

**KASPOFUNGİNİN *Candida glabrata*'NİN KLİNİK İZOLATLARINA KARŞI
VORIKONAZOL, FLUKONAZOL, ITRAKONAZOL VE AMFOTERİSİN B İLE
KOMBİNASYONLARININ TIME-KİLL METODU, E-TEST METODU (iki
farklı yöntemle) ve DİSK DİFÜZYON YÖNTEMLERİYLE *IN VITRO*
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İLKNUR DAĞ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

Şubat 2007

**THE EVALUATION OF *IN VITRO* EFFECTS BY USING THE METHOD OF
TIME-KILL, E-TEST (two different methods) AND DISK DIFFUSION IN DUAL
COMBINATION OF CASPOFUNGIN WITH ITRACONAZOLE,
VORICONAZOLE, FLUCONAZOLE OR AMPHOTERICIN B AGAINST
CLINICAL ISOLATES OF *Candida glabrata***

İlknur DAĞ

Ph. D. THESIS

Department of Biology

February 2007

**KASPOFUNGİNİN *Candida glabrata*'NİN KLİNİK İZOLATLARINA
KARŞI VORIKONAZOL, FLUKONAZOL, ITRAKONAZOL VE
AMFOTERİSİN B İLE KOMBİNASYONLARININ TIME-KILL METODU, E-
TEST METODU (iki farklı yöntemle) ve DİSK DİFÜZYON YÖNTEMLERİYLE
IN VITRO ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İlknur Dağ

T. C.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışmanlar:

Prof. Dr. Nuri KİRAZ

Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Şubat 2007

İlknur DAĞ'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı “Kaspofungin’in, *Candida glabrata*’nın klinik izolatlarına karşı vorikonazol, flukonazol, itrakonazol ve amfoterisin B ile kombinasyonlarının time-kill metodu, E-test (iki farklı yöntemle) ve disk difüzyon yöntemleriyle *in vitro* etkilerinin değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Prof. Dr. Nuri KİRAZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
. tarih vesayılı kararıyla
onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Son yıllarda patojen maya ve küflerin yol açtığı fungal infeksiyonlar, bağışıklığı baskılanmış bireylerde yüksek derecede morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır. Bu infeksiyonlar yayılcı ve yüzeysel infeksiyonları kapsar. En sık etkenler *Candida* ve *Aspergillus* türleridir. Kullanılan ilaçların dar spektrumlu oluşu, toksisitesi, tolere edilebilme güçlüğü ve dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle tedavi genellikle zordur. Özellikle tek ilaç tedavisine cevap vermeyen hastalarda ya da dirençli suşların varlığında kombinasyon tedavisi düşünülebilir.

Mantarların insan hücresinden farklı olarak hücre duvar yapısı bulunmaktadır. Son yıllarda gündeme gelen ekinokandin grubu antifungaller hücre duvar sentezi üzerine etkilidirler. Bu grupta yer alan kaspofungin, klinik kullanıma yeni giren bir antifungaldir. Polien ve triazol grubu antifungal ilaçlar ise etki mekanizmaları farklı olmakla beraber ergosterol yapı üzerinden etkilidirler. Ekinokandin sınıfındaki antifungallerin duyarlılık testleri için standart bir metod hala geliştirilememiştir ve antifungal kombinasyonları ile ilgili *in vitro* test yöntemlerine yönelik ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *C. glabrata* suşlarının *in vitro* duyarlılığını saptamada kullanılan broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri arasındaki uyum kaspofungin için %90, amfoterisin B için %86, flukonazol için %92, vorikonazol için %84 ve itrakonazol için %58 olarak bulunmuştur. Ayrıca flukonazol ve itrakonazole dirençli izolatların tümünün kaspofungine duyarlı olduğu görülmüştür. Araştırmamızda kaspofungin'in (CAS); vorikonazol (VORI), flukonazol (FLU), itrakonazol (ITRA) ve amfoterisin B (AmB) ile ikili kombinasyonlarının *C. glabrata* izolatlarına karşı *in vitro* aktiviteleri de değerlendirilmiştir. İlaç etkileşimleri E-test (iki farklı yöntemle), disk difüzyon ve time-kill metodları kullanılarak çalışılmıştır. Çalışılan kombinasyonlar içinde CAS+AmB ve CAS+VORI'nin umut verici olduğu görülmüştür. Kullanılan yöntemler içinde E-testin kullanımı kolaydır ve antifungal kombinasyon testleri için kabul edilebilir olduğu düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçların antifungal tedavide faydalı olacağını düşünmekteyiz.

SUMMARY

In recent years, fungal infections by reason of pathogenic yeast and molds lead to higher mortality and morbidity in immunosuppressed patients. These infections are both superficial and invasive. Mostly seen-ones are species of *Candida* and *Aspergillus*. The treatment of them are generally difficult on account of occurrence of resistance agents, difficulty of being tolerability, toxicity, being broad spectrum of drugs used. Combination therapy can be specifically advised in the existence of resistant agents or patients whom one-drug treatment is negative.

Currently a class of antifungals known as Echinocandin is effective on the cell wall synthesis. One of these antifungal is Caspofungin, which has been started to use in clinics recently. Antifungal drugs named polien and triazoles are efficient on ergosterol structure though these drugs have different effects. A method has not been developed for the susceptibility test of the antifungals from class of echinocandin and detailed studies are needed for *in vitro* test methods related to antifungal combination.

In this study, broth microdilution and E-test methods are used to determine *in vitro* susceptibility of *Candida glabrata* strains. Agreement between two methods is 90% for caspofungin (CAS), 92% for fluconazole (FLU), 86% for amphotericin B (AmB), 84% for voriconazole (VORI), 58% itraconazole (ITRA). However, all fluconazole and itraconazole-resistant isolates were inhibited by caspofungin.

In this research, dual combinations of caspofungin with vorikonazol, itrakonazol, flukonazol and amphotericin B were evaluated against *C. glabrata* isolates. Time-kill, E-test and disk diffusion method were used to evaluate drug interactions of combinations CAS+AmB, CAS+VORI, CAS+ITRA, CAS+FLU, CAS+AmB and CAS+VORI are seen efficient within combination studied. The method of E-test is the easiest among methods and it is acceptable for the antifungal combination test. We think that results obtained will be beneficial in the antifungal therapy.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen, çalışma boyunca öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle yol gösteren çok değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Nuri Kiraz ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yönlendirilmesinde ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Tez İzleme Komite Hocalarım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu'ya, ve Sayın Doç. Dr. Zafer Çetinkaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yapıldığı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü'nde bulunan başta Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN'e ve tüm hocalarıma, çalışmalar sırasında farklı zamanlarda yardımlarını esirgemedi yanımda olan ve destek veren Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ, ve Sayın Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, tüm mikrobiyoloji personelinde bulunan arkadaşlarıma da en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenen 200511014 No'lu proje kapsamında yapılmıştır. Desteklerinden dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim yaşantımda büyük pay sahibi olan ve her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme ve çalışmalarım süresince beni destekleyen değerli eşime de en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	.xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ.....	.xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. <i>Candida</i> 'ların Genel Özellikleri.....	3
2. 2. Tıbbi bakımdan önemli bazı <i>Candida</i> 'ların özellikleri.....	4
2. 3. <i>Candida</i> Hücresinin İnce Yapısı.....	7
2. 4. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi.....	8
2. 5. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Patogenezi.....	9
2. 6. <i>Candida</i> İnfeksiyonları.....	12
2. 6. 1. Mukoza infeksiyonları.....	12
2. 6. 2. Cilt infeksiyonları.....	13
2. 6. 3. Sistemik <i>Candida</i> İnfeksiyonları.....	14
2. 7. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında Tanı.....	16
2. 8. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Tedavisi.....	18
2. 9. Antifungal Duyarlılık Testleri.....	24

İÇİNDEKİLER (devam)

2. 9. 1. Broth Mikro ve Makrodilüsyon.....	24
2. 9. 2. E-Test.....	25
2. 9. 3. Kombinasyon testleri.....	25
2. 9. 4. <i>In vitro</i> antimikrobiyal ilişkilerin saptanması (Antifungal Sinerji).....	26
2. 9. 5. Checkerboard (chessboard, dama tahtası).....	28
2. 9. 6. Time-Kill Curve (Zaman-öldürme eğrisi).....	29
2. 9. 7. Difüzyon yöntemi.....	30
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	32
3. 1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, besiyerleri, ve antifungal maddelerin hazırlanması.....	32
3. 1. 1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	32
3. 1. 2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	32
3. 1. 3. Kullanılan Antifungal Maddeler.....	33
3. 2. İzolatların Antifungal duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	33
3. 2. 1. Antifungal ajanların hazırlanması.....	33
3. 2. 2. Maya süspansiyonlarının hazırlanması.....	36
3. 2. 3. İnokülasyon, İnkübasyon ve değerlendirme.....	34
3. 2. 4. E-test.....	37
3. 3. Antifungal Kombinasyon Çalışmaları.....	37
3. 3. 1. E-Test Metodu-1.....	37

İÇİNDEKİLER (devam)

3. 3. 2. E-Test Metodu-2.....	38
3. 3. 3. Time-Kill Testi.....	39
3. 3. 4. Disk Difüzyon Testi.....	40
4. BULGULAR.....	41
4. 1. <i>C. glabrata</i> izolatlarının beş antifungal ajana karşı <i>in vitro</i> etkilerinin belirlenmesi.....	41
4. 2. <i>C. glabrata</i> izolatlarının CAS+VORI, CAS+FLU, CAS+ITRA ve CAS+AmB kombinasyonlarındaki etkilerinin <i>in vitro</i> olarak belirlenmesi.....	44
4. 2. 1. E-test 1 yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları.....	44
4. 2. 2. E-test- 2 yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları.....	49
4. 2. 3. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları...	54
4. 2. 4. Time-kill yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları.....	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	66
5. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2.1. <i>C.glabrata</i> 'nın mikroskopik morfolojisi.....	6
2.8.2. CAS,VORI, FLU, AmB ve ITRA'ün yapısal formülleri.....	23
3.3.1.1. Antifungal kombinasyonda E-test 1 metodu.....	36
3.3.2.1. E-test 2 sinerji metodunda stripleri yerleştirme diyagramı.....	37
4.2.1.1. E-test 1 metoduna göre kaspo funginin dört farklı antifungalle <i>in vitro</i> aktivitesinin değerlendirilmesi.....	47
4.2.1.2. E-test 2 metoduna göre kaspo funginin diğer antifungallerle kullanımı a)CAS+ITRA b)CAS+VORI c)CAS+AmB d)CAS+FLU.....	51
4.2.3.1. a. <i>C. glabrata</i> -30 izolatının a) CAS, AmB ve ITRA antifungallerine karşı <i>in vitro</i> etkilerinin disk difüzyon testi ile gösterilmesi.....	52
4.2.3.1. b. <i>C. glabrata</i> -30 izolatının b) <i>C. glabrata</i> -27 izolatının CAS ile kombinasyonları.....	53
4.2.3.2. <i>C.glabrata</i> -49 no'lu izolatın disk difüzyon yöntemi ile CAS+AmB'ye karşı <i>in vitro</i> aktivitesi.....	57
4.2.4.1. Klinik <i>C. glabrata</i> izolatlarının Time-Kill kombinasyon testi sonuçlarına göre karşılaştırılması.....	58
4.2.4.2. <i>C.glabrata</i> -11 no'lu izolatın CAS+AmB kombinasyonu sonuçları.....	59
4.2.4.3. <i>C.glabrata</i> -11 izolatının CAS+AmB kombinasyonu ile etkilerinin Time kill metodu ile etkisi.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.8.1. Sistemik kullanım için mevcut antifungal ajanlar.....	19
2.9.1. Mayalar için kullanılan antifungal duyarlılık testleri.....	24
3.2.1.1. Antifungal ajanlar için hazırlanan mikrodilüsyon test konsantrasyonları.	34
3.2.1.1. Brot mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde suda çözünebilir antifungal ilaçlar için hazırlanan dilüsyonlar	48
3.2.1.3. Brot mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde suda çözünemeyen antifungal ilaçlar için hazırlanan dilüsyonlar (NCCLS/CLSI, M27/A2)..	48
4.1.1. <i>C. glabrata</i> 'nın klinik izolatlarına karşı AmB'nin E-test ve Broth mikrodilüsyon testleri sonucunda gösterdikleri MİK değerleri(µg/ml)...	41
4.1.2. E-test ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile 50 <i>C. glabrata</i> izolatına karşı amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin, itrakonazol ve vorikonazolün antifungal aktiviteleri (µg/ml).....	43
4.2.1.1. CAS+AmB kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları.....	44
4.2.1.2. CAS+VORI kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları.....	45
4.2.1.3. CAS+FLU kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları.....	45
4.2.1.4. CAS+ITRA kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçlar.....	46
4.2.2.1. CAS+AmB kombinasyonunun E-test 2 yöntemine göre sonuçları.....	48
4.2.2.2. CAS+VORI kombinasyonunun E-test 2 yöntemine göre sonuçları.....	49
4.2.2.3. CAS+FLU kombinasyonunun E-test 2 yöntemine göre sonuçları.....	49
4.2.2.4. CAS+ITRA kombinasyonunun E-test 2 yöntemine göre sonuçları.....	50
4.2.3.1. <i>C.glabrata</i> 'nın 50 izolatına karşı CAS, FLU, ITRA, VORI ve AmB'nin <i>in vitro</i> aktivitelerinin tek başlarına ve kombine kullanımda disk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu zon çapları (mm).....	53
4.2.3.2. Antifungallerin disk difüzyon metoduna göre oluşturdukları zon çapları ve MİK değerleri.....	55
4.2.3.3. CAS'in, <i>C. glabrata</i> 'nın 50 izolatına karşı VORI, ITRA, AmB ve FLU ile kombinasyonundaki <i>in vitro</i> aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırılması.....	56

- 4.2.4.2. Klinik *C.glabrata* izolatlarının Time-Kill kombinasyon testi sonuçları... 59
- 4.2.4.3 Kaspofunginin *C. glabrata* izolatlarına karşı FLU, ITRA, AmB ve VORI ile kombinasyonlarının time-kill, disk difüzyon ve E test sonuçları..... 62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
NCCLS/CLSI	National Committee for Clinical Laboratory Standards / Clinical and Laboratory Standards Institute
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyon
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
CAS	Kaspofungin
ITRA	İtrakonazol
AmB	Amfoterisin B
FLU	Flukonazol
VORI	Vorikonazol
BMD	Brot Mikrodilüsyon Test
ET	E-test
S	Sinerji
A	Antagonizma
I	Etkisiz (Indifference)

1. GİRİŞ

Mantarlar saç, deri ve tırnakta hastalık oluşturarak ilk çağlardan beri hekimlerin dikkatini çekmiştir. *Candida*'ların tarihçesi MÖ 4. yy'da Hipokrat'a kadar dayanmakla birlikte, bundan yıllar sonra, 1839'da Langenbeck tarafından bir hastanın ağzındaki pamukçuk lezyonundan yapılan kazıntı örneğinde mantarın gözlemlenmesi ile keşfedilmiştir. Pamukçuğun etkeni olarak mantarın tarifi ise 1842'de Gruby tarafından yapılmış ve bu tıp mikolojisinin başlangıcı olmuştur. Robin 1843'de pamukçuk etkeni mantarın sistemik enfeksiyona neden olduğunu gözlemiş ve bu mantarı ilk kez *Oidium albicans* olarak adlandırmış, basitçe üretmeyi de başarmıştır. 1890'da Zopf tarafından önerilen *Monilia albicans* ismi ile birlikte yıllar içinde, aynı mantar için 100'ü aşkın isim kullanılmıştır. 1923 yılında Berkhout tarafından önerilen *Candida albicans* 1954'te kabul edilmiştir. 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile birlikte *Candida* enfeksiyonlarının sıklığında da belirgin bir artış görülmüştür (Edwards, 2000; Segal and Elad, 1998).

