *Candida*CHROMagar (CHROMagarCompany) ve CDA'nın (*Candida*DiagnostikAgar) kıyaslandığı bir çalışmada; üç besiyerinde de *C.albicans* ve *C.dubliniensis* in ayırt edilemediği; *Candida* ID agarın *C.tropicalis* ve *C.kefyr*'i ayıramadığı fakat *C.lusitaniae* ve *C.guilliermondii*'yi ayırt edebildiği bildirilmiştir (135). Kromojenik besiyeri kullanılan bir diğer çalışmada; *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.dubliniensis* suşlarının diğer türlerden ayırt edilebildiği rapor edilmiştir (136). Kan kültürlerinden *Candida* türlerini kromojenik besiyeri kullanarak direkt izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmada *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, ve *C. albicans*'ın tanımlanması için kullanışlı, farklı ve seçici bir besiyeri olduğu bildirilmiştir (137).

Feyzioğlu ve arkadaşlarının (6) Corn meal agar, *Candida* ID2 kromojenik besiyeri ve API32 IDC yöntemleriyle maya tanımlanması yaptığı çalışmada kromojenik agarla 72 *Candida* suşunun tanımlanması yapılmış kromojenik besiyeri pratik ve güvenilir bir yöntem olarak rapor edilmiştir.

Erciyes Üniversitesi'nde yapılan Gültekin ve arkadaşlarının (138) 48 *Candida* suşunu kromojenik besiyeri kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda 22(%45) *C.albicans*, 7(%14.5) *C.glabrata*, 6(%12.5) *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*, 5(%10.4) *C.kefyr*, bir *C.rugosa* ve bir(%2) *C.krusei* olarak rapor etmişlerdir. Kromojenik besiyeri kullanılan farklı bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak *C.albicans*'ın %47.29 ve %58 oranlarında en sık rastlanan tür olduğu rapor edilmiştir (6,139).

Kromojenik besiyeri kullanılan diğer çalışmaların ortak kanısı olarak kromojenik besiyerinin karışık türlerin bulunduğu enfeksiyon veya kontaminasyon durumunda suşları ayırt etmede etkili olduğu, uygulamanın kolay hızlı ve doğruluğunun yüksek olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca tecrübe gerektirmemesi, herhangi bir gözünde değerlendirebilmesi büyük bir avantaj, bazı firmalara ait kromojenik besiyerlerinin yüksek maliyetli olması dezavantaj olduğu bildirilmiştir (6,135-138).

Son yıllarda çeşitli örneklerdeki mikroorganizmaların tanımlanmasında moleküler tekniklere dayalı yöntemlerin uygulanması geniş bir alan bulmuştur. Moleküler yöntemler bilimin bir çok alanında olduğu gibi enfeksiyon hastalıklarının erken tanısı, mikroorganizmaların tür ve alt tür düzeyinde ayrımlarının yapılması, antifungal direncin saptanması, virülans genlerin araştırılması, epidemilerin belirlenmesi ve izlenmesi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültür gibi klasik yöntemler 'altın standart' olarak önemini eskisi gibi korumakla birlikte bir çok enfeksiyon etkeninin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Çoklu dirençli mantarlarla oluşan enfeksiyonlarda, etken türün hızla belirlenip, antifungal duyarlılığın hızla belirlenip tedaviye erken başlanması hayati önem taşımakta ancak klasik yöntemlerle bu süreç uzun zaman almaktadır. Moleküler yöntemler bu süreci azaltmakta ayrıca üremesi güç ve geç olabilen fungal etkenlerin tanımlanmasında da önem taşımaktadır (139,140).

Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile kültür ve fenotipik özelliklerin belirlenmesine gerek kalmadan fungal enfeksiyonlarda etken mikroorganizmanın tanısı kısa sürede yapılabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan bu yöntem pratik ve kolay olması ve yaklaşık 90 dk gibi kısa bir sürede tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlaması yönünden avantajları olduğunu buna karşın pahalı olmasını dezavantaj olarak bildirmişlerdir (109).

Kan kültürlerinden *Candida* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması fungal kan dolaşımı enfeksiyonlarla ilgili mortalite ve morbiditeyi azaltmak etkin antifungal tedavi sağlamak için önemlidir (109).