Candida türleri insanların normal kommensalleri olarak ciltte, solunum ve sindirim sisteminde, kadın genital sisteminde yaygın olarak bulunurlar. Normal flora üyesi iken *Candida*'lar, immün sistemin herhangi bir nedenle baskılandığı durumlarda dokulara invaze olarak hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Çok sayıda *Candida* türü bulunmasına rağmen, enfeksiyon etkeni olarak insandan en sık izole edilenler; *Candida albicans* (en sık), *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae* ve *Candida dubliniensis*'tir (Hazen and Howell, 2003).

C. albicans dışındaki *Candida* türlerinin son on yıldaki artan insidansının, geniş spektrumlu antibiyotik, steroid ve antikarsinojen ilaçların yaygın kullanımı, immünsüpresif hasta gruplarının artması (özellikle AIDS'li hasta insidansındaki artış), organ transplantasyonları, protez cihazlarının implantasyonu, kateterizasyon ve fazla flukonazol kullanımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Canuto and Rodero, 2002).

Mantar enfeksiyonu sıklığının artışı ile birlikte patojen mantar türlerinin spektrumu ve direnç paternleri de değişmektedir. Sınırlı sayıdaki antifungal ilaçların yoğun kullanımı nedeniyle antifungal ilaçlara direnç gelişmesi ve fungal enfeksiyonların önemli bir sağlık

sorunu haline gelmesi, daha geniş spektrumlu ve farklı hedefleri etkileyen yeni ilaçlara ve tedavi rejimlerine ihtiyaç doğurmuştur. Bu gözlemler sonucunda, hem dirençli suşların saptanması hem de yeni antifungallerin klinik kullanım öncesi değerlendirilmesinde antifungal duyarlılık testlerinin önemi artmıştır.

Ciddi mantar infeksiyonlarının tedavisinde antifungal ilaçların kombine kullanılması bazı durumlarda umut veren bir yaklaşım olabilir. Antifungal kombinasyonların kullanımı maya hücrelerinin ölüm hızını arttırabilir. Böylece tedavi süresi kısalır, ilaca direnç gelişimi önlenir ve etki spektrumu genişler. Ayrıca kombine edilen ilaçların dozları azaltılacağından, muhtemel yan etkiler de azalacaktır. Ancak bu yaklaşımla maliyet çok yükselecek, antagonistik ilaç etkileşimi ve toksisite ortaya çıkabileceğinden, herhangi bir kombinasyonunun etkinliğini, klinik kullanımı öncesinde, *in vitro* ortamda dikkatlice değerlendirmek önemlidir.

Biz çalışmamızda ekinokandin sınıfından yeni bir antifungal olan kaspofungin'in vorikonazol ve flukonazol ile kombinasyonlarının azole duyarlı yada doza bağımlı duyarlı ya da dirençli *C. glabrata* suşları üzerine *in vitro* etkisini 4 farklı metotla değerlendirmeyi amaçladık. Bu değerlendirmeyi yaparken de *in vitro* metotlardan Time-kill (zaman-ölüm eğrisi), E-test (iki farklı yöntemle) ve disk difüzyon metodundan elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

2. 1. *Candida*'ların Genel Özellikleri

Mantarlar ökaryot, klorofilsiz ve absorbsiyonla beslenen canlılardır. Çoğu doğada saprofit olarak bulunur. Fırsatçı mantar infeksiyonlarının en sık karşılaşılan nedenleri olan *Candida* türleri, *Deuteromycota (Fungi Imperfecti)* içinde, *Cryptococcaceae* ailesinde yer alan maya şeklindeki mantarlardır. Bu cins 200'den fazla tür içermektedir (Forbes, et al., 2002; Hazen and Howell, 2003).

Candida türleri tek hücreli, hücre duvarlarında kitin veya sellüloz içeren, ökaryotik mikroorganizmalardır (Segal and Elad, 1998). Tomurcuklanarak (blastospor) veya ikiye bölünerek çoğalırlar. Blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan uzayarak 5-10 µm boyutlarında yalancı hif (pseudohypha), bazen de gerçek hif oluşturabilirler (Murray, et. al., 2002). Kandidalar içinde en sık karşılaşılan tür olan *Candida albicans*, mısır unlu jeloz gibi besince fakir bir ortamda iyi yedek besin depolayan, gerçek ya da yalancı bir hifin ucunda veya yanında bulunan, tek hücreli, kalın duvarlı, geniş oval yapılı klamidospore oluşturur. Diğer sık görülen *Candida* türlerinde klamidospore oluşumu nadirdir. *C. albicans*'ın hücreleri serumda 37 °C'de bekletildiğinde, iki saatte çimlenme borusu (germ tüp) oluştururlar. *C. dubliniensis*'de germ tüp ve klamidospore oluşturabilir. (Kwan Chung and Bennet, 1992).

Gram boyama ile tüm *Candida* türleri gram olumlu boyanır. Maya elemanlarının örnekler içinde aranmasında Potassium Hydroxide-Calcofluor White Fluorescent boyaması kullanılır (Hazen and Howell, 2003; Tümbay, 1999).

Mayaların 37 °C'de üreyebilmeleri önemli özelliklerindendir. Özellikle patojen olan türler 25-37 °C'de, saprofitler ise daha düşük sıcaklıkta üreyebilirler (Warren and Hazen, 1999). Mayaların üreyebilmesi için besiyeri ortamında glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biotin ve serbest metallerin (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması, ortam pH'sının 2-8 arasında olması yeterlidir. *Candida* türleri kemoheterotrofturlar, organik bir azot ve karbon kaynağına gereksinimleri vardır. Besinlerini absorbsiyon yolu ile bulundukları ortamdan kolayca sağlayabilmeleri için ortamın nispi nem oranının % 95-100 arasında olması gereklidir (Warren and Hazen, 1999).

Candida türlerinin çoğu yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Sabouraud-dekstroz agar (SDA) gibi mikolojik besiyerlerinde 37 °C’de 2-3 günde beyaz ya da krem renkli, yumuşak kıvamlı, genellikle S koloni morfolojisinde ve tipik maya kokulu koloniler oluştururlar (Kwan Chung and Bennet, 1992; Merz and Roberts, 2003; Topçu ve Çerikcioğlu, 2002). Bu organizmalar invaziv olmayan yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokuları tutan infeksiyonlara kadar geniş bir hastalık spektrumuna sahiptir. Her türlü çevrede bulunabilen *Candida* türleri, insan ve hayvanların normal florasında da yer almaktadır. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, intravasküler alet kullanımındaki ve immünsüpresif hastaların popülasyonundaki artışlar sebebiyle, hem hastane dışındaki hem de nozokomiyal *Candida* infeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır (Warren and Hazen, 1999).

2.2. Tıbbi Bakımdan Önemli Bazı *Candida*’ların Özellikleri

***Candida albicans*:** En sık kandidoz nedeni olan *Candida* türüdür. Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik infeksiyon yapabilir. Maya-hif dönüşümü göstermesi ve bazı hidrolitik enzimleri üretmesi nedeniyle virulansı en yüksek türdür. *Candida albicans*, antijenik yapılarına göre A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılmıştır. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarla *C. stellatoidea*, *C. langeronii* (klamidospor negatif) ve *C. clausenii* (germ tüp negatif) gibi türlerin *Candida albicans*’ın sinonimleri olduğu gösterilmiştir (Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999).

SDA’da krem renginde, yumuşak kıvamlı, S tipi düzgün koloniler oluşturur. Kanlı agar ve EMB (eosin methylene blue) agar plaklarında yıldız şeklinde ayaksız çıkıntılar oluşturabilir. Tween 80 mısırunlu agarda yalancı hif, bazen de gerçek hif, etraflarında kümeler yapan blastosporlar ve bu hifler üzerinde klamidosporlar gözlenir. Serumda germ tüp oluşturması ve mısır unlu Tween 80 agarda klamidospor oluşumu *Candida albicans*’ın karakteristik özelliğidir (Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999, Pujol, et al., 1997).

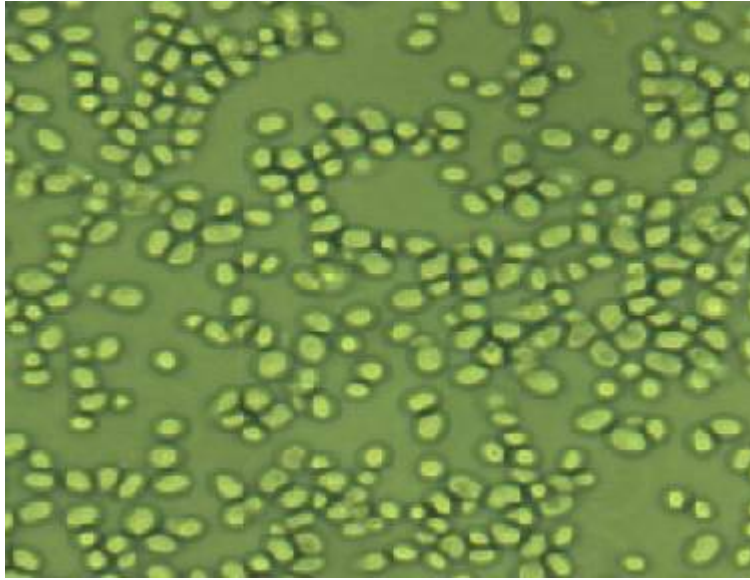
***C. glabrata*:** Son yıllara dek *C. glabrata*, insan mukozal dokularında nispeten patojenik olmayan yaygın bir fungal organizma olarak kabul edilmiştir. Ancak, *C. glabrata*’nın yol açtığı mukozal ve sistemik infeksiyonların giderek önemli bir artış gösterdiği görülmektedir. Diğer *Candida* türlerinin yol açtığı infeksiyonlarda çok etkili olan azol tedavisine, *C. glabrata* doğal bir direnç göstermektedir. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, azollerin fungal plazma zarının sterol kompozisyonunu değiştirdiği ve hücreye

antifungal ajanın alımının azaldığı düşünülmektedir (Fidel, et al., 1999). Önceleri *Torulopsis glabrata* olarak bilinen *C. glabrata* dimorfik olmayan blastokonidiyal morfolojisi ve haploid genoma sahip olması ile diğer *Candida* türleri ile farklılık gösterir. *C. glabrata* son yıllarda sıklıkla nozokomiyal kaynaklı sistemik ya da yüzeysel kandidal enfeksiyonlara yol açan organizma olarak ikinci sırada yer almaktadır (Forbes et al., 2002; Gumbo, et al., 1999).

C. albicans dışı *Candida*'lar arasında en sık kandidemi nedenidir. Tüm vücut bölgelerinde enfeksiyona neden olabilmekle birlikte, özellikle idrar yolu enfeksiyonları, yenidoğan fungemileri ve immüdüşkün konak enfeksiyonlarının önemli patojenlerindendir. Ayrıca diğer *Candida* türlerine göre flukonazol ve amfoterisin B duyarlılığı -doğal olarak- daha azdır ve ciddi komplikasyonlarla daha çok ilişkilidir (Pfaller, et al., 2003).

SDA besiyerinde krem renginde, yumuşak krem gibi veya tereyağ kıvamında düzgün S tipi koloniler oluşturur, gerçek ya da yalancı hif oluşturmaz. Küçük, oval, tek tomurcuklu mayalardır (Şekil 2. 2. 1.) Chromagar besiyerinde ise kolonileri pembe-mor arasında görülür. 37 °C üzerinde pseudohif üretmeyen tek *Candida* türüdür. Blastokonidyalı 1-4µm olup, *C. albicans* blastokonidyalılarından belirgin biçimde daha küçüktür (4-6 µm) (Fidel, et al., 1999).

C. glabrata'nın virulans faktörleri ve konakçı savunma mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Hif üretmemesi virulansının *C. albicans*'a göre daha düşük olmasına katkıda bulunabilir. Adherens, proteinaz üretimi ve fenotipik değişimi hakkında ise veriler çok azdır (Fidel, et al., 1999).



Şekil 2. 2. 1. *C. glabrata*'nın mikroskopik morfolojisi

***Candida dubliniensis*:** *Candida albicans* ile fenotipik olarak yakından ilişkilidir. Sağlam ve HIV enfeksiyonlu kişilerden izole edilmesi nedeniyle *C. dubliniensis*'in normal ağız florasının üyesi olduğu ve özellikle bağışıklık sistemi bozukluğu olanlarda ağız lezyonlarına yol açtığı düşünülmektedir. Koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü *C. albicans* ile aynıdır ancak, *C. dubliniensis* 45 °C'de üreyemez ve klamidosporeleri çok daha bol, ikili, üçlü hatta kümeler veya salkımlar halindedir. Ayrıca *C. dubliniensis*'in ksiloz kullanımı ve β glukozidaz aktivitesi yoktur. Ayrımalarında moleküler çalışmaların yararlı olacağı bildirilmektedir (Larone, 1995; Sutton, et al., 1998).

***Candida guilliermondii*:** Tüm vücut bölgelerinde enfeksiyona neden olabilir. SDA'da düzgün yüzeyli, S tipi, nemli görünümde, krem- sarı renkli, yaşlandıkça pembeleşen koloniler oluşturur. Mısırunlu Tween 80 agarda yalancı hiflerin çevresinde küçük blastospor kümeleri oluşturur, yalancı hifler kısa ve az sayıdadır (Larone, 1995; Sutton, et al., 1998).

***Candida kefyr (pseudotropicalis)*:** Krem renginde, yumuşak kıvamlı, S tipi koloniler oluşturur. Mısırunlu Tween 80 agarda yalancı hifler ve bunun etrafında uzun, genellikle hiften ayrılıp birbirine paralel dizilim gösteren blastokonidyumlar gözlenir. Bu görünüm

ırmakta yüzen kütüklere benzetilebilir. Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyona neden olabilir (Tümbay, 1999).

***Candida krusei*:** Azol grubu antifungallere doğal olarak direçli olması nedeniyle flukonazol profilaksisi alan immüdüşkün hastalarda önemli etkindir. Sabouraud dextrose agarda yassı, kuru görünümlü, mat, krem renginde düzensiz kenarlı koloniler oluşturur. Mısırunlu Tween 80 agarda uzamış, dallanan yalancı hifler, bu hiflerin septalarında ağaca benzer dizilim gösteren blastokonidiumlar oluşturur (Forbes, et al., 2002; Tümbay, 1999).

***Candida lusitaniae*:** İnsanlarda nadiren patojen olmakla birlikte, genellikle ciddi ve fatal seyirli bir enfeksiyona neden olur. *C. lusitaniae*'nin amfoterisin B'ye direçli olma ihtimali yüksektir. S tipi, yumuşak kıvamlı, parlak koloniler oluşturur. Az sayıda yalancı hif, bazen de gerçek hif ve kısa zincirler oluşturan uzun blastokonidiumlar gözlenebilir (Fromtling, et al., 2003).

***Candida parapsilosis*:** Kateter ilişkili enfeksiyonlarda ve kandidemilerde önemli etkenlerden biridir. Yumuşak kıvamlı, krem renginde, bazen dantela şeklinde koloniler oluşturur. Mısırunu Tween 80 agarda yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler halinde blastokonidiyumlar bulunur. En önemli mikroskopik özelliği arada iri hiflerin (dev hücreler) bulunmasıdır (Tümbay, 1999; Fromtling, et al., 2003).

***Candida tropicalis*:** Özellikle hematolojik malignansili hastalarda önemli etkenlerdendir. Genellikle düzgün yüzeyli, bazen mat, pürüzlü, yumuşak kıvamlı koloniler oluşturur. Mikroskopik olarak yalancı ve gerçek hifler ve hif boyunca dağınık, tek tek, bazen de küçük kümeler oluşturmuş blastokonidiyumlar bulunur. *Candida tropicalis* bazen yalancı hif uçlarında klamidospore benzer, ancak ince duvarlı ve daha iri hücreler oluşturabilir (Tümbay, 1999; Fromtling, et al., 2003; Sutton, et al., 1998).

2.3. *Candida* Hücresinin İnce Yapısı

Hücre sitoplazması: Ökaryotik hücreler olduklarından membranla çevrili bir çekirdek içerirler. Çekirdek içinde bir çekirdekçik ile lineer kromozomlar bulunur. Sitoplazma mitokondri (anaerobik mantarlarda bulunmaz), Golgi aygıtı, vakuoller, birkaç çeşit vezikül ve 80-S ribozomlar gibi organelleri içerir. Ayrıca sitoplazmada hücre iskeleti komponentleri de bulunur. Bunlar, membran hareketinde rol oynayan mikrotübüller, sitoplazmik akışkanlıktan sorumlu aktin ve aktinle birlikte organellerin hareketini sağlayan miyozindir. Hücre iskeleti,

hücre membranı ve hücre duvarı ile bağlantılı, turgor basıncına karşı koyan dinamik bir sistemdir (Lehmann, 1998).

Hücre membranı: Membran, bulundurduğu ozmoenzimler sayesinde moleküllerin transferini sağlar. Duvar sentezinde rolü olan kitin sentetaz ve sinyal iletiminde rolü olan enzimler membranda bulunur. *Candida* hücre membranı ayrıca, fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin, fosfatidil inositol gibi fosfolipitler de bulundurur. Hücre membranı büyük miktarda sterol içerir, membran lipidlerinin %22'sini steroller oluşturur. Sterollerin % 95'i ergosterol formundadır ve birçok antifungal ajan ergosterolün farklı sentez basamaklarında etkilidir (Lehmann, 1998).

Hücre duvarı ve antijenik yapı: Hücre duvarı, hücreye şeklini veren, osmotik basınca karşı hücreyi koruyan ve moleküllerin transferinde rolü olan sert bir yapıdır. *Candida* hücre duvarı, antijenik belirteçleri bulundurur ve konak hücrelere tutunmayı sağlar. *Candida* hücre duvarının en temel bileşenlerini karbonhidratlar (% 80-90); mannan ya da mannoproteinler, β -glukanlar ve kitinden oluşmaktadır. β -glukanlar ve kitin duvarın yapısal bileşenleridir ve β -glukanlar duvar ağırlığının % 47-60'ını oluşturur. Kitin daha az miktarda (% 0. 6-9) fakat önemli bir yapısal bileşendir. Mannoproteinler ise yapısal polimerler içindeki hücre duvarının şekilsiz kısmının esas elemanıdır ve hücre duvar karbonhidratlarının %40'ını oluşturur. *Candida* hücre duvarındaki ana antijenik yapı olan mannanın yapısal farklılığına göre A ve B olarak iki serotipe ayrılır. Hücre duvarının diğer bileşenleri proteinler (% 5-15) ve lipidlerdir (% 2-5) (Lehmann, 1998; Goodway, 1995).

2. 4. *Candida* İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Candida'lar doğada oldukça geniş bir yayılım gösterirler. Memeli ve kuşların sindirim sisteminde, ya da insanların mukokutanöz membranlarında normal flora üyesi olarak yer aldıkları gibi toprak ya da bitkiler üzerinde de canlılıklarını sürdürebilirler. İnsan infeksiyonları çoğunlukla endojen floradan kaynaklanır. Nadiren insandan insana bulaş da söz konusu olabilir (vajinal kandidozlu anneden bebeğine doğum sırasında bulaşma ya da yatan hastalar arasında nozokomiyal geçiş). Sağlıklı insanda, sindirim sistemi boşluğu, üst solunum sistemi, alt genitoüriner sistem ve cilt florasında *Candida*'lar yaygın olarak bulunurlar. Hastanede yatan hastalarda kolonizasyonun, sağlıklı kişilere göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Kandidozlar için en sık giriş yolu gastrointestinal sistemdir (Edwards, 2000; Forbes, et al., 2002).

2. 5. *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezi

Konağın rolü

Candida'lar konakta kommensal olarak bulunan, kolonizasyon veya infeksiyon gibi konak hasarına neden olan fırsatçı maya mantarıdır. *C. albicans* insanların deri/mukoza yüzeylerinde normal kommensal yapının bir üyesi olarak, *albicans* dışı *Candida*' lar ise geçici olarak bulunabilirler. İnsanların çoğunda yaşamları boyunca kandidoza karşı doğal bir direnç vardır. *Candida*'ya karşı ortaya konulan direnç konağın doğal savunma yapıları ve kazanılmış özgül immünitenin birlikteliği ile sağlanır (Fidel, et al., 1999).

Candida'ların virülans faktörleri

Candida'lar sahip olduğu bazı özellikler ile konağın savunma sistemini yenerek hastalık oluşturmaya çalışır. Virülans faktörleri denilen bu özellikler, konak hücre membranının bütünlüğünü ve işlevini bozarak, hücre ölümü ile konak dokuya invazyonu sağlar. Bu faktörler başlıca, adherens, dimorfizm, toksin ve enzim üretimi, fenotip değişimi ve hücre yüzey bileşimi olarak ele alınabilir (Fidel, et al., 1999; Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000).

Adherens (yapışma)

Yapışma, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir ve mukokutanöz kandidozun bu yapışma ile başladığı kabul edilmektedir. *Candida*'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun da ilk aşamasıdır. *Candida*'ların hücre yüzeyi, konak ve mantar arasındaki temasın ilk noktasıdır ve antijenlerin kaynağı olması nedeniyle immünolojik konak yanıtının düzenlenmesi ve adezyonda kritik rol oynar. Dış hücre duvarı tabakası mannoproteinler, β -1,3 ve β -1,6 bağlı glukan ve kitin içermekte ve bu tabaka *Candida*'ların konak yüzeyine yapışması ve ardından kolonizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Munro, et al., 2004).

Diğer yandan *C. albicans* kökenlerinin genelde belirli agar besiyerlerinde 25 °C'de boyut, biçim ve rengi kolayca ayırt edilebilen, beyaz ve opak olarak tanımlanan iki fenotip arasında geri dönüşüm gösterebildikleri bilinmektedir. Biçimce daha yuvarlak olan beyaz hücrelerin ağız epitel hücrelerine uzun veya fasulye biçimli ve daha hidrofobik olan opak hücrelerden daha iyi bağlanabildikleri de bildirilmiştir (Munro, et al., 2004).

Dimorfizm

C. albicans kültürde tomurcuklanan oval maya hücreleri (blastokonidiler) ve uzun mayamsı hücrelerden oluşan psödohifler veya nadir de olsa gerçek bölmeli hifler halinde gelişebilen dimorfik bir mayadır. *Candida* türleri içerisinde miselyum üreterek çoğalabildiği bilinen tek tür *C. albicans*'dır. *C. albicans*'ın morfogenezini düzenleyen pek çok faktör vardır. En önemlisi, *in vitro* olarak da gösterilen mukoza çevresel faktörleri 37-40 °C ısı, asit pH, ortamda serum olmaması) mantarın maya formunda kalmasını sağlarken, kan dolaşımına benzer ortam (37 °C ısı, nötral pH, ve ortamda serum varlığı) hife dönüşümü indüklemektedir. Bunun dışında morfogenezi etkileyen genetik faktörler de vardır (Felk, et al.,2002; Oh, et al., 2001).

Hifin maya hücresine göre dokuya daha kolay penetre olması, fagositik hücrelerce sindiriminin daha zor olması ve infekte lezyonlarda *C. albicans*'ın genellikle hifli şeklinin gözlemlenmesi nedeniyle patojen morfotipin hif formu olduğu düşünülmüştür. Yine de infeksiyon geliştirebilme bakımından her iki şeklin farklı olduğu gösterilememiş ve bu mantarın patojenliği açısından her iki şeklin de önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Felk, et al., 2002; Oh, et al, 2001).

Toksinler

C. albicans'ın maya fazında endotoksin yapısında maddeler ve hemolizin üretimi gösterilmiştir. *C. albicans* toksinleri yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı olarak iki grupta incelenir (Fidel, et al., 1999).

Yüksek molekül ağırlıklı toksinleri, glikoprotein toksinler ve kandidotoksindir. *C. albicans* glikoproteinlerinden özellikle mannoproteinler, toksik görevleri yanında adezyonda da rol oynarlar. Mantar hücre duvarında bulunurlar ve toksik etki için hem protein hem de şekerleri gereklidir. Ancak etkin rolü mannan üstlenir. Kandidotoksin ise virulan bir *C. albicans* suşundan elde edilmiş yüksek molekül ağırlıklı toksindir (Fidel, et al., 1999).

Düşük molekül ağırlıklı toksinleri, şok oluşturan ve/veya ölümcül etkinlikle yakından ilişkili altı farklı toksin saptanmış ve bunlardan sadece E substansı denilenin özellikleri belirlenmiştir.

Toksinlerin patogenezdaki rolünü araştıran çalışmalar glikoproteinlerin ve kandidoksinin virulans faktörü olarak rolünü doğrulamıştır. Sistemik kandidiyazlı hastalardan elde edilen verilerin gram negatif sepsisi ile benzer olması da toksinlerin *Candida* infeksiyonlarında önemli rol oynadığını kanıtlamıştır (Fidel, et al., 1999).

Enzimler

Mantarlar konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine (invazyona) yardımcı olan enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Zarlar lipid ve proteinlerden yapılmış olduklarından bu biyokimyasal maddeler enzimlerin hedefini oluştururlar. Patojen mantarlar tarafından üretilen böyle enzimler hemen hemen yalnızca *C. albicans*'la ilgili olarak bildirilmiştir. Bu mantarın salgıladığı ve patogenezele ilgisi olduğu düşünülen enzimler iki ana grupta toplanmaktadır; (i) peptid bağlarını hidrolizleyen proteinazlar, (ii) fosfogliseridleri hidrolizleyen fosfolipazlar ile lizofosfogliseridleri hidrolizleyen lizofosfolipazlar. *Candida albicans*, hücre dışı üç önemli hidrolitik enzim üretir; salgısal aspartil proteinazlar (Sap), fosfolipaz B ve lipazlar. Bu enzimler konak hücre zarlarındaki protein ve lipitleri hedeflerler (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000).

C. albicans ve başka bazı *Candida*'lar tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde ürediklerinde proteinaz salgırlar. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C. albicans* kökenlerinin *in vivo* proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda ölüm ve/veya kolonileşmeye sebep oldukları gösterilmiştir.

Fosfolipazlar, gliserofosfolipitlerin bir veya daha fazla ester bağımlı hidrolize ederler. Bu enzimler etkiledikleri bağlara göre A, B, C ve D olarak sınıflandırılmışlardır. *Candida* türlerindeki en aktif tip fosfolipaz B'dir ve hem hidrolaz hem de transaçılaz aktivitelerine sahiptir. *Candida* türlerinde, kommensal olanlara göre patojen olanlarda daha fazla fosfolipaz üretimi saptanmıştır.

Çeşitli hidrolitik enzimlerin yanısıra, birçok patojen *Candida* türünün hemolizin de ürettiği saptanmıştır. Hem alfa hem de beta hemoliz, hem hifal hem de blastokonidiya formunda gözlenmiş, ancak virulansa katkısı tam olarak anlaşılamamıştır (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000). Konak hücrelerine invazyon ve konak fagositlerinden kaçış sırasında salgısal hidrolazlar ve salgısal aspartik proteinazlar *C. albicans*'ın hifal hücrelerinin invazyonu için gerekli olabilir (Felk, et al., 2002).

Fenotip değişimi

C. albicans'ın farklı çevrelere maya-hif dönüşümü, nokta mutasyon ve sıklıkla fenotip değişimi gibi birkaç mekanizma ile uyum sağladığı gösterilmekle birlikte, çevresel değişikliklere hızlı adaptasyon kapasitesini *C. albicans*'a bu değişimin sağladığı düşünülmektedir (Yang, 2003; Vargas, et al., 2004).

C. albicans, yüksek sıklıkla düzgün, pürtüklü, yıldız, çizgili, şapka, düzensiz, tüysü kolonileri içeren yedi farklı koloni fenotipi arasında veya opak ve beyaz renk arasında değişebilir. Opak koloni hücrelerinin cildi kolonize etme yeteneği daha fazla iken, beyaz koloni hücrelerine göre virulansı daha azdır. Fenotip değişiminin mekanizması ve virulansa katkısı tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, antifungal ilaçlara direnç, konak savunma mekanizmalarından kaçış, farklı yüzeylere yapışma ve değişen çevreye uyumu sağlayan bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir (Kiraz et. al., 2000; etinkaya ve Kiraz, 2005).

2. 6. *Candida* İnfeksiyonları

Kandidozis ya da kandidiyazis, *Candida* cinsi mikroorganizmalar tarafından oluşturulan infeksiyonlar için kullanılan bir tanımlamadır. *Candida* infeksiyonları başlıca üç grupta incelenebilir; mukoza infeksiyonları, cilt infeksiyonları ve derin organları içeren sistemik *Candida* infeksiyonları.

2. 6. 1. Mukoza infeksiyonları

Pamukçuk: Oral *Candida* infeksiyonları oldukça yaygındır. Pamukçuk, dil ve diğer ağız içi yzeyleerde krem gibi beyaz yamalarla karakterize, oral kandidiyazın spesifik bir formudur, ağırlıdır ve kaldırıldığında kanayabilir. Bu yamalar aslında, dökülen epitel hücreleri, lökositler, bakteriler, keratin, nekrotik doku ve yiyecek artıklarından oluşan yalancı membranlardır. En çok süt emen bebeklerde, kanserli hastalarda, AIDS'li hastalarda, inhale steroid kullananlarda görülür (Hazen and Howell, 2003).

***Candida* zofajiti:** Genellikle hematopoetik veya lenfatik sistem kanserlerinin tedavisi sırasında ve AIDS'li hastalarda görülür. Yüzeyel infeksiyondan derin invaziv infeksiyona kadar değişen formlarla karşılaşılabilir ve genel olarak yüzeyel infeksiyon AIDS hastalarında, derin infeksiyon ise nötropenik hastalarda görülür. Hastalarda yutma güçlüğü, ağırlı yutma ve retrosternal göğüs ağırsı gibi diğer infeksiyoz ve infeksiyoz olmayan zofajitlerden

ayırddilemeyen semptomlar görülür. Oral infeksiyondan direkt yayılımla ya da genellikle pamukçuk olmaksızın ortaya çıkar. Endoskopide pamukçuk benzeri beyaz yamalar görülür (Hazen and Howell, 2003).

Sindirim kanalı kandidiyazı: Kanserli hastalarda yaygın olarak görülen bir klinik durumdur. En sık görülen lezyonları, tabanında *Candida*'ları bulunduran tek veya multipl ülserasyonlardır. Daha az oranda kronik mide ülseri, perforasyon ve malign mide ülseri ile birlikte *Candida* infeksiyonu görülür. İnce ve kalın barsakları da tutabilir. Endoskopik incelemede, duodenumda diğer lezyonlardaki gibi, beyaz plaklar görülebilir ve duodenum ve jejunumda mukozal katlantılarda kalınlaşma saptanabilir (Hazen and Howell, 2003).

***Candida* vajiniti:** Hem normal hem de hücrel immün yetmezlikli kadınları etkileyen yaygın bir fungal infeksiyondur (Goodway, 1995). Tüm kadınların yaklaşık %75'i hayatlarında bir kez *Candida* vajiniti epizodu geçirirler ve bunların da %85-90'ında *C. albicans* etkindir. İkinci sıklıkta *C. glabrata* görülmekte olup, antifungal sağaltıma gösterdiği direnç nedeniyle dikkatli olunmalıdır. Bu yaygın infeksiyon en sık kontrolsüz diyabet, antibiyotik tedavisi, gebelik, hormon replasman tedavisi, immünsüpressif tedavi durumlarında görülür. Semptomatik vajinal kandidiyazda kaşıntı, yanma hissi, kesilmiş süt benzeri akıntı gibi yakınmalar ve vajinal ve vulvar eritem ve ödem gibi bulgular vardır (Vargas, et al., 2004).