Bu sebeple çalışmamızda *Candida* türlerinin tanımlanmasında PNA FISH yöntemi ve bu yöntem için Yeast Traffic Light PNA FISH (AdvanDx, Woburn, MA) kiti kullanılmıştır. Klinik örnekte yeşil floresan veren 20 suş *C.albicans*, diğer yeşil floresan veren suşlar *C.parapsilosis*, kırmızı floresan veren küçük mayalı 12 suş *C.glabrata*, büyük ve oval mayalı 4 suş *C.krusei*, sarı floresan veren bir suş *C.tropicalis* olarak belirlendi. Floresan vermeyen 8 suş diğer *Candida* türleri olarak kabul edildi. Kırk iki

suş üzerinden bakıldığı zaman %97.6 (41/42)'si doğru olarak tanımlandı. Kit değerlendirme prosedürüne göre tanımlama oranına bakıldığında 50 suştan 42(% 84)'si tanımlanabildi. PNA FISH yöntemi ile bir *C.tropicalis* suşu *C.albicans* olarak yanlış tanımlandı.

Stone ve arkadaşları (141) 54 klinik izolatla yaptığı çalışmada mayalarla süspansiyon hazırlayarak negatif kan kültürü şişelerine inoküle etmiş, inkübasyon sonucunda PNA FISH yöntemiyle tanımlamışlar, *C.albicans/C.parapsilosis* için %100, *C.glabrata/C.krusei* için %92,3 ve *C.tropicalis* için %100 duyarlı bulmuşlardır. Kan kültürü kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda PNA FISH hızlı ve kolay uygulanabilir ve tanımlama süresini önemli ölçüde azaltabilecek bir test olarak rapor edilmiştir (142,143). Lakner ve arkadaşları (144) 110 klinik izolat kullanarak fenotipik yöntemlerle PNA FISH yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada duyarlılığı %100 olarak bulmuşlardır.

PNA FISH yönteminin hem 17 periton hem de 103 kan kültüründe de değerlendirildiği bir çalışmada; kitin değerlendirme prosedüründe olmadığı suşları tanımlanamazken bir *C.albicans* suşunda tanımlanamadığı bildirilmiştir (145). Amerika'da 216 ve İngiltere'de 50 pozitif kan kültürü kullanılarak yapılan çalışmalarda yöntemin tanımlama doğruluğu bizim çalışmamızda da olduğu gibi %96 olarak bulunmuştur (133,146).

Çalışmaların çoğunda bizimde kullandığımız Yeast Traffic Light PNA FISH kiti kullanılmış ortak olan kit prosedürüne uygun olarak genellikle kan kültürüyle çalışılmış ve genel kanı olarak hızlı, güvenilir, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olarak rapor edilmiştir. Kitin maliyetinin yüksek olması ve ekipman gerektirmesi dezavantajı olarak bildirilmiştir (143-146).

Günümüzde kandidemilerde varolan antifungal ilaçlarla tedavi başarısızlığı, %20-30 arasındadır. Bu hastalarda kullanılan antifungal tedaviler, dirençli kökenlerin ortaya çıkmasına ve tür düzeyinde dağılımın non-*albicans Candida* ve diğer mayalar lehine gelişmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı kan kültürlerinden izole edilen türün tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir (147,148).

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin tür düzeyinde dağılımları belirlenerek ülkemizde mevcut sistemik bazı antifungallere *in vitro* duyarlılıkları referans mikrodilüsyon yöntemine göre; MIK50, MIK90 ve MIK

aralıkları sırasıyla; amfoterisin B için 0.125, 0.25, 0.3-0.50; flukonazol için 0.50, 16, 0.125-125; vorikonazol için 0.03, 0.25,0.03-0.50 olarak bulundu.

Duyarlılık belirlemesi için yapılan başka bir çalışmada; 8 *Candida* suşu doza bağlı duyarlı (MIK değeri 16-32 µg/ml), 5 *Candida* suşu ise dirençli (MIK değeri 64µg/ml); doza bağlı duyarlı suşların 3'ü *C.albicans*, 3'ü *C.tropicalis*, 2'si *C.krusei* olarak; 30 *C.albicans*, 15 *C.parapsilosis*, 26 *C.tropicalis*, 8 *C.glabrata*, 4 *C.krusei* suşunun kullanıldığı bu çalışmada flukonazol ve vorikonazol için MIK50, MIK90 ve MIK aralıkları sırasıyla; 0.5, 16, 0.25-64 ve 0.25, 0.5, 0.125-1 olarak bildirilmiştir (149).