2. 6. 2. Cilt infeksiyonları

Cilt kandidiyazı immüdüşkün konaklarda olduğu gibi normal insanlarda da görülebilir. Normal konaklarda infeksiyonun oluşumu için risk faktörleri nemli veya kapalı alanlar, yanık, radyasyon uygulanan alanlardır. Yaygın olarak koltuk altı, inguinal bölge, perine, meme altı deri ve parmak aralarındaki alanlarda görülür (Maenza and Merz, 1998).

Yaygın cilt kandidiyazı, tüm vücutta yaygın erupsiyonla karakterize, nadir görülen bir cilt infeksiyonudur .

İntertrigo, inguinal bölge, meme altı gibi ılık, nemli ve kapalı bölgelerde veziküller ve püstüllerle başlayan ve genişleyip rüptüre olarak maserasyon ve fistül gelişen, cilt kandidiyazının bir varyantıdır (Edwards, 2000).

Diaper döküntüsü, bebeklerde perianal bölgeden başlayıp bezle temas eden tüm perineye yayılan, muhtemelen gastrointestinal orijinli olduğu düşünülen bebek bezi dermatitidir (Hazen and Howell, 2003).

Onikomikoz ve paronişi, en sık nedenlerinden biri *Candida*'dır. Onikomikoz, tırnakta renk değişikliği ve şekil bozukluğu ile ortaya çıkar, birlikte paronişi olabilir. *Candida* onikomikozu genel olarak üç şekilde görülür; i) Paronişi olarak başlayan infeksiyon, *Candida* onikomikozisinin en yaygın tipidir, ii) Kronik mukokütanöz kandidiyazlı hastalar ikinci tip için risk taşırlar. Onikomikoz vakalarının %1'inden azında görülen *Candida* granülomaya benzer, iii) *Candida* onikolizis, son dönem tırnak hastalığını tanımlar (Elewski, 1998). Paronişi tırnak yatağının ağrılı ve eritemli iltihabi hastalığıdır ve hem paronişi hem de onikomikoz elleri uzun süre suda kalan kişilerde görülür (Maenza and Merz, 1998).

Kronik mukokutanöz kandidiyaz, sıklıkla yaşamın ilk üç yılında görülmektedir. T hücre anormallliği olan hastalarda görülen, cilt, mukozalar, saç ve tırnakların *Candida* infeksiyonlarının heterojen bir grubunu tanımlar. Hastaların çoğu infant ya da çocukluk çağı grubudur. T lenfosit fonksiyon bozukluğuna ilaveten, bazen B lenfosit, granülosit veya kompleman bozukluğu da görülebilir. Bazı örneklerde multipl endokrin anomaliler, tekrarlayan viral ve bakteriyel pulmoner veya sinüs infeksiyonları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Maenza and Merz, 1998).

2. 6. 3. Sistemik *candida* infeksiyonları

Dissemine Kandidiyaz ve Kandidemi: Toplum kaynaklı bir infeksiyon olarak kandidemi çok yaygın olmamakla birlikte, sıklıkla nozokomiyal bir komplikasyon olarak ortaya çıkar (Goodway, 1995). 1995-1996 yıllarında ABD'de yapılan bir çalışmada nozokomiyal infeksiyonlarda kandan izole edilen mikroorganizmalar arasında *Candida* türleri dördüncü sırada bulunmuş ve giderek oranının arttığı saptanmıştır. Son yıllarda antifungal direnç ve ölüm oranlarındaki artışla birlikte *C. albicans* dışı türlerin görülme sıklığı da artmıştır. (Elewski, 1998). Kandidemi gelişimi açısından risk taşıyan hasta grubu, yanık hastaları, cerrahi hastaları, onkoloji hastaları ve transplant hastalarıdır. Bu hastalarda risk faktörleri ise, santral venöz kateter, parenteral beslenme, geniş spektrumlu antibakteriyel kullanımı ve yoğun kemoterapi ve immünosüpresif rejimlerdir.

Dissemine kandidiyazda en sık tutulan organlar böbrek, beyin, miyokard ve gözdür. Diğer organlar daha az sıklıkla tutulur. Dissemine kandidiyazda kan kültürü pozitiflik oranı çok düşük (yaklaşık %40) ve bulguları da nonspesifik olduğundan antemortem tanı oranı çok düşüktür (%15-40) (Goodway, 1995).

Santral Sinir Sistemi Kandidiyazı: *Candida* ile oluşan santral sinir sistemi infeksiyonu nadirdir ve genellikle dissemine kandidiyazın bir komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Diğer risk faktörleri, cerrahi, lomber ponksiyon, ventriküloperitoneal şant ve nadiren bakteriyel menenjitin komplikasyonu olarak görülebilir. En sık görülen şekli menenjit olmakla birlikte mikotik anevrizma ve beyin apseleri de görülebilir. Semptom ve bulgular, klasik menenjite göre daha silik ve kronik seyreder. Tedavi edilmezse mortalitesi yüksektir (Edwards, 2000).

Solunum Sistemi Kandidiyazı: *Candida* nedenli pnömoni iki şekilde olur; i) endobronşiyal yerleşim sonucu gelişen lokal veya diffüz bronkopnömoni, oldukça nadir bir olaydır, ii) hematojen kaynaklı, yaygın, ince nodüllü infiltratlar, erken dönemde konjestif kalp yetmezliğinden ayırt etmek güçtür. Diğer formları daha nadirdir. Ayrıca, bronşiyal infeksiyon, larenjit, epiglottite de neden olabilir (Edwards, 2000).

Kardiyak Kandidiyaz: *Candida*'lar perikard, miyokard ve endokardda infeksiyon yapabilirler ve fungal endokarditlerin en sık nedenidirler. Endokardit için altta yatan risk faktörlerinin artması ile, hastalığın görülme sıklığı da artmıştır. Bu risk faktörleri; kalp cerrahisi, protez kalp kapakları, santral venöz kateterler intravenöz ilaç kullanımı, bakteriyel endokardit ve kalp kapağı yapısal bozukluğudur (Edwards, 2000).

Üriner Sistem İnfeksiyonları: *Candida* türleri alt üriner sistemde kolonize olabilir ve alt ya da üst üriner sistemde infeksiyona neden olabilir. Üretral kandidiyaz hem kadınlarda hem de erkeklerde görülebilir. Semptomlar bakteriyel infeksiyonlarla aynıdır. Üst üriner sistem infeksiyonları ya primer olarak alt üriner sistemden asendan yolla ya da sekonder olarak hematojen yayılımla gerçekleşir. *Candida* üriner infeksiyonları en sık üriner kateterli hastalarda görülür. Ayrıca diyabet, geniş spektrumlu antibiyotik ya da immünosüpressif ajanların kullanımı da infeksiyon için risk oluşturabilir (Edwards, 2000).

Oküler İnfeksiyonlar: *C. albicans* endojen oftalmitlerin en sık nedenlerindendir. Bundan başka eksojen oftalmit, keratit gibi infeksiyonlara da neden olabilir. Genellikle

sistemik bir hastalık varlığında (diyabet, immünsüpresyon) ortaya çıkar, kandidemi, cerrahi, lokal steroid ya da antibakteriyel ajan kullanımı, göz anomalileri ve intravenöz kateterler enfeksiyona zemin hazırlayan risk faktörleridir (Asmundsdottir, et al., 2002).

Hepatosplenik Kandidiyaz: Akut lökemi için tedavi alan hastalar ya da uzun süre nötropenik kalan kemik iliği transplant alıcılarında görülen yaygın *Candida* enfeksiyonunun bir sendromudur. Hastalarda multipl karaciğer ve dalak apseleri mevcuttur. Morbidite ve mortalitesi yüksektir (Goodway, 1995).

Kemik ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları: Oldukça nadir görülen enfeksiyonlardır ve genellikle kandideminin geç komplikasyonudur. Tanı ve tedavi güçtür (Edwards, 2000).

2.7. *Candida* Enfeksiyonlarında Tanı

Candida enfeksiyonlarının tanısı klinik bulgular ve laboratuvar sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine bağlıdır. Kandidozların laboratuvar tanısında a. klinik örneklerin direk mikroskopik incelenmesi, b. Kan, vücut sıvıları, dokular veya diğer bölgelerden alınan örneklerden *Candida* türlerinin soyutlanması c. *Candida* türünün belirlenmesi d. Doku örneklerinde *Candida* benzeri mikroorganizma saptandığında bunun doğrulanması gerekmektedir. Tanıdaki ilk aşamada öncelikle enfeksiyonu temsil edecek doğru örnek alınmalıdır (Richardson and Warnock, 1997).

Direkt mikroskopik inceleme; Deri ve mukoza kandidozlarının tanısında *Candida* enfeksiyonlarının tanısı genellikle direkt mikroskopik incelemede mikroorganizmaların varlığının gösterilmesi ile yapılır. Bu tür örneklerin %10-30 potasyum hidroksit ile ıslak preparasyonu ya da Gram, metilen mavisi veya kalkoflor beyazı ile boyanarak incelenmesinde tomurcuklanan maya hücreleri, hif ya da yalancı hiflerin görülmesi tanıda değerlidir (Goodway, 1995; Richardson and Carlson, 2002). BOS, idrar, balgam, bronkoalveoler lavaj gibi sıvı örneklerde maya hücreleri yoğun olmayacağından, santrifüj işleminden sonra Gram boyanarak incelenmesi, kültürde üreme olmadan kısa sürede tanıya varılabilmesi açısından çok önemlidir. (Richardson and Warnock, 1997; Kwon-Chung and Bennet, 1992; Yıldırım, 1999).

Kültür; Etkenin izolasyonunun ve gerektiğinde antifungal duyarlılık testlerinin yapılabilmesi kültürün avantajlarıdır. Yüzeyel enfeksiyonların mikroskopik incelemesinde mikroorganizmanın görülmesinin ardından kültür pozitifliği tanıyı kesinleştirir (Hazen and

Howell, 2003). Kandidiyazların invaziv formlarının tanısında da kültür önemli rol oynar. Ancak solunum veya sindirim sisteminden elde edilen pozitif bir kültür kolonizasyon da olabileceğinden, balgam ya da gaita örneğinden izolasyon tek başına tanı için yeterli değildir. Bu nedenle steril alan örnekleri (biyopsi ya da bronkoskopik örnekler) elde edilmeli ve klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir (Richardson and Warnock, 1997; Richardson and Carlson, 2002).

Kültür için örnekler SDA besiyerine inoküle edilerek oda sıcaklığında (22-26 °C) ve 37 °C’de inkübe edilir. 24-48 saatte maya kolonileri belirgin hale gelir. Dissemine kandidiyaz ve kandidemi düşünüldüğünde mutlaka kan kültürü yapılmalıdır. Ancak bu durumda kan kültürü pozitifliği çok düşük olduğundan (~%40) birkaç kez tekrarlanmalıdır (Yücel and Kantarcıoğlu, 1999). Pozitiflik oranını ve üreme hızını arttırmak için lizis santrifüjasyon teknikleri ve BACTEC 9240, BacT/Alert, ESP ve Vital gibi sürekli monitorizasyon yapan otomatize sistemler geliştirilmiştir (Goodway, 1995).

Çeşitli testlerle kültürde üreyen türün identifikasyonu yapılabilir. Serumda 37 °C’de 2-3 saatte germ tüp oluşumu *C. albicans*’ın identifikasyonunda kullanılan hızlı bir testtir (Goodway, 1995). Mısırunu Tween 80 agara ekim yapılarak hif, yalancı hif, klamidospore oluşumu, blastokonidyumların büyüklük ve dizilimleri incelenir. Klamidospore üretimi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* için tanısaldır (Pujol, et al., 1997). *Candida*’ların üreaz aktivitesi, karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon özellikleri ve kromojenik enzimatik reaksiyonlarını içeren biyokimyasal testler zor ve zaman alıcı olmakla birlikte bu reaksiyonları içeren çeşitli hızlı ticari identifikasyon sistemleri geliştirilmiştir (Goodway, 1995).

Serolojik yöntemler; İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının erken tanısı, nonspesifik klinik semptom ve bulgular nedeniyle oldukça zordur. Ayrıca sıklıkla negatif sonuçlanan ya da çok geç pozitifleşen kan kültürü gibi geleneksel mikrobiyolojik yöntemler hastalığın tanısında çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. (Cooke, et al., 2002). Bu nedenle *Candida* infeksiyonlarının hızlı tanısına yönelik birkaç serolojik test geliştirilmiştir. Bunlar *Candida* türlerinin enolaz, glukan ve mannan antijenlerini hedefleyen ELISA, lateks aglütinasyon, dot immünobinding assay gibi serolojik testlerdir. Gastrointestinal sistem ve diğer bölgelerin kolonizasyonunun sağlıklı bireylerde antikor yanıtı oluşturması ve immüdüşkün hastalarda saptanabilir antikor yanıtının zayıflığı nedeniyle antikor saptamaya yönelik testler yetersiz

olabilmektedir. Fungus spesifik bir metabolit olan D-arabinitol de tanıda yararlı olabilir (Sendid, et al., 2003).

Moleküler tanı yöntemleri; Kandidozlarla ilgili son beş yıl içerisinde yapılmış moleküler ve genetik araştırmalar incelendiğinde çalışmaların dört temel alanda yoğunlaştığı görülmektedir. Bu alanlar etken mantarın klinik örnekte varlığının cins/tür düzeyinde identifikasyonu, epidemiyolojik amaçlı genotiplendirme, virülans ve antifungal duyarlılık kıyaslamalarıdır. İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının zamanında ve etkili tanısı için daha hızlı, daha duyarlı ve daha özgül testlere gereksinim vardır. Bu amaçla DNA saptanmasına dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde fungal infeksiyonların tanısına yönelik kitler sadece birkaç etkene yöneliktir ve bunlar da esas olarak kültür ortamındaki mikroorganizmanın tanımlanmasında etkilidir (Sigmundsdottir, et al., 2000).

2. 8. *Candida* İnfeksiyonlarının Tedavisi

Mantarlar bakterilerden farklı olarak ökaryot hücre yapısındadırlar. Başka bir deyişle insan hücresine benzerlik gösterirler. Ökaryot yapıdaki mantar hücresine etkili, ancak insan hücresine etki göstermeyen kimyasal maddelerin bulunması oldukça güçtür. Bununla birlikte son yirmi yıl içinde antifungal tedavi alanında yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İnsan hücre zarında temel sterol yapı kolesterol iken, mantar hücresinde bu yapının karşılığı ergosteroldür. Günümüzde kullanılan antifungal ilaçların büyük bir kısmının hedefi bu yapıdır (Şekil 2. 8. 1.). Polyen ve triazol grubu antifungal ilaçlar etki mekanizmaları farklı olmakla beraber ergosterol yapı üzerinden etkilidirler (Mukherjee, et al., 2005).

Candida infeksiyonlarında kullanılan ilaçlar Çizelge 2.8.1.de verilmiştir.

Çizelge 2. 8. 1. Sistemik kullanım için mevcut antifungal ajanlar (Arıkan and Rex, 2003).

Antifungal ajan grubu	Aktif madde	Mekanizma
Polyenler	AmfoterisinB(AmB) Nistatin	Fungal hücre membranının esas sterolü olan ergosterole bağlanarak fungal hücrelerin ölümüne neden olurlar
Azoller	<i>İmidazoller</i> ;Ketokonazol, <i>Triazoller</i> ;Flukonazol(FLU), İtrakonazol(IT) Vorikonazol(VORI) Posakonazol	Lanosterolden ergosterol sentezini inhibe ederek mantar hücresinin üremesini durdururlar
Antimetabolitler	Flusitozin(5FC)	Pirimidin metabolizmasını ve böylece fungal DNA, RNA ve protein sentezini bozarak etkili olur
Alilaminler	Terbinafin(TRB) Naftifin	Ergosterol biyosentezini inhibe ederek etkili olurlar
Ekinokandinler	Cilofungin Anidulafungin Kaspofungin(CAS) Mikafungin	Glukan sentezini inhibe ederek fungal hücre duvarı sentezini durdururlar
Diğer	Griseofulvin	Fungal mitozun inhibisyonu yoluyla etkili olur

Bunların dışında yeni geliştirilmekte olan antifungal ajanlar; nistatinin lipozomal formu, ravukonazol gibi yeni triazoller, sordarinler ve azasordinlerin deriveleridir.