Candida türlerinin dağılımı gibi *in vitro* antifungal duyarlılık profilleri de, ülkeler, bölgeler ve kurumlar arası çeşitlilik göstermektedir (150). Çalışmalarda genel olarak tüm *Candida* türlerinin amfoterisin B'ye *in vitro* duyarlılığı iyi olmakla birlikte, *C.glabrata* ve *C.krusei* türlerinde diğer *Candida* türlerine göre daha düşüktür. Özellikle *C.albicans* ile karşılaştırıldığında, amfoterisin B'nin bu türlere karşı etkinliğinin daha uzun sürdüğü rapor edilmiştir (151).

Adnan Menderes Üniversitesinde yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre, izolatların tümü amfoterisin B, vorikonazol, posakonazol ve kaspofungine duyarlı bulunmuş tek *C.krusei* suşu ise flukonazole doğal dirençli olduğu için MİK değeri dikkate alınmamıştır (131).

İsveç'te yapılan bir surveyans çalışmasında; *C.albicans* antifungal ajanlara %98 oranında duyarlı olduğunu bildirmişler (152).

Diğer bir çalışmada; *Candida* izolatları flukonazole %87,7 oranında duyarlı, %6,6 oranında doza bağlı duyarlı ve %5,5 oranında dirençli; dirençli izolatların 4'ü *C.krusei* ve biri de *C.albicans* olarak bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar tüm suşları bizim çalışmamızda da olduğu gibi vorikonazol ve amfoterisin B'ye duyarlı olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir (153).

Poula ve arkadaşları (154) flukonazole herhangi bir klinik izolatta direnç bulamamışken *C.albicans*'ların %3,4'ü *C.glabrata*'ların %60 ını doza bağlı duyarlı bir diğer çalışmada flukonazol duyarlılığı tür ayrımı yapılmadan %89,2 olarak rapor edilmiştir (155).

2008-2011 yılları arasında yapılan surveyans çalışmasında toplam 2329 *Candida* izolatu çalışılmış flukonazole direnç %11,9 oranında *C.glabrata* suşunda bulunmuş diğer türlerde bu direnç oranı oldukça düşük olarak rapor edilmiştir (134). Bizim çalışmamızda da 4 *C.krusei* suşu ise flukonazole doğal dirençli olduğu için MİK değeri dikkate alınmamıştır bunun dışındaki veriler benzerdi.

Duyarlılık çalışmalarında referans yöntem olarak kabul edilen CLSI M27-A3 ve CLSI M27-S4 uzun zamanda uygulanan, değerlendirmesi tecrübe isteyen ve iş gücü gerektiren bir yöntemdir. Bu yüzden hem kolay uygulanabilen, hem de değerlendirilmesi kolay olan testlerden biri de Etest' tir (155).

Bu çalışmamızda Etest yöntemi ile *Candida* türlerine karşı amfoterisin B ve vorikonazolün etkileri referans yöntemle karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görüldü, dirençli suş yoktu. Flukonazolde ise suşların %10'u dirençliyken referans mikrodilüsyon yönteminde bu oran daha düşüktü. Dört *C.krusei* suşu flukonazole doğal dirençli olduğu için MİK değeri dikkate alınmadı. Sadece Etest çalışılan kaspofunginde de dirençli suşumuz yoktu.

Özcan ve arkadaşlarının (132) Etest yöntemini referans mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırarak yaptığı çalışmada suşlardan iki(%4.3)'si Etest ile flukonazole dirençli mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmuştur. Vorikonazole karşı sadece bir(%2.1) *C.albicans* izolatu Etest ile dirençli mikrodilüsyon ile duyarlı bulunurken hiçbir suşda kaspofungin direnci görülmemiştir.

Etest ile değerlendirilen ve 212 *Candida* izolatu ile yapılan bir çalışmada; suşların referans yönteme göre duyarlılıkları karşılaştırıldığında Etest MİK90 ve MİK aralıklarını hesaplamışlar ve sırasıyla amfoterisin B için 1, 125-4; flukonazol için 32, 0.06-256 ve vorikonazol için 1, 0.008-32 olarak bulmuşlar ve referans yöntemle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (156).

Etest kullanılarak 65 *Candida* suşunun duyarlılıklarının belirlendiği bir çalışmada; Etest ve referans yöntemin uyum içinde olduğunu, Etestin amfoterisin B açısından dirençli MİK değerlerini belirlemede daha güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (154).