Günümüzde tek antifungal ajanlar için duyarlılıkları tespit eden ve MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyon) tespitine dayanan metodlar geniş biçimde ortaya konmuştur. MİK, agar ya da broth dilüsyon ile yapılan bir duyarlılık testinde "mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu" olarak tanımlanır. Azol grubu antifungal ajanların MİK değerlerinin belirlenmesinde %80 fungal üreme inhibisyonu, amfoterisin B için ise tam inhibisyon değerleri dikkate alınmaktadır (NCCLS/CLSI, M27-A2), (National Committee for Clinical Laboratory Standards / Clinical and Laboratory Standards Institute).

Kaspofungin: Mantarların insan hücresinden farklı olarak hücre duvar yapısı bulunmaktadır. $\beta(1,3)$ D-glukan çeşitli fungal türlerde bulunan önemli bir hücre duvar yapısal komponentidir. Memeliler bu komponenti içermediklerinden bu bileşenin fungal hücrelere karşı seçici olarak aktif olduğu anlaşılmaktadır (Kurtz, et al, 1994). Son yıllarda

gündeme gelen ekinokandin grubu antifungaller hücre duvar sentezi üzerine etkilidirler. Bu grupta yer alan kaspofungin, klinik kullanıma yeni giren bir antifungaldir (Bru and Herbrecht, 2003). Kaspofungin, *Glarea lozoyensis* adlı fungusun bir fermentasyon ürününden üretilen yarı sentetik ve suda çözünebilen bir lipopeptittir. $\beta(1,3)$ D-glukan sentetaz enziminin non-kompetetiv inhibisyonu yoluyla fungal hücre duvarının $\beta(1,3)$ D-glukan sentezini bloklar. Böylece üreyen hücrelerin duvarında glukan yer alamamasına bağlı olarak ozmotik dayanıklılıkta bozulma olmakta ve mantar hücresi ölmektedir. $\beta(1,3)$ D-glukanın zincirleri hücre duvarına mekanik bir güç veren katı ve üç boyutlu bir matrix formundadır. $\beta(1,3)$ D-glukan sentazın inhibisyonu hem fungistatik hem de fungisidal etki üretir. Fungistatik etki hücre duvarının bütünlüğü değiştirdiğinden duvar yapısının mekanik gücünü kaybetmesine yıkımına yol açar. Bu etki mekanizması hücre membranı üzerine ya da DNA ve protein sentezi üzerine etki eden diğer antifungal sınıflarından farklıdır.

Kaspofungin azol dirençli *Candida*'lar da dahil olmak üzere *Candida* türlerine, *Aspergillus* türlerine, *Fusarium* türleri, Zygomycetes türleri, dematiyasöz mantarlar ve *Pneumocystis carinii*'ye karşı da etkindir (Bru and Herbrecht, 2003). Oral biyoyararlanımı çok düşük olduğundan ve parenteral uygulanması gerekir. Ortalama MİK değeri 32 $\mu\text{g/ml}$ olan *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkili değildir. $\beta(1,3)$ D-glukana sahip tüm funguslara teorik olarak etkindir. Bununla beraber *in vitro* antifungal duyarlılık testleri kaspofunginin dahil olduğu ekinokandinler için standardize edilmemiştir. MİK için sınır değerler tanımlanmamış ve *in vitro* verilerle klinik etkinlik arasındaki korelasyon henüz bilinmemektedir (Bru and Herbrecht, 2003).

Amfoterisin B: *Streptomyces nodosus* tarafından üretilen, bir hidrofilik polihidroksil zinciri ve bir lipofilik polyen hidrokarbon zincirine sahip amfoterik bir bileşiktir. Suda eriyebilirliği kötüdür. Amfoterisin B ve lipit formülasyonları sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak bulunan parenteral formülasyonu amfoterisin B deoksikolattır. Çok etkili bir antifungal ilaç olmasına rağmen terapötik aralığının dar olması klinik kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle lipit formülasyonları geliştirilmiştir; amfoterisin B lipit kompleks, amfoterisin B koloidal dispersiyon ve lipozomal amfoterisin B. Bu üç formülasyonun böbrekteki konsantrasyonları nefrotoksik amfoterisin B deoksikolattan daha düşüktür (Stevens and Bennet, 2000).

Amfoterisin B ve diğer polyenler primer olarak fungal hücre membranının sterolü olan ergosterole bağlanarak etki gösterirler. Bu bağlanma sonucunda membran geçirgenliği artar

ve bunu hücre içi potasyum, magnezyum, şekerler ve metabolitlerin kaybı takip eder. Sonuçta hücre canlılığını kaybeder. Amfoterisin B'ye bağlı oksidatif hasarın da antifungal aktiviteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Lipit formülasyonları da aynı mekanizma ile etki gösterirler (Stevens and Bennet, 2000).

Amfoterisin B invaziv kandidiyaz, kriptokokkoz, aspergilloz, blastomikoz, histoplazmoz, koksidioidomikoz, sporotrikoz, parakoksidioidomikozda ve antibakteriyel ajanlarla tedaviye dirençli febril nötropenik hastalarda ampirik olarak yaygın kullanılır. Lipit amfoterisin B formülasyonları kolay tolere edilebilirlikleri ve enfeksiyon alanına daha fazla yayılmaları nedeniyle *in vivo* yüksek etkinliğe sahiptirler. Bunlar esas olarak renal fonksiyonu bozuk ya da amfoterisin B deoksikolatı tolere edemeyen hastalarda endikedir. En önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Lipit formülasyonlarında, başta nefrotoksisite olmak üzere yan etkileri önemli oranda azalmıştır (Stevens and Bennet, 2000).

Flukonazol: Azol antifungallerin gelişimi son 20 yılda hızlı bir artış göstermiştir. Flukonazol, özellikle kandidiyaz tedavisinde, yaygın olarak kullanılan, azol halkası üç nitrojen içeren triazoller grubunda yer alır. Suda eriyebilir bir bileşiktir ve gastrointestinal kanaldan iyi absorbe edilir, hem oral hem de parenteral preparatları mevcuttur. Azol grubu antifungaller, lanosterolden ergosterol sentezinde rol oynayan sitokrom P-450 ailesinden 14 α -demetilazın inhibisyonu yoluyla etki gösterirler. Memeli dokusundaki sitokrom P-450 enzimine göre fungal sitokrom P450 enzimine daha fazla afinite göstermesi güvenlik profiline katkıda bulunur. Flukonazolün klinik etkinliği ve güvenilirliği, hem yüzeysel hem de sistemik enfeksiyonların tedavisinde yaygın kullanımı ile sonuçlanmıştır (Sheehan, et. al., 1999).

Flukonazol, ketokonazol ve itrakonazole göre nispeten daha küçük ve suda eriyebilen bir moleküldür ve hızla yüksek bir oranda absorbe olur (Dismukes, 2000).

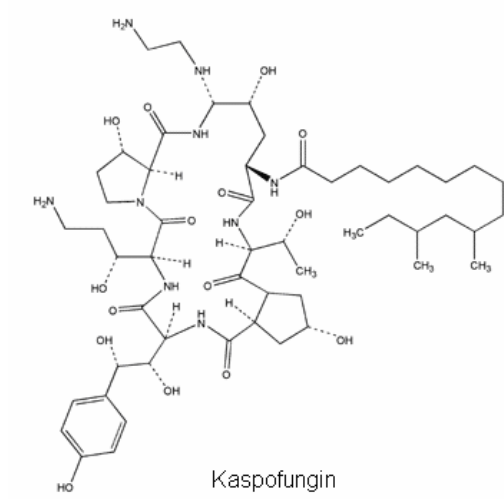
Flukonazol çoğu *Candida* türü ve *C. neoformans*'a karşı etkilidir. *Candida* türleri arasında *C. krusei* flukonazole doğal dirençlidir ve bazı *C. glabrata* izolatları ise doza bağlı duyarlıdır. Kandidiyaz, kriptokokkoz ve koksidioidomikoz tedavisinde tercih edilir. Yan etkileri oldukça nadirdir, anjiyoödem, trombositopeni ve alopesi görülebilir. Aspergilloz tedavisinde kullanılmaz. (Sheehan, et. al., 1999).

Flukonazolün tedavi ve profilakside yaygın şekilde kullanımı, direnç gelişebilceği endişelerini doğurmuştur. Nitekim uzun süreli düşük doz flukonazol tedavisi alan AIDS ve kanser hastalarında flukonazole direnç geliştiği belirlenmiştir (Sheehan, et. al., 1999).

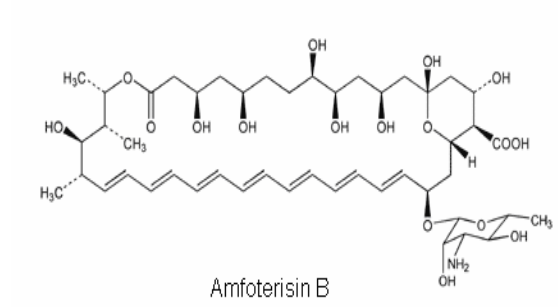
Vorikonazol: Diğer azollerle aynı etki mekanizmasına sahip oldukça potent ve geniş spektrumlu bir antifungaldir. Fungal 14- α -demetilaza karşı artmış etkinliği ve yükseltilmiş antifungal aktivitesi bulunan üçüncü jenerasyon bir azol türevidir ve akut invaziv aspergilloz ve diğer ciddi fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* türleri, *Pseudoallescheria boydii*, *Fusarium* türleri, *Trichosporon* türleri, *Candida* (flukonazole dirençli olanlar dahil) türleri, *Cryptococcus neoformans* ve endemik mikozlara *in vitro* etkinliği bildirilmiştir. Zygomycetes'lere etkinliği ise minimaldir. Hem mayalar hemde filamentöz ve dimorfik mantarlar olmak üzere geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Oral biyoyararlanımı %80'den fazla olduğundan hem oral tablet hem de intravenöz formülasyonları bulunur. Toksisitesi, çoğunlukla ilaç zirve kan seviyesine ulaştığında oluşan geçici oküler semptomlarla sınırlıdır (Stevens and Bennet, 2000).

İtrakonazol: Oldukça geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip bir azoldür. Etki mekanizması diğer azol grubu ilaçlarla aynıdır. Yapısal olarak ketokonazole benzer, suda erimez ve beyin omurilik sıvısına geçişi yoktur. Etki spektrumu flukonazole göre daha geniştir. İtrakonazol *Candida* türleri, *C. neoformans*, *Trichosporon* türleri, *Aspergillus* türleri, dematiasöz küf mantarları ve dimorfik mantarlara karşı etkilidir (Stevens and Bennet, 2000).

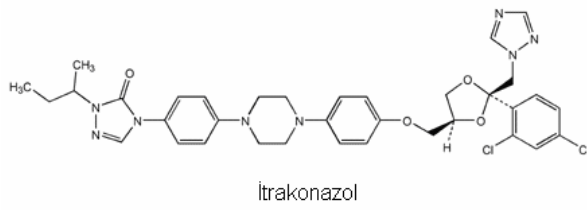
Araştırmamızda kullanılan antifungallerin yapısal formülleri Şekil 2. 8. 2. de verilmiştir.



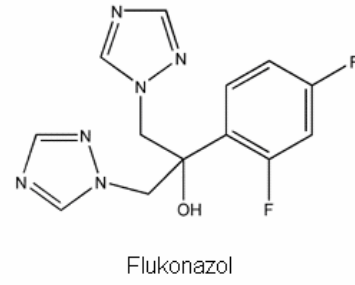
(a)



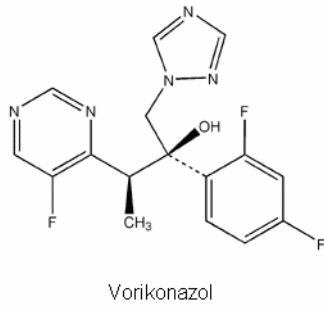
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 2. 8. 2. Çalışmamızda kullanılan antifungal ajanların yapısal formülleri. a. CAS,

b. AmB, c. ITRA, d. FLU ve e. VORI (Ghannoum and Rice, 1999).

2. 9. Antifungal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, çeşitli mikroorganizmalara bağlı gelişen infeksiyonların tedavisini yönlendirmek, yeni geliştirilen ilaçların *in vitro* aktivite spektrumlarını saptamak ve direnç oranları konusunda epidemiyolojik veriler elde etmek amacıyla uygulanan *in vitro* testlerdir. Antimikrobiyal testi sonuçları ile esas ulaşılmak istenen hedef, infeksiyonun tedavisi için kullanılan ilacın klinik başarı sağlayabilme oranını önceden tahmin edebilmektir. Günümüzde mayalar için kullanılan antifungal duyarlılık testleri Çizelge 2. 9. 1.de verilmiştir (Espinel-Ingroff and Pfaller, 2003).

Mantarlar için standart antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi için ilk çalışmalar 1982 yılında NCCLS/CLSI tarafından başlatılmıştır ve M27-A referansları geliştirilmiştir. Bu dökümanlar *Candida* türleri ve üç antifungal ilaç için değerlendirme MİK sınır değerlerini tanımlar .

Çizelge 2. 9. 1. Mayalar için kullanılan antifungal duyarlılık testleri

Test yöntemi	MİK saptama yolları
Broth mikro ve makro dilüsyon	Görsel olarak değerlendirilir
Kolorimetrik mikrodilüsyon	Renk değişikliği görsel olarak değerlendirilir
Spektrofotometrik mikrodilüsyon	Spektrofotometre ile MİK saptanması
Agar dilüsyon	Görsel değerlendirilir
Agar difüzyon - Disk - Antifungal strip	Zon çapı görsel olarak değerlendirilir İnhibisyon zonu görsel değerlendirilir

2. 9. 1. Broth mikro ve makrodilüsyon

Yapılan çalışmaların bir sonucu olarak 1997 yılında, *Candida* spp. ve *C. neoformans* gibi maya mantarlarının broth makrodilüsyon ve mikrodilüsyon ile test edilmeleri için NCCLS/CLSI M27-A2 dökümanları oluşturulmuştur. Referans yöntem başlangıçta makrodilüsyon olarak tanımlanmış fakat bu mikrodilüsyon yöntemi ile genişletilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi daha kullanışlı olması nedeniyle tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu testlerle MİK sonuçları elde edilir ve bazı ilaçlar için mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçların laboratuvarlar arası uyum oranı, makrodilüsyon ile elde edilen sonuçlara göre daha yüksektir (Espinel-Ingroff and Pfaller, 2003).

Bu testler için besiyeri olarak MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] ile tamponlanmış RPMI 1640 broth önerilir. Tüpte(makrodilüsyon) ya da pleytte (mikrodilüsyon) seri iki kat azalan ilaç dilüsyonları hazırlanır ve test edilecek maya süspansiyonu ile inoküle edilir. 37 °C’de 48 saat inkübasyonun ardından sonuçlar değerlendirilir (NCCLS/CLSI, 2002).

2. 9. 2. E-test

Azalan dilüsyonlarla antifungal ajanın emdirildiği plastik bir stripin, test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı agar plağı yüzeyine yerleştirilmesi ve antifungalın besiyerine diffüze olmasına dayanan bir testtir. Agar yüzeyinde üreme inhibisyon zonu ile antifungal emdirilmiş şeritin kesiştiği noktadan MİK saptanabilir. Bu test için de önerilen besiyeri MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 katı besiyeridir. Amfoterisin B, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol ve flusitozin E-test stripleri ticari olarak mevcuttur. Kaspofungin E-test yalnız araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Yakın zamanda vorikonazole *Candida* türlerinin duyarlılığı da bu yöntemle test edilmiştir. Bu test ile yapılan çalışmalar, bu testin sonuçları ile referans yöntemlerin (broth dilüsyon) sonuçları arasında iyi bir uyum göstermiştir. Broth dilüsyon yöntemlerine göre oldukça kolay uygulanabilir olmasına karşın maliyeti yüksektir (Rex, et al., 2001; Espinel-Ingroff and Pfaller, 2003).