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen toplam *Candida* türlerinin antifungallere in vitro duyarlılıkları Etest yönteminin referans mikrodilüsyon yöntemle karşılaştırıldığında antifungaller açısından temel uyumu %72, kategorik uyumu %95 olduğu belirlendi. Temel ve kategorik uyum antifungallere göre sınıflandığında sırasıyla; amfoterisin B için %77-%100; flukonazol için %68-%82 ve vorikonazol için %64-%100 idi.

Çok merkezli bir araştırmada kaspofungin ve amfoterisin B için mikrodilüsyon ve Etest sonuçları karşılaştırıldığında temel uyum sırasıyla %76,5-%98,5, %90,3-%97,4 olarak; kategorik uyum sırasıyla %87,9-%91,4 olarak ve 4 büyük hata, %97,5-%99,5 ve 4 major hata bildirilmiş. Sonuçta Etestin referans yöntemle iyi uyum içinde olduğunu

bildirmişlerdir (157). Ancak biz kaspofungin etken maddesini temin edemediğimiz için çalışmamıza dahil edemedik.

Menezes ve ark (158) yaptığı Etest ve mikrodilüsyonun karşılaştırıldığı bir çalışmada; testler arasındaki temel uyumu >%90 olarak bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Etest ve mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması sonucunda flukonazol için %80,4, amfoterisin B için %84,7 ve vorikonazol için % 95,6 oranında kategorik uyum bulunmuştur (132). Bu veriler bizim çalışmamızla da uyumludur.

Alexander ve arkadaşlarının (156) *Candida* türleriyle yaptıkları bir çalışmada; Etest ile mikrodilüsyonu karşılaştırdıklarında temel uyumu %95 ve kategorik uyumu %90 olarak bildirmişlerdir. Antifungaller bazında baktığımız zaman amfoterisin B için %99 temel uyum bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da amfoterisin B için temel uyum %72 bulunmuş ve bu oran çalışmalara göre düşük oranda olduğu görülmektedir.

Çalışmamızdaki bütün antifungaller (amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin, vorikonazol) değerlendirildiğinde küçük ve büyük hatalar düşük oranda belirlendi. Çok büyük hata yokken, küçük hata toplamda %9,2, büyük hata toplamda %5,2'di.

Candida türleriyle yapılan araştırmaların sonuçlarına göre ise küçük hata çoğunlukta olmaktadır (156). Bu sonuçlar bizim çalışmamızla da uyumludur.

Sonuç olarak; hastanemizde kan kültürlerinden en sık izole edilen tür *C.albicans* olarak belirlenmesine rağmen *C.glabrata*, *C.parapsilosis*'de azımsanmayacak sıklıkta ve *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.guilliermondi*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* türleride izole edilen türler olarak belirlendi. Kan kültürlerinden *Candida* türlerini tanımlamada hem kromojenik besi yeri hem de PNA FISH yöntemleri kolay ve doğru olması ile güvenle kullanılabilceği belirlendi. Ayrıca PNAFISH yönteminin 90 dk gibi kısa bir sürede tanımlama yapabildiğinden dolayı rutin laboratuvarında kullanılmasının faydalı olabileceği görülmektedir.

Candida türlerine karşı antifungal duyarlılıkta flukonazole karşı doğal dirençli olan *C.krusei* ve doza bağlı duyarlı olan *C.glabrata*'daki direnç haricinde suşlar amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine duyarlı olarak belirlendi.

Candida türlerini antifungal duyarlılıklarında referans mikrodilüsyon yöntemi ile Etest yönteminin karşılaştırılmasında kategorik uyumun bütün antifungallerde yüksek olmasına rağmen temel uyumun daha düşük olduğu belirlendi. Bunun suş sayısının az

olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Bu sebeple daha fazla sayıda suş kullanılarak karşılaştırılmalı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Koç AN. Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri, *Candida* mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu, s 37-45, Haziran 2002, İstanbul.
2. Zunel FMV, Meis JFGM, Voss A. Nosocomial Fungal Infections: Candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 34: 213-220.
3. Cheng MF, Yu KW, Tong RB et al. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 33-37.
4. Beck-Soque C, Jorvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 1993; 167: 1247-51.
5. Ener S, Ener B, Akalın H. Uzun süren operasyonlardan sonra yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gelişen invaziv *Candida* enfeksiyonları. *Ege Tıp Dergisi* 2001; 40: 185-189.
6. Feyzioğlu B, Doğan M, Özdemir M, Baykan M, Baysal M. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Corn Meal Agar, *Candida* ID2 kromojenik besiyeri ve API 32 IDC performansının değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg* 2014; 30: 43-45.
7. Sordi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida M, Giannini M. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural

- antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013; 62: 10-24.
8. Panizo MM, Reviakina V, Dolande, Selgrad S. *Candida* spp. in vitro Susceptibility Profile to four Antifungal Agents: Resistance Surveillance Study in Venezuelan Strains. *Med Mycol* 2009; 47: 137-143.
 9. Pfaller MA, Messer SA, Kalsoon A, Bolmström A. Evaluation of the Etest Method for Determining Fluconazole Susceptibilities of 402 Clinical Yeast Isolates by Using Three Different Agar Media. *J Med Microbiol* 1998; 36: 2586-2589.
 10. Koç AN. Antifungal duyarlılık testleri ve klinik önemi. *ANKEM Derg* 2012; 26: 270-276.
 11. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German University hospital assessed by the reference broth microdilution method on Etest. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 767-771.
 12. Kremery V and Barnes AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002; 50: 243-60.
 13. Akan E. Mantarlar Tıbbi Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 1995: s 460-467
 14. Unat EK. Tıbbi Mikoloji. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları Rektörlük no: 948, Dekanlık No: 51, 2. Baskı. İstanbul, 1962: 147-162.
 15. Lachance MA, Boekhout H, Scorzetti G, Fell JW, Payne RW, Kutzman CP. *Candida* Berkhout (1923). In: The yeasts a taxonomic study. 5nd ed. Amsterdam, Elsevier, 2011: p 987.
 16. Van der Walt JP, Johannson E, Yarrow D. *Torulopsis geochares* and *Torulopsis azyma*, two new, haploid species of ascomycous affinity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1978; 44: 97-104.

17. Kurtzman CP and Fell CW (ed). *The Yeast a Toxonomic Study*, 4th ed. Elsevier, New York 1998: 13.
18. Murray PR, Boron EJ, Landry ML et al. *Manuel of Clinical Microbiology*. In: Hozen KC, Howell SA(eds), *Candida, Cryptococcus* and other yeast of medical importance. 9th ed. ASM Press, Washington 2007: 1762
19. Hazen KC, Howell SA. *Candida, Cryptococcus*, and other yeast of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8. Ed. Washington: ASM Pres, 2003: 1693-1712.
20. Dixon DM, Rhodes JC, Fromtling RA. Taxonomy, classification and morfology of the fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8. baskı Washington: ASM Press, 2003: 1653- 1659.
21. Tümbay E. *Candida* türleri. In: Ustaçelebi Ş, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1081-1086.
22. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller M. Mycology, In: *Medical Microbiology*. 5. Baskı Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005: 709-817.
23. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5. baskı Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2656-2674.
24. Yücel A. *Candida*'ların dünü. In: *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabı*. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2002: 3-28.
25. Rodriguez-Todela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Antimicrob Agents and Chemother* 1994; 38: 45-48.
26. Brawner DL, Anderson GL, and Yuen KY. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 149-153.

27. Asakura K, SI Iwaguchi, M Homma, T Sukai, K Higashide, and K Tanaka. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. J Gen Microbiol 1991; 137: 2531-2538.
28. Auger P, Dumas C, and Joly J. A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosine. J Clin Microbiol 1979; 139: 590-594.
29. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 6 th ed USA, ASM Press 1995; 723-37.
30. Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M. Tıp ve Dis hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi 2004: 1110-1117.
31. Uzun Ö. Dissemine kandidiyazis. In: Akova M. Akan H, editörler. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda invaziv Fungal infeksiyonlar, 1. baskı Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006: 67-84.
32. Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends microbiol 2001; 9: 591-596.
33. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol 2011; 19 : 241-7.
34. Ener B. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskisehir 2002: 65-70.
35. Yegenoglu Y. *Candida* infeksiyonlanmn epidemiyolojisi. *Candida* Mikrobiyolojisi ve infeksiyonlan Simpozyumu , Eskisehir 2002: 55-63.
36. Meunier F, Gaya H, Calandra T, Glauser M, Klastersky J, Sylvester R, Zinner S. Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. Am J Med 1989; 86: 668-72.
37. Hawser S.P., Baillie G.S., Douglas J. (1998) Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol, 47: 253-256.
38. Tugrul M. Mantar hastalıklarının patogenezi. 3.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı, 2003; 87-91.
39. Pabuçoglu HU. Mikozyotlar-Patogenez ve Patoloji, İzmir Güven Nobel Kitabevi 1999; 63-75.

40. Romani L. Immunology of invasive Candidiasis. In:Calderone RA ed. *Candida and Candidiasis*. 1th ed. Washington DC:American Society for Microbiology press 2002; 223-241.
41. Erbakan N. Derinin Mantar Hastalıkları. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1989.
42. Pabuççuoğlu U. Kandidiazis. Mikozlar, Patogenez ve Patoloji. İzmir Güven ve Nobel Tıp Kitapevi, 2000; 63.
43. Kirkpatrick CH. Hos factors in defence against fungal infections. Am J Med 1984; 30: 1-12.
44. Trier JS, Bjorkmann DJ. Esophageal, gastric, and intestinal candidiasis. Am J Med 1984; 30: 39-43.
45. Edwards JE. *Candida* Species. in: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). Principles and Practice of Infectious Disease (4rd edition). Vol 2. Newyork, Churchill Livingstone, 1995; 2289-2306.
46. Kaufman R.H. Establishing a correct diagnosis of vulvovaginal infection. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 986-988.
47. Çerikcioglu N. Kandida Enfeksiyonlarının Patogenezi. 7. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 1994 Ankara, 103-110.
48. Kustimur S. Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bült 1994; 28: 175-181.
49. Akan Ö. İnvaziv fungal enfeksiyonların değişen epidemiyolojisi. In: Akova M, Akan H, editörler. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda İnvaziv Fungal İnfeksiyonlar, 1.baskı Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006: 19-30.
50. Yeğenoğlu Y. *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. In: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, editörler. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabı. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2002; 43: 3-55.
51. Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 1-7.

52. Beck–Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the edidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993; 167: 1247-51.
53. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: Predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis 2001; 33: 1692-1696.
54. Rangel-Frausto S, Wiblin T, Blumberg HM, et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS) Study Group: Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida species* in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 1999; 29: 253-258.
55. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999; 29: 239-44.
56. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida species* and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol 2004; 42: 1519-1527.
57. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Espinosa C, et al. Nosocomial candidemia at a general hospital: The change of epidemiological and clinical characteristics. A comparativemstudy of 2 cohorts (1993–1998 versus 2002–2005). Rev Iberoam Micol 2009; 26: 184-188.
58. Resende JC, de Resende MA, Saliba JL. Prevalence of *Candida spp.* In hospitalized patients and their risk factors. Mycosis 2002; 45: 306-312.
59. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, et al. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2004; 38: 161-189.
60. Aygün G, Öztürk R. Yoğun bakım ünitelerinde mantar infeksiyonları. In: Akova M, Akan H, editörler. İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda İnvaziv Fungal İnfeksiyonlar, 1. baskı Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2006: 99-124

61. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325: 1274-1277.
62. Hawkins JL, Baddour LM. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 8-14.
63. Pfaller MA, Diekema DJ: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-163.
64. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personel. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2299-2300.
65. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species *CID* 1997; 24: 1122-1128.
66. Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1086-1088.
67. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hana HA et al. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1676-1781.
68. Ener B. Mantar infeksiyonlarında klinikten laboratuvara tanı sorunları. *Ankem derg* 1998; 12: 248-252.
69. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. *Cerrahpasa J Med* 1999; 30: 236-246.
70. Kaufman RH. Establishing a correct diagnosis of vulvovaginal infection. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 986-988.
71. Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *C. albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3344.