2. 9. 3. Kombinasyon testleri

Antimikrobiyal kombinasyonlar sıklıkla sepsisemik ya da ciddi hastalığı bulunan hastalarda ampirik olarak geniş spektrumlu etkiyi sağlamak için tercih edilir. Daha az sıklıkla da, antimikrobiyallerin önerilen dozlarına dirençli bir patojen saptandığında ve tek ilaçla tedaviye cevap alınamadığında gündeme gelir. İlaçların kombine edilerek tedavide kullanılması tedavi süresini kısaltabilir ve direnç gelişimini önleyebilir. Ancak maliyet ve toksik etkiler artacağından kombinasyon tedavisinin etkinliği önceden değerlendirilmelidir (Te Dorsthorst, et al., 2002).

Antibiyotikler, bazen patojen mikroorganizmaların *in vivo* ortamda ilaç dirençli suşlarının ortaya çıkmasını önlemek ya da geciktirmek için kombine edilir. Farklı mekanizmalarla direnç geliştiren mikroorganizmalara karşı iki ya da daha fazla ilacın aynı anda kullanımı ile tümüne birden direnç geliştirecek kolonilerin ortaya çıkma ihtimali teorik olarak oldukça düşüktür. Bazı antimikrobiyallerin kullanımını ciddi oranda sınırlayan,

anamlı doz-ilifkili toksik etkileri mevcuttur. Bu yüzden, başarılı bir klinik sonuç elde etmek için tedaviye yeni bir ajanın eklenmesi ile toksik olduğu bilinen ilacın dozunda azaltma yapılabilir (Eliopoulos and Moellering, 2000).

Polimikrobiyal infeksiyon şüphesi ya da saptanması da antimikrobiyal kombinasyonların kullanımı için diğer bir gerekçedir. Bazı polimikrobiyal infeksiyonlarda birkaç patojenin herbirine karşı etkili birkaç antimikrobiyal kullanmak gerekebilir. Kombinasyon tedavisinin amaçları daha etkili ve geniş bir spektrum sağlamak, tek ilaç tedavisinde kullanılan ilaçlardan daha güçlü bir etki oluşturmak, güvenilirliği arttırmak, ilacın tolere edilmesini kolaylaştırmak ve dirençli mikroorganizmaların sayısını azaltmak olmalıdır (Eliopoulos and Moellering, 2000).

2. 9. 4. *In vitro* antimikrobiyal ilişkilerin saptanması (Antifungal sinerji)

Sinerji kelimesi ‘birlikte çalışmak’ anlamına gelen iki yunanca kelimeden gelmektedir. Bilindiği gibi antifungal ajanların farklı konsantrasyonlarda kombine olarak kullanılmaları sinerji ya da antagonizma ile sonuçlanan durumlara yol açabilir. Sinerji pozitif bir ilişkidir ve ilaçlar ayrı olarak test edildiklerinde elde edilen etkilerinin toplamından daha büyük bir etkinlik oluştururlar. Antagonizma negatif bir ilişkidir ve ilaçlar ayrı olarak test edildiklerinde oluşan etkilerinin toplamından belirgin şekilde daha düşük etkinlik elde edilir. Aditivite ise, iki ilacın kombinasyonunda oluşturdukları etkinin ayrı ayrı etkileri toplamına eşit olduğu durumdur. İki ilacın kombinasyonundan elde edilen sonuç, bunlardan en etkin olan ilacın sonucundan farksız olmadığında etkisiz durumdan (otonomi, indifference) bahsedilir (Eliopoulos and Moellering, 2000, Johnson, et al., 2004).

Loewe ve Bliss modeli olarak tanımlanan kalitatif tanımlamalar geniş bir kabul görmesine ve kolaylıkla uygulanabilmesine rağmen, sinerji için yapılan kantitatif tanımlamalar pek iyi standardize edilememiştir. Sıklıkla sinerji, test edilen izolatların sadece küçük bir kısmında tespit edilmiştir. Bu yüzden laboratuarlarda antifungal sinerjinin taranmasında kullanılan *in vitro* metotların güvenilirliği oldukça önemlidir (Greco et. al., 1995).

Antifungal sinerji için önerilen birkaç mekanizma vardır:

1. İki antifungal ile aynı biyokimyasal yolun farklı safhalarının inhibisyonu bir etkileşim çeşididir.

2. Bir antifungal ilacın hücre duvarı ya da membranına yönelik aktivitesinin sonucu olarak, diğer ajanın penetrasyonundaki artış olasıdır.
3. Farklı fungal hücre hedeflerinin eş zamanlı inhibisyonu sinerjistik bir etki yaratır. Örneğin hücre duvarı ve membranın aynı anda hedef alınması gibi hedefler de olasıdır.
4. Bir fungisidal ilacın güçlü başlangıç aktivitesi fungal yükü azaltmak içindir ve bu da sonraki ajanın daha iyi çalışmasına neden olarak geçiş tedavisi ya da takviye olarak kullanılır (Johnson, et al., 2004).

Belirli antifungal ajanlar arasındaki antagonizma mekanizması ise şu yollarla olabilir:

1. Aynı hedefe yönelik direk antifungal etki diğer antifungal ajanın yeteneğinde azalmaya ya da hedefinde değişmeye yol açabilir.
2. Bir antifungal ilaç tarafından hücre yüzeyine adsorbsiyon diğer ajanın hedef sahaya bağlanmasını engelleyebilir.
3. Bir antifungal ilaca maruz kalan hedefteki modifikasyon, diğer antifungalin etkileri için patojeni daha az duyarlı kılabilir (Johnson, et al., 2004).

Antimikrobiyal kombinasyonların kantitatif sonuçlarını tanımlamada kullanılan deneysel yöntem ve kriterlerin çeşitliliğine rağmen, sinerjizm ve antagonizmayı kalitatif olarak tanımlamada genel bir uyum vardır. Bu amaçla sıklıkla, iki boyutlu, iki ilaç broth mikrodilüsyon dama tahtası (checkerboard) yöntemi kullanılır. Broth makrodilüsyon, agar dilüsyon veya disk difüzyon gibi yöntemler de kullanılabilir. Yöntemler NCCLS/CLSI broth dilüsyon yöntemlerine uygundur ve sabit bir sürede kombinasyondaki spesifik konsantrasyonların inhibitör veya fungisidal aktivitesini değerlendirir. *In vitro* etkileşimler matematiksel olarak hesaplanır (Mukherjee, et al., 2005).

Araştırmacılar yıllarca antifungal ajanlar arasındaki etkileşimleri farklı anlamlarda FİK (Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon) indeks kullanarak sınıflandırmışlardır. Bu farklı anlamlar bazen farklı sonuçlara ve farklı yorumlara neden olmuştur. Son zamanlarda yorumlardaki birliktelik için FİK indeksinin 0.5'den küçük olması sinerji, 4'den büyük olması antagonizma ve 0.5 ile 4 arasında olması etkileşim yok şeklinde değerlendirilir. Aditivite ve indiferans sinerjik olmamasına rağmen kombinasyondaki ilaçlar arasında zararlı bir etkileşim olmadığını belirtir (Johnson, et al., 2004).

Kombinasyon testleri rutin değerlendirme için önerilmez. Ancak, etkileşimi bilinmeyen iki ilacın değerlendirilmesinde (yeni bir ilaçta olduğu gibi), ilaç direnci geliştiiğinde ya da tedavideki sorunlar nedeniyle sonuçlarda güvensizlik olduğunda kullanılabilir.

Antifungal kombinasyon tedavisi oldukça yenidir. Bu tedavi iki ya da daha fazla antifungalın uygun tedavi dozlarında eş zamanlı olarak kullanılmasıdır. Araştırmalar kombinasyon tedavisinin hem etkililiği artırdığını hem de toksisiteyi azalttığını göstermektedir. İnvaziv mikozlu, özellikle de aspergilloz ve kandidozlu hastalarda antifungal kombinasyon rejimlerinin rutin olarak kullanımını destekleyen çok az veri bulunmaktadır. Bununla beraber, ekinokandinler gibi yeni antifungal ajanların bulunması mikozların tedavisinde sinerjistik etki yaratan antifungal kombinasyon çalışmalarına olan ilgiyi artırmıştır (Mukherjee, et al., 2005).

Antimikrobiyal kombinasyonların etkinliğini değerlendirmede kullanılan laboratuvar yöntemleri;

2. 9. 5. Checkerboard (chessboard, dama tahtası)

In vitro ortamda antimikrobiyal kombinasyonları değerlendirmede en sık kullanılan yöntemdir. İlaçların farklı kombinasyonlarının varlığında fungal hücrelerin üreme inhibisyon oranlarının belirlenmesini sağlar. Test edilen mikroorganizmalar için ilaçların MİK değerlerinin alt ve üstündeki çoğul dilüsyonları ile yapılan bir model olduğundan “checkerboard” (dama tahtası) adı kullanılmıştır (Mukherjee, et al., 2004).

Testin anlaşılması oldukça kolaydır, sonuçları değerlendirmek için kullanılan matematiksel işlemler basittir ve ticari mikrodilüsyon sistemleri ile klinik laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir. Ancak bu yöntemde kombinasyonların farmakodinamik özellikleri hakkında bilgi edinilemez. Amfoterisin B kombinasyonlarında gözlenen MİK kümelenmesi duyarlılıkların belirlenmesinde karışıklığa yol açabilir. Bu testte elde edilen sonuçlar görecelidir, ilaç kombinasyonunun etkisinin gerçek ölçümünü vermez (Mukherjee, et al., 2005).

Her bir antimikrobiyalın MİK değerinin 4-5 kat altı ve üzerindeki iki katlık dilüsyonları kullanılır. Checkerboard sisteminde "x" eksenini tek başına A ilacının dile edilmiş aynı miktarlarını içeren kuyucukların bulunduğu sıraları, "y" eksenini ise B ilacının dile edilmiş aynı miktarlarını içerir. Her iki ekseninde de ilk sıralar sadece bir ilacı içerir ve aynı ilacın MİK

değerini gösterir. Sonuçta sistemdeki her bir kare test edilen iki ilacın tek bir kombinasyonunu içerir. Sonuçlar, test edilen mikroorganizmaya göre değişmekle birlikte, 24-48 saatlik inkübasyonun ardından görsel ya da spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Üremenin inhibe edildiği her kombinasyon için FİK indeks hesaplanır (Te Dorsthorst, et al., 2002).

Checkerboard broth dilüsyon testleri tüpte (makrobroth dilüsyon) ya da mikropakta (mikrobroth dilüsyon) yapılabilir ve dilüsyonlar için mantarlarda RPMI 1640 besiyeri tercih edilmektedir. Dama tahtası kombinasyon testi agar dilüsyon sisteminde kullanılmak üzere düzenlenebilir. Bu yöntem sınırlı sayıdaki antibiyotik kombinasyonlarına karşı çok sayıda suşun test edilmesi gerektiğinde avantajlı olabilir. Ayrıca aynı dilüsyon şeması kullanılarak, bir patojene karşı üç ilaç kombinasyonunu çalışmak için üç boyutlu bir sistem oluşturmak da mümkün olabilir (Te Dorsthorst, et al., 2002).

2. 9. 6. Time-kill curve (Zaman-ölüm eğrisi)

Sadece inhibisyon sonuçları veren dama tahtası yönteminin aksine test edilen kombinasyonun mikrobisidal aktivitesini ölçer. Bu nedenle bakterisidal tedavinin istendiği klinik durumlar için uygun bir yöntemdir. Bir avantajı da, sadece bir kez değerlendirilen dama tahtası yöntemine göre, antimikrobiyal etkileşimin zaman içindeki dinamik davranışını ortaya koymasıdır. Ancak bu yöntemde tekrarlayan koloni sayımı için gerekli işlemler oldukça yorucudur. Bu nedenle herhangi bir izolat ile test edilebilen ilaç kombinasyon ve dilüsyon sayıları belirgin oranda sınırlanır. Bu yöntemin bir dezavantajı da mantar hücrelerinin bir araya gelme eğilimidir ve bu durumda inhibisyonu saptamak zordur. Benzer şekilde küflerde de koloniyi saymada filamentasyon işi zorlaştırır (Mukherjee, et al., 2005; Eliopoulus and Moellering, 2000).

Bu yöntemde standart hücre süspansiyonu farklı zaman aralıkları için ilaç kombinasyonlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Belirli zaman aralıklarında besiyerine pasaj yapılarak inkübasyona bırakılır. Her zaman aralığı için canlı kalan hücreler hesaplanabilir ve test edilen her ilaç konsantrasyonu için öldürme-zaman eğrisi elde edilebilir. Koloni sayımları tespit edildiğinde sonuçları görmek için en kolay yol semilogaritmik bir kağıtta değerlerin işaretlenmesidir. Bu kağıtta zaman için apsis, ordinat için de logaritmik ölçek kullanılır. Aritmetik kağıt kullanılırsa ordinat üzerinde 10'un katları arasında koloni

sayımları logaritmik olarak belirtilir (Mukherjee, et al., 2005; Eliopoulus and Moellering, 2000).

Sonuçlar yalnız başına çok aktif tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonun etkilerine bakılarak alınır. Sinerji, kombinasyon ile 24 saatteki öldürmede çok aktif ilacın tek başına kullanılmasına göre 100 ya da daha fazla katlık bir artış göstermesi olarak tanımlanır. Antagonizma çok aktif tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonda 100 ya da daha fazla bir azalma olarak tanımlanır. Additivite (ya da indifference) çok aktif tek ilaçla karşılaştırıldığında kombinasyonda 24 saatteki öldürmede 10 kattan daha az bir değişme olarak tanımlanır (azalma ya da artma) (Mukherjee et al., 2005; Eliopoulus and Moellering, 2000).

2. 9. 7. Difüzyon yöntemi

Bir test mikroorganizmasının yayıldığı agar plaklarına antimikrobiyallerin difüzyonuna dayanan kalitatif bir yöntemdir. Önemli bir avantajı ticari olarak hazır, antimikrobiyal emdirilmiş disk ya da kağıt şeritlerin ve agar plakların kullanılabilmesidir. Diğer önemli avantajı bu yöntemin laboratuvarında kolaylıkla yapılabilmesidir (Espinell-Ingroff and Pfaller, 2003).

Disk difüzyon yöntemi; iki ilaç arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için test edilen mikroorganizmanın yayıldığı plağa A ve B ilaçlarını içeren diskler yerleştirilir. Diskler arası mesafe değişebilmekle birlikte, genellikle tek başlarına test edildiklerinde ilaçların elde edilen inhibisyon zonlarının yarıçapları toplamına eşit ya da daha büyük olmalıdır. Sinerjistik etkileşimde iki ilacın inhibisyon zonlarının birleştiği alanda köprüleşme ya da genişleme, antagonistik kombinasyonda ise iki ilacın inhibisyon zonlarının birleşme yeri yakınındaki alanda inhibisyon zonlarında kesilme gözlenir (Eliopoulus and Moellering, 2000).

Kağıt şerit yöntemi; antimikrobiyal emdirilmiş kağıt şeritler test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı agar plağı üzerine birbirine dik açılarla yerleştirilir. Aditiv ya da etkisiz kombinasyonlarda kağıt şeritlerin birleşme alanında eski inhibisyon zonlarına göre genişleme görülmez. Sinerjistik kombinasyonlarda inhibisyonunda genişleme görülür. Antagonistik kombinasyonda ise kağıt şeritlerin birleşme alanında eski inhibisyon zonlarına göre azalma saptanır (Eliopoulus and Moellering, 2000).

White ve arkadaşlarının, sinerjik etkiyi saptamak için zaman-ölüm eğrisi, dama tahtası ve E-test yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada E-test şeritlerini, her birinin tek başına MİK değerinin olduğu alanda çakışacak şekilde 90°'lik açı ile, bakteri yayılmış agar plağı üzerine yerleştirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucu olarak E-test yöntemi ile yapılan sinerji testlerinin diğer *in vitro* testlere alternatif olarak görüldüğü ileri sürülmüştür (White, et al., 1996).