81. Koneman EW, Ailen SD, Janda WM. Mycology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (5 th edition). Philadelphia, Lippincott Co, 1997; 983-1069.
82. Hazen KC, Howell Susan A. Fungi-*Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In:Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, American Society for Microbiology Pres 2003; 1693-1711.
83. Larone DH. Yeast and yeast like organisms. Medically Important Fungi A Guide Identification, Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press 2002; 109-143.
84. Hilmioglu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı. In: *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabı. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2002; 125- 131.
85. Helvacı S, Gedikoğlu S, Mıstık R. *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. İnfekt Derg 1992; 6: 141-143.
86. Nakamoto S. Germ tube formation of *Candida albicans* in cornmeal broth using the non-slip slide glass incubation method. Yonago Acta Medica 1998; 41: 65-72.
87. Kremery V and Barnes AJ. Non-*albicans Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect, 2002; 50: 243-60.
88. Yıldırım ST. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Editörler: Mutlu G, İzmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Güneş Kitabevi 1999; 1129-1144.
89. Ellepola NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43: 65-84.
90. Warren NG, Shadomy HJ. *Candida*, *cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, ASM Press 1995: 723-737.

91. Buckley HR. Identifications of yeasts. In: Evans EGV and Richardson MD (eds). *Medical Mycology: A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press 1989: 97-109.
92. Yıldırım ST. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Ustaçelebi S, eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi 1999: 1129-1144.
93. Baumgartner C, Freydiere A, and Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 454-456.
94. Pfaller MA, Houston A, Coffman S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61.
95. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Euro J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 464-467.
96. Bernal S, Mazuelos EM, Garcia M, Aller AL, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 1996; 24: 201-204.
97. Kuştimur S. *Candida* patogeneğinde rol oynayan faktörler. *Mikrobiyol Bül* 1994: 175-181.
98. Maesaki S. Serodiagnosis for deep-seated mycoses. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43: 233-237.
99. Ohki M, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. A new endotoxin sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab. *FEBS Lett* 1980; 120: 217-220.
100. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Tanaka K, Hara K. (1,3) Beta d Glukan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin Lab Anal* 1995; 9: 334-339.
101. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1-3)beta d- glukan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis and cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 3115-3118.

102. Shibata N, Kobayashi H, Suziki S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2012; 88: 250-65.
103. (2014). http://www.guncelpediatri.com/makale_378/Invaziv-Mantar-Infeksiyonlarinin-Tanisi (Erişim Tarihi 10.08.2015)
104. Yıldırım ŞT. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Ustaçelebi Ş, eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Öncü Basımevi, Güneş Kitabevi, 1999: 1129-1144.
105. Saraçlı MA. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısında moleküler ve genetik tanı yöntemleri, s 133-145, *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, s 133-145, 2002, Eskişehir.
106. Börekçi G, Ersöz G, Otağ F ve ark. Identification of *Candida* species from blood culture with fluorescent in situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and conventional culture methods. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2010; 27: 183-191.
107. Yücesoy M. *Candida* türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı, s 46-58, 3-6 Mayıs 2005, Konya.
108. Kebudi R. Yeni antifungaller. Ankem Dergisi. 2007; 21: 210-215.
109. Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: time for a new 'gold standard'. Clin Infect Dis 2003; 37: 415-25.
110. Kayaalp SO. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Kayaalp SO (ed). Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık; 2002. 301-9.
111. 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.
112. Töre O. Antifungal ilaçlar. Kılıçtırgay K (editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Bursa: Güneş Kitabevi 1994: 380-91.
113. Yücesoy M. Antifungallere direnç. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, 113-120, 13-15 Nisan 2006, İstanbul.
114. Yıldırım ŞT. Yeni geliştirilen azoller. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı, s 141-148, 19-21 Haziran, Ankara.

115. Arıkan S. Yeni antifungaller. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, s 105-112, 13-15 Nisan 2006, İstanbul.
116. Metin DY. Ekinokandinler ve yeni azoller. İnfeksiyon Dergisi. 2007; 21: 185-187.
117. Lewis RE, Fothergill AW. Antifungal Agents. In: Diagnosis and Treatment of Human Mycoses. Totowa, New Jersey, Humana Press, 2008: p 105-133.
118. Aslan T. Yeni antifungaller. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, s 41-42, 14-18 Mart 2007, Antalya.
119. Çerikçioğlu N. Kandida İnfeksiyonlarının İmmunolojisi. İnfeksiyon Dergisi 2007; 21: 55-61
120. Arıkan S. *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık testlerinin önemi, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, s 161- 167, 21-22 Haziran 2002, Eskişehir.
121. Çerikçioğlu N. Antifungal duyarlılık testleri, 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı, s 93-104, 13-15 Nisan 2006, İstanbul.
122. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.Fourth informational supplement CLSI M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2012.
123. Poyraz Ö. Fırsatçı enfeksiyon oluşturan mantarlar. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji, No. 101, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas, 2006: 129-152.
124. Yücesoy M. Antifungallere duyarlılık ve direnç, duyarlılık testlerinin gerekliliği ve yorumu. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 46, 2003: 301-312.
125. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2008.
126. Ranque S, Lachaud L, Gari-toussaint M et al. Interlaboratory reproducibility of estest Amphotericin b and caspofungin yeast susceptibility testing and comparison with the CLSI method. J Clin Microbiol 2012; 50: 2305-2309.

127. Altuncu E, Bilgen H, Cerikçioğlu N ve ark. Neonatal *Candida* Enfeksiyonları ve etkenlerinin antifungal duyarlılıkları. Mikrobiyoloji Bül 2010; 44: 593-603.
128. Das I , Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. Int J Infect Dis 2011; 15: 759-763.
129. Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Eskurra PA, Quindos G. Antifungal agents: made of action in yeast cells. Rev Esp Quimioler 2006; 19: 130-139.
130. Tortorona AM, Peman J, Bernhardt H et al. Epidemiology of candidaemia in Europa: results of 28 month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 317-322.
131. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın M. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Suşlarında Antifungal Duyarlılığın ve Bazı Virülans Faktörlerin Araştırılması ve RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bül 2011; 45: 306-317.
132. Keçeli Özcan S, Mutlu B, Dünder D, Willke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida spp.* suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile Etest yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bül 2010; 44: 263-271.
133. Hall L, Le Febre KM, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH Probes for Identification of *Candida Species* from Positive Blood Cultures. J Clin Microbiol 2012; 50: 1446-1448.
134. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland A et al. Species İdentification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream İsolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities From 2008 to 2011. J Clin Microbiol 2012; 50: 3435-3442.
135. Cooke VM, Miles RJ, Price RG et al. New chromogenic agar medium fort the identification of *Candida spp.* Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3622-3627.
136. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida species* other than *C.albicans*, *C.krusei* and *C.tropicalis* with the chromogenic medium chromagar *Candida*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 3: 1-5.

137. Horvath L, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida spp.* from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. J of Clin Microbiol 2003; 41: 2629-2632.
138. Gültekin A. Sistemik Kandidoz Şüpheli Hasta Örneklerinden *Candida* Türlerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Genotiplendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2009: 83
139. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyon yönteminin bakteriyolojide kullanımı. In: Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi: İstanbul, 2001:75-82.
140. Karahan C. Tanısal Mikrobiyolojide flüoresan in situ hibridizasyon uygulamaları. In: Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Palme Yayıncılık: Ankara, 2006:3-18.
141. Stone NRH, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-FISH Yeast Traffic Light for Rapid Identification of Yeast Directly from Positive Blood Cultures and Assessment of Clinical Impact. J of Clin Microbiol 2013; 51: 1301-2.
142. Da Silva RM, Neto JR, Santos CS et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015; 14: 6.
143. Gherna M, Merz W. Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. J of Clin Microbiol 2009; 47: 247-8.
144. Lakner A, Essig A, Frickmann H, Popperts S. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the identification of *Candida albicans* in comparison with three phenotypic methods. Mycoses 2012; 55: 114- 123.
145. Harris DM and Hata DJ. Rapid identification of bacteria and *Candida* using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 12: 2.
146. Gorton RL, Ramnarain P, Barker K et al. Comparative analysis of Gram's stain, PNA-FISH and Sepsityper with MALDI-TOF MS for the identification of yeast direct from positive blood cultures. Mycoses 2014; 57: 592-601.

147. Schmitt-Hoffman A, Nyman L, Roos B et al. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of the new antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusion and oral administration of its prodrug, BAL8557, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 286-93.
148. Morris MI, Villman M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, Part 2. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63: 1813-2.
149. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş E, Uyanık MH. Çeşitli *Candida* Türlerinin İki Farklı Triazole Duyarlılıklarının Mikrodilüsyon Yöntemi ile Araştırılması. *The Eurasian Journal of Medicine* 2007; 39: 173-177.
150. Moreira R, Neto J, Santos C et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14: 6.
151. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
152. Orasch C, Marchetti O, Garbino J et al. *Candida species* distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 698-705.
153. Yiğit N, Aktaş E. Activities of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against *Candida* bloodstream isolates determined by broth microdilution and disk diffusion methods. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2014; 71: 131-40.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