E-test mikobakteriler ve aerob gram negatif basillere karşı ilaç kombinasyonlarını test etmek için başarıyla kullanılmıştır. Lewis ve arkadaşları yine üç sinerji testini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada maya süspansiyonu yayılmış olan agar plağına antifungal şeritlerden birini yerleştirip ilacın diffüze olması için 1 saat bekledikten sonra birinci şeridi kaldırıp aynı alana diğer şeridi yerleştirmişlerdir. Çalışma sonunda üç yöntem içinde E-testin kullanımda en basit ve antifungal kombinasyonların testi için kabul edilebilir olduğu sonucuna varmışlardır. Eğer E-test yöntemi antifungal kombinasyonları test etmek için standardize edilebilirse, mikrobiyoloji laboratuvarları için ideal bir test yöntemi olacaktır (Lewis, et al., 1998).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3. 1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar, Besiyerleri ve Antifungal Maddelerin Hazırlanması

3. 1. 1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmaya Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında kan, idrar, balgam, yara yeri gibi klinik örneklerden izole edilen ve stok kültürlerden alınan 50 *C. glabrata* suşu dahil edilmiştir. Mikroorganizmaların stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak için SDA katı besiyeri ortamı kullanılmış ve kültürler kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmamızda kalite kontrol izolatu olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 referans suşu kullanılmıştır.

3. 1. 2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılacak suşların aktivasyonu için SDA besiyeri; Time-Kill çalışmalarında belirli zaman aralıklarında alınacak pasajlar için Patates dekstroza agar (PDA) besiyeri; Broth Mikrodilüsyon testleri, Time- Kill, E-test ve üçlü disk difüzyon yöntemleri için de MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 broth ve MOPS’lu RPMI 1640 agar besiyerleri ve Metilen Mavisi içeren Müeller Hinton besiyeri kullanıldı.

SDA besiyeri; toz halindeki 47g Sabouraud 2% glucose agar (Fluka) 1000 ml distile suda çözündürülecek ve 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır. Besiyeri 55°C’ye soğutulup Petri kaplarına dağıtıldı.

PDA besiyeri; toz halindeki 39g Potato dextrose agar (Fluka) 1000 ml distile suda çözündürülerek ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55°C’ye soğutulup Petri kaplarına dağıtıldı.

RPMI 1640 besiyeri; 10.4 g toz RPMI 1640 besiyeri 900 ml distile suda çözündürüldü ve son konsantrasyon 0.165 mol/l olacak şekilde 34.53 g MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) tamponu ilave edildi. 1mol/l sodyum hidroksit kullanılarak 25°C’de pH 7.0’ye ayarlandı , besiyeri filtrasyon yöntemi ile sterilize edilerek 100 ml’lik steril kapaklı şişelere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklandı (NCCLS/CLSI).

RPMI 1640 agar besiyeri;

aynı miktarlardaki RPMI 1640 ve MOPS ile 20 g glukoz 500 ml distile suda çözündürülerek benmaride 60 °C’de bekletildi. Ayrı bir balonda 15 g agar 500 ml distile suda hazırlanarak 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi. Her iki sıvı eşit sıcaklığa ulaştığında RPMI 1640 besiyeri filtrasyonla sterilize edilmiş ve agarla birleştirilerek Petri kaplarına dağıtılmıştır (NCCLS/CLSI).

Mueller-Hinton Agar besiyeri; ‘toz halindeki 38g Mueller-Hinton agar (Fluka) 1000 ml distile suda çözündürülerek hazırlanmıştır. 20 mL distile suda 0,1 g metilen mavisi eritilerek ve hafifçe çalkalanarak ısıtıldı. Agar süspansiyonun her litresine bu solüsyonun 100µL’si ve 20 g glukoz eklendikten sonra 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55°C’ye soğutulup Petri kaplarına dağıtıldı.

3. 1. 3. Kullanılan antifungal maddeler:

Flukonazol ve vorikonazol (Pfizer), itrakonazol (Jansen-Cilag), amfoterisin B (Sigma), kaspofungin (Merck) E-test stripleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) sağlandı. Flukonazol 5120 µg/ml olacak şekilde tartılarak steril distile suda, vorikonazol, itrakonazol ve amfoterisin B 1600µg/ml olacak şekilde tartılarak dimethyl sulfoxide (DMSO) içinde çözündürülerek stok solüsyonlar hazırlandı. Her birinde 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine dağıtılarak kullanılıncaya kadar -70°C’de saklandı. Kaspofungin (Merck) saf toz olarak alınarak 1600 µg/ml lik bir stok solüsyon hazırlanmak üzere steril distile suda çözündürüldü ve -70°C’de saklandı.

3. 2. İzolatların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

3. 2. 1. Antifungal ajanların hazırlanması;

E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak test izolatlarına karşı her antifungal ajanın MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değeri saptanmıştır. Flukonazol için breakpoint değerleri (≤8: duyarlı, 16-32: doza bağlı duyarlı, ≥64: dirençli) ve itrakonazol için de (≤0,125: duyarlı, 0,25-0,5: doza bağlı duyarlı, ≥1: dirençli) olarak NCCLS/CLSI tarafından standardize edilmiş olmakla birlikte amfoterisin B, vorikonazol ve ekinokandinler için henüz standardize edilmemiştir.

Daha önceden hazırlanmış olan stok antifungal solüsyonlardan NCCLS/CLSI önerileri doğrultusunda antifungaller için hazırlanan dilüsyonlar Çizelge 3.2.1.1.'de verilmiştir. (NCCLS/CLSI, M27-A2).

Çizelge 3. 2. 1. 1. Antifungal ilaçlar için hazırlanan mikrodilüsyon test konsantrasyonları

Antifungal ajanlar	Mikrodilüsyon test konsantrasyonları (µg/ml)										
AmB	0. 0313	0.0625	0.125	0. 25	0. 5	1	2	4	8	16	
VORI	0. 0313	0.0625	0.125	0. 25	0. 5	1	2	4	8	16	
CAS	0. 0625	0. 125	0. 25	0. 5	1	2	4	8	16	32	64
FLU	0. 0625	0. 125	0. 25	0. 5	1	2	4	8	16	32	64
ITRA	0. 0625	0. 125	0. 25	0. 5	1	2	4	8	16		

Suda çözünabilir antifungallerin (FLU ve CAS) iki katlık konsantrasyonlarını elde etmek amacıyla, her antifungal için ayrı bir spora ikişer sıra test tüpü yerleştirildi. RPMI-1640 broth ile sırayla ilk tüplerde 1/8, 1/4, 1/8 ve 1/8'lik dilüsyonları yapıldı. Daha sonra antifungallerin ½'lik dilüsyonları yapılarak ara konsantrasyonlar elde edildi (640µg/ml'den-0,0625µg/ml'ye kadar). Final konsantrasyonuna erişmek için yapılan 1/5'lik dilüsyonlarla da son konsantrasyonların iki katı elde edilmiştir.

Suda çözünemeyen antifungallerden VORI, ITRA ve AmB için ise, 1600 µg/ml'lik stok solüsyondan ilk tüplerde DMSO ile ilk tüplerde ½'lik dilüsyonlar yapılarak ara konsantrasyonlar elde edildi. 1/100'lük final konsantrasyonuna erişmek için RPMI 1640 broth ile 1/50'lik dilüsyonlar yapıldı. Brot mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde antifungal ilaçların hazırlanmasında izlenen adımlar aşağıdaki şemada verilmiştir (NCCLS/CLSI, M27/A2).

Çizelge 3.2.1.2. Brot mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde suda çözünebilir antifungal ilaçlar için hazırlanan dilüsyonlar ((NCCLS/CLSI, M27/A2).

A D I M	Konsantrasyon µg/ml	Kay- nak	Hacim) (mL) +	Besiye- ri (mL)	Ara konsantrasyon µg/ml	Final konsantras- yon 1:10 (µg/ml)	Log 2
1	5120	Stok	1mL	7	640 µg/ml	64	6
2	640	1. adım	1,0	1,0	320	32	5
3	640	1. adım	1,0	3,0	160	16	4
4	160	3. adım	1,0	1,0	80	8	3
5	160	3. adım	0,5	1,5	40	4	2
6	160	3. adım	0,5	3,5	20	2	1
7	20	6. adım	1,0	1,0	10	1	0
8	20	6. adım	0,5	1,5	5	0,5	-1
9	20	6. adım	0,5	3,5	2,5	0,25	-2
10	2,5	9. adım	1,0	1,0	1,25	0,125	-3
11	2,5	9. adım	0,5	1,5	0,625	0,0625	-4
12	2,5	9. adım	0,5	3,5	0,3125	0,03125	-5

Çizelge 3.2.1.3. Brot mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde suda çözünemeyen antifungal ilaçlar için hazırlanan dilüsyonlar (NCCLS/CLSI, M27/A2).

Adım	Konsantrasyon µg/ml	Kaynak	Hacim+ (mL)	Çözücü= DMSO (mL)	Ara konsantrasyon= µg/ml	Final konsantrasyon 1:100 (µg/ml)	Log2
1	1,600	Stok			1,600 µg/ml	16	4
2	1,600	Stok	0,5	0,5	800	8,0	3
3	1,600	Stok	0,5	1,5	400	4,0	2
4	1,600	Stok	0,5	3,5	200	2,0	1
5	200	4. adım	0,5	0,5	100	1,0	0

Çizelge 3.2.1.3. devam ediyor.

6	200	4. adım	0,5	1,5	50	0,5	-1
7	200	4. adım	0,5	3,5	25	0,25	-2
8	25	7. adım	0,5	0,5	12,5	0,125	-3
9	25	7. adım	0,5	1,5	6,25	0,0625	-4
10	25	7. adım	0,5	3,5	3,13	0,0313	-5

3. 2. 2. Maya süspansiyonlarının hazırlanması

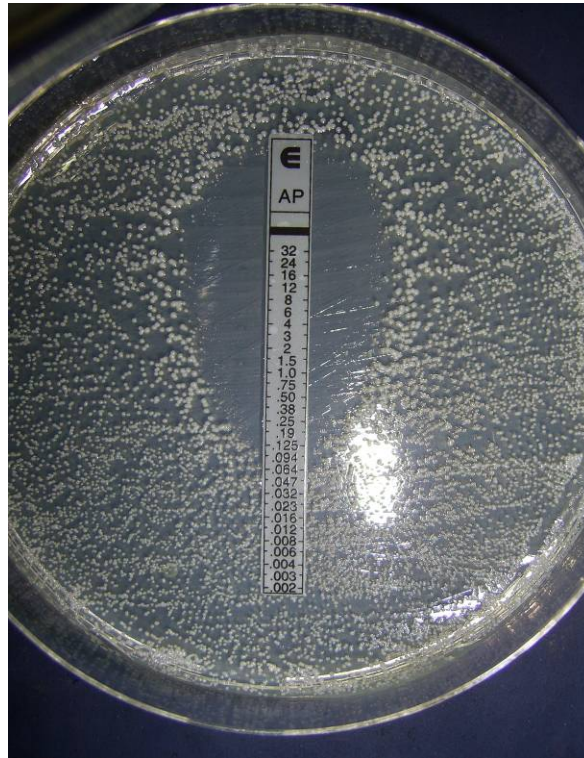
Test öncesi tüm suşlar SDA besiyerine pasajlanıp, 35 °C’de inkübe edildi, 24 saatlik taze kültürden 1 mm çaplı yaklaşık beş koloni alınarak 5 ml steril % 0.85 NaCl içinde süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyon yaklaşık 15 saniye vortekslendikten sonra spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı. Bu işlemle stok maya süspansiyonu her mililitrede $1-5 \times 10^6$ hücre içermektedir. Çalışma süspansiyonunun iki katının elde edilmesi için, stok maya süspansiyonu RPMI 1640 broth ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilerek sonuçta $1-5 \times 10^3$ hücre/ml’lik maya süspansiyonu elde edildi (NCCLS/CLSI, M27-A2).

3. 2. 3. İnokülasyon, inkübasyon ve değerlendirme

Broth mikrodilüsyon testi için steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanıldı. Mikrolaklar, antifungal isimleri ve dilüsyonları, suş numaraları ile işaretlenmiş, steril plastik pipet uçları ve tek kanallı pipetörler kullanılarak, her bir sütuna bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde 100’er µl dağıtıldı. İlk sütuna, üreme kontrol kuyucuğu olarak kullanılmak üzere, ilaç içermeyen besiyeri dağıtıldı, ardından her bir sıraya bir suş gelecek şekilde mikroorganizma süspansiyonundan 100’er µl eklenmiştir. Bu işlem sonucunda hem ilaç hem de maya konsantrasyonları ½ oranında seyreltilerek çalışma konsantrasyonuna ulaşıldı. Mikrolakların üzeri steril parafilm ile kapatıldı ve 35 °C’de 48 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri görsel olarak değerlendirildi. Vorikonazol, itrakonazol, flukonazol ve kaspofungin için üreme kontrol kuyucuğuna göre üremede %80’lik; Amfoterisin B için %100’ lük azalmanın olduğu kuyucuk MİK değeri olarak kabul edildi (NCCLS/ CLSI, M27-A2).

3. 2. 4. E-test

SDA'daki 24 saatlik taze maya kültüründen 3-4 koloni alınarak 5 ml %0. 85'lik NaCl içinde 0.5 McFarland bulanıklık oluşturacak şekilde maya süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon 15 mm çaplı RPMI 1640 agar plaklarına steril pamuklu eküvyonla yayıldı. Plakların kuruması için yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra antifungal şeritler yerleştirildi. Tüm plaklar 35 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra , E-test MİK değerleri belirlendi (Bkz. Şekil 3.2.4.1.) (Lewis, et al., 2002; Maxwell, et al., 2003).



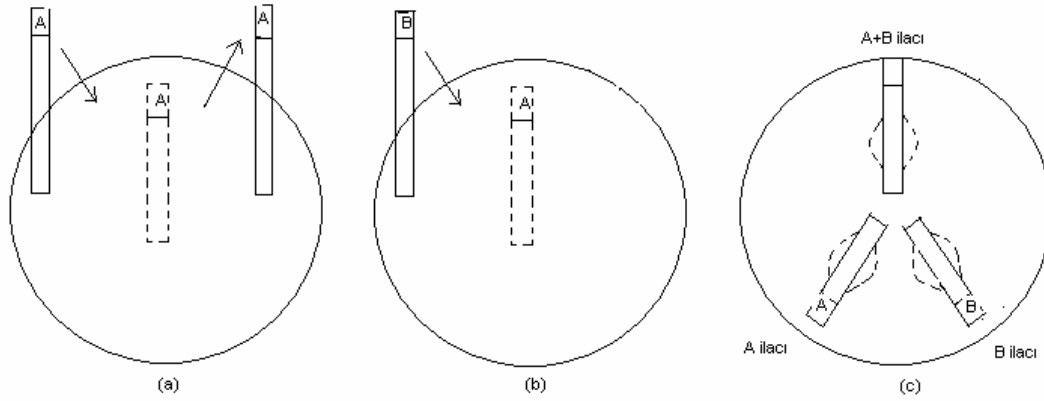
Şekil 3. 2. 4. 1. 150 mm agar plakta E-test şeridi

3. 3. Antifungal Kombinasyon Çalışmaları

3. 3. 1. E-Test metodu-1

E-test ile duyarlılık testinde olduğu gibi 0. 5 McFarland bulanıklıkta maya süspansiyonu 15 mm çaplı RPMI 1640 agar plaklarına hücreler tek sıra düşecek şekilde yayıldı. CAS'e ait E-test şeriti agar üzerine yerleştirilmiş, 1 saat sonra bu şerit kaldırılıp onların izleri üzerine kombine etkisi değerlendirilecek diğer ilaç stribi yerleştirildi. 35 °C'de 48 saat

inkübasyondan sonra MİK değerleri okundu (Şekil 3.3.1.1.). Antifungal ilaçların tek başlarına saptanan MİK değerlerine göre kombinasyonda ≥ 3 dilüsyon azalma sinerji, ≥ 3 dilüsyon artış antagonizma ve < 2 dilüsyon azalması etkisiz olarak tanımlandı. Ayrıca diğer yöntemlerle karşılaştırmayı kolaylaştırmak için E-test MİK'lerinden fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi hesaplandı (Lewis, et al., 2002; Maxwell, et al., 2003).



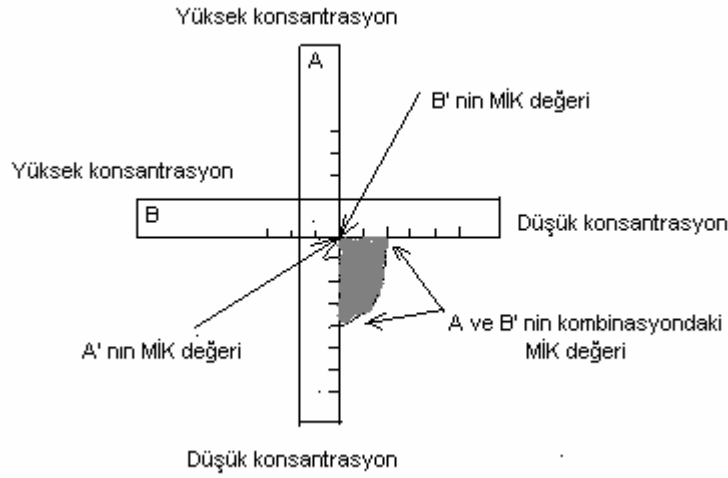
Şekil 3.3.1.1. Antifungal kombinasyonda E-test 1 metodu. (a) A ilacına ait E-test stribi agar üzerine yerleştirilir ve 1 saat sonra kaldırılır. (b) Birinci ilacın izi üzerine B ilacının stribi konur. (c) A ve B ilaçlarına ait ilave E-testlerde yerleştirilir. 24-48 saat inkübasyondan sonra MİK değerleri belirlenir.

FİK indeksi; ilacın kombinasyondaki MİK değerinin tek başına test edildiğinde saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilen her bir ilacın FİK'lerinin toplanması ile (FİK indeks = FİK A + FİK B) elde edildi (White, et al., 1996).

3.3.2. E-Test metodu-2

Hazırlanan inokülüm yukarıda anlatılan şekilde agar plakları üzerine yayıldıktan sonra E-test stripleri agar üzerine çapraz bir pozisyonda, ve nispi MİK kombinasyonlarındaki ölçekler arasında 90° lik bir açı olacak şekilde yerleştirildi. 24-48 saat inkübasyondan sonra inhibisyon zonları E-test tarafından MİK tespiti için tanımlanan şekilde okundu (Bkz. Şekil 3.3.2. 1.).

İlaç ilişkileri FİK indeksine dayanılarak sinerjistik, etkisiz ve antagonistik olarak sınıflandırılmıştır (White, et al., 1996).



Şekil 3. 3. 2. 1. E-test 2 sinerji metodunda stripleri yerleştirme diyagramı

3. 3. 3. Time-kill testi

Broth mikrodilüsyon yöntemi ile saptanmış olan MİK değerleri dikkate alınarak, RPMI 1640 broth ve stok ilaç solüsyonları ile amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin, itrakonazol ve vorikonazol için antifungal solüsyonları hazırlanmıştır.

Teste başlamadan önce izolatların iki kere PDA'ya pasajları yapılmıştır. 24-48 saatlik inkübasyondan sonra plaktan 3-5 koloni alınarak yaklaşık 9 ml steril suya alınmıştır. Fungal süspansiyonun bulanıklığı spektrofotometrik olarak 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Standardize maya süspansiyonunun 1ml si, 9ml'lik üreme besiyeri (RPMI 1640+MOPS) ve önceden belirlenmiş konsantrasyonlarda antifungalleri içeren steril tüplere eklendi. İlaçlar tek başlarına ve kombinasyonda 1xMİK olacak şekilde hazırlandı. Böylece fungal süspansiyon 1:10 oranında dilüe edilmiş ve başlangıç inokülümü yaklaşık $1-5 \times 10^5$ CFU/ml olacak şekilde ayarlandı. Tüplerden biri ilaç içermeyen kontrol grubu olarak çalışıldı. Test solüsyonları 35 °C de 24 saat orbital bir karıştırıcıda inkübe edildi. Örnekler önceden tespit edilen zaman aralıklarında (0, 2, 6, 24. saatlerde) steril suda seri dilüsyonlara alınarak koloni sayımlarının tespiti için PDA'ya 50 µl lik kısımlar halinde inoküle edildi. Tüm plaklar 35 °C de 48 saat inkübe edildi ve her zaman aralığı için koloni sayımları yapıldı. Tespit sınırlarımız 50 CFU/ml olarak belirlendi (Klepser, et al., 1997).

Sonuçların değerlendirilmesinde her mililitredeki koloni sayısı başlangıç inokülümüyle karşılaştırıldığında % <99.9 olduğunda fungusidal aktivite olduğu kabul edildi. Kombinasyon ile 24 saatte belirlenen koloni sayısında, çok aktif tek ajanla karşılaştırıldığında ≥ 100 -kat azalma (sinerji) ya da artma (antagonizma) olup olmadığına bakıldı. Eğer 100 kattan daha az bir değişme olmuşsa, etkileşim "etkisiz" olarak tanımlandı. Tüm testler iki kez tekrarlandı. (Klepser, et al., 1997; Barchiesi, et al., 2005).

3.3.4. Disk difüzyon testi

İlaç içeren disklerin hazırlanması: Testten önce Whatman no 1 kağıtları kullanılarak 6,3 mm çapında diskler hazırlandı ve Petri kabı içerisinde Pastör fırınında steril edildi. Kaspofungin için: Her mililitresi 100 µg ilaç içeren bir solüsyon hazırlandı ve bu solüsyondan 25 µl alınarak disklerle emdirildi. Böylece final konsantrasyonu 2,5 µg/disk olarak ayarlandı (Lozano-Chiu, et al., 1999).

Çalışmamızda diğer antifungal disklerin hazırlanışında Amfoterisin B 10 µg, itrakonazol 8 µg, flukonazol 25 µg, vorikonazol 1,0 µg olacak şekilde hazırlandı (Online: www.mycology.org). Test izolatları spektrofotometrik olarak 0,5 McFarland'a ayarlandıktan sonra %2 glukoz ve 0,5 µg/µl metilen mavisi içeren Mueller-Hinton Agar plaklarına yayıldı. Plaklar en az 20 dk kurumaya bırakıldı. Daha sonra iki ilaç arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için, kaspofungin içeren disk ile kombine etkisi çalışılacak diğer ilacı içeren disk karşılıklı yerleştirildi. Aradaki mesafe, ilaçların tek başlarına test edildiklerinde elde edilen inhibisyon zonlarının yarıçapları toplamı kadar olacak şekilde ayarlandı. Plağın alt kısmına da aralarında bu mesafenin yarısı kadar uzaklıkta olan iki disk yerleştirildi. En alt kısma da iki ilacın kombinasyonunu içeren bir disk yerleştirildi. Plaklar 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Diskler arası mesafe değişebilmekle birlikte, sinerjistik etkileşimde iki ilacın inhibisyon zonlarının birleştiği alanda köprüleşme ya da genişleme, antagonistik kombinasyonda ise iki ilacın inhibisyon zonlarının birleşme yeri yakınındaki alanda inhibisyon zonlarında kesilme olup olmadığına bakıldı (NCCLS/CLSI, M44-A, Lozano-Chiu, et al., 1999; Eliopoulus and Moellering, 2000).

4. BULGULAR

4.1. *C. glabrata* İzolatlarının Beş Antifungal Ajana Karşı *in vitro* Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda yer alan 50 *C. glabrata* izolatına karşı, test edilen beş antifungal ajanın (amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin, itraconazol ve vorikonazol) broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile saptanan duyarlılık MİK sonuçları Çizelge 4.1.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre broth mikrodilüsyon testlerinde MİK değerleri amfoterisin B için 0,125-0,5 µg/ml, flukonazol için 8 - ≥64 µg/ml, vorikonazol için 0,125 – 4 µg/ml, kaspofungin için 0,125 – 2 µg/ml ve itraconazol için 0,25 – 4 µg/ml arasında değişmiştir.

E-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri ise amfoterisin B için 0,002-0,25 µg/ml, flukonazol için 6- >256 µg/ml, vorikonazol için 0,38- 4 µg/ml, kaspofungin için 0,125- 1,5 µg/ml ve itraconazol için 0,125-32 µg/ml olarak bulunmuştur.

C. glabrata izolatlarının, E-test yöntemi ile çalışılmasında flukonazol, itraconazol ve vorikonazol için elde edilen MİK noktalarında keskin sınırlar olmaması, büyük koloniden küçük koloniye geçiş ve inhibisyon elipsinin içinde veya MİK noktasında üreme yoğunluğunda azalma gibi durumlar nedeni ile değerlendirilme aşamasında zorluklar yaşanmıştır. İzolatların antifungallere karşı aktivitelerinin değerlendirilmesinde NCCLS/CLSI kriterleri ve daha önceden yapılmış olan araştırmalar ışığında aşağıda verilen MİK sınır değerleri esas alınmıştır:

- **Flukonazol:** Dirençli, ≥ 64 µg/ml
Doza bağlı duyarlı, 16-32 µg/ml
Duyarlı, ≤ 8µg/ml
- **İtraconazol:** Dirençli, ≥ 1 µg/ml
Doza bağlı duyarlı, 0,25-0,5µg/ml
Duyarlı, ≤ 0,125 µg/ml
- **Vorikonazol:** Dirençli, ≥ 8 µg/ml
Doza bağlı duyarlı 2-4 µg/ml
Duyarlı, ≤ 1 µg/ml

Çizelge 4. 1. 1. *C.glabrata*'nın klinik izolatlarına karşı AmB, VORI, ITRA,CAS, FLU 'ün E-test ve Broth mikrodilüsyon (BMD) testleri sonucunda gösterdikleri MİK değerleri (µg/ml).

İzolat	AmB	AmB	CAS	CAS	VORI	VORI	FLU	FLU	ITRA	ITRA
No	BMD	E-test	BMD	E-test	BMD	E-test	BMD	E-test	BMD	E-test
1	0,25	0,012	0,5	0,125	0,5	0,38	32	32	0,5	1,5
2	0,5	0,19	1	0,125	0,125	0,5	32	32	0,5	3
3	0,125	0,047	0,5	0,125	0,25	0,75	8	48	1	6
4	0,5	0,19	0,5	0,38	0,25	1	>64	48	1	16
5	0,125	0,125	0,5	0,25	0,5	1	16	32	0,5	8
6	0,125	0,064	0,25	0,25	2	2	>64	> 256	0,5	1,5
7	0,125	0,094	0,25	0,38	2	1,5	>64	> 256	0,25	32
8	0,125	0,032	0,25	0,5	0,25	0,38	>64	96	0,5	3
9	0,5	0,38	1	0,25	1	0,75	>64	128	0,25	0,75
10	0,125	0,032	0,25	0,38	1	1,5	32	16	0,5	32
11	0,25	0,125	1	0,38	0,5	0,5	16	16	0,5	4
12	0,25	0,125	2	0,38	2	3	32	128	0,25	4
13	0,25	0,19	0,25	0,38	1	1,5	>64	>256	0,25	1
14	0,25	0,19	0,25	0,38	1	1	>64	>256	1	4
15	0,25	0,064	1	0,5	1	1,5	8	16	0,5	6
16	0,25	0,25	0,25	0,38	1	1,5	16	48	0,25	1
17	0,125	0,094	0,5	0,75	1	3	>32	16	0,25	1,5
18	0,125	0,094	0,25	0,5	2	2	>64	6	0,25	1,5
19	0,25	0,125	0,25	0,38	1	1	>64	48	0,5	0,5
20	0,25	0,094	0,5	0,38	4	3	>64	24	4	0,75
21	0,25	0,094	0,5	1	2	4	>64	32	4	0,50
22	0,125	0,125	1	0,5	1	2	32	24	4	1,5
23	0,125	0,125	0,5	0,5	2	3	32	48	4	0,19
24	0,125	0,094	0,5	0,5	1	3	32	24	4	1
25	0,5	0,25	0,25	0,38	1	3	32	32	0,5	1
26	0,125	0,047	0,5	0,75	2	2	32	32	1	0,50
27	0,125	0,064	0,25	0,25	1	2	32	64	2	3
28	0,125	0,064	0,5	0,5	1	4	32	32	0,25	1,5
29	0,125	0,012	0,5	1	0,5	1,5	32	16	1	0,75
30	0,125	0,125	0,25	0,25	1	2	32	96	0,5	0,50
31	0,25	0,25	0,25	0,38	2	2	32	32	0,25	2
32	0,25	0,125	0,25	1,5	2	2	32	32	1	3
33	0,25	0,19	0,25	0,38	1	1,5	32	32	0,5	1
34	0,25	0,19	0,25	0,25	1	1,5	16	96	0,5	1
35	0,125	0,023	0,25	0,25	2	2	16	16	2	1
36	0,5	0,047	0,25	0,25	0,5	1,5	16	32	1	0,25
37	0,25	0,25	0,25	0,38	0,25	1,5	32	48	4	8
38	0,125	0,047	0,25	0,19	0,25	2	32	24	0,5	0,125
39	0,125	0,094	0,25	0,38	0,25	2	32	48	4	4
40	0,125	0,064	0,125	0,25	0,25	2	32	48	4	0,50
41	0,25	0,19	0,5	0,19	0,25	8	32	32	1	0,50
42	0,125	0,002	0,5	1,5	0,125	2	32	48	4	0,50
43	0,25	0,125	1	0,38	0,125	3	32	48	0,25	0,38
44	0,25	0,25	0,5	0,38	0,25	3	16	24	0,25	0,38
45	0,125	0,064	0,5	0,25	0,25	0,75	16	48	0,25	0,19
46	0,125	0,016	1	0,75	0,25	1	32	> 256	0,5	3
47	0,125	0,094	1	0,5	0,25	0,75	32	24	0,5	1
48	0,125	0,032	0,125	0,5	0,5	1	32	32	0,5	3

Çizelge 4.1.1. devam ediyor.										
49	0,125	0,047	0,125	0,125	0,125	0,75	16	48	0,5	1,5
50	0,125	0,047	1	0,5	0,25	1	32	48	0,25	6

Broth mikrodilüsyon testi ile E-test arasındaki uyum değerlendirildiğinde AmB, VORI, CAS ve FLU antifungalleri için oldukça iyi uyum gözlenmiştir. İki test arasındaki uyumun değerlendirilmesinde, referans test broth mikrodilüsyon MİK'lerinin ± 2 katlık dilüsyonu içindeki değerler uyumlu kabul edilmiştir. E-test MİK sonuçlarına göre izolatların, amfoterisin B için 43'ü (%86), flukonazol için 46'sı (%92), vorikonazol için 42'si (%84), kaspofungin için 45'i (%90) ve itrakonazol için de 29'u (%58)i broth mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerlerinin ± 2 dilüsyonu içinde yer almış ve tutarlı kabul edilmiştir.

Broth mikrodilüsyon testi sonuçları esas alınarak flukonazole karşı izolatların 11'inin dirençli, 37'sinin doza bağlı duyarlı ve 2'sinin de duyarlı bulunduğu görülmüştür. İtrakonazole karşı izolatların 19'u dirençli, 31'i doza bağlı duyarlı olarak saptanmıştır. Vorikonazole karşı da izolatların 39'u duyarlı, 11'i doza bağlı duyarlı olarak belirlenmiştir. Amfoterisin B için belirlenmiş standart bir duyarlılık değeri bulunmamakla birlikte, tüm suşlar için her iki yöntemle de MİK değerleri $1\mu\text{g/ml}$ 'nin altında bulunmuştur. İki test ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, amfoterisin B için E-test ile elde edilen MİK değerleri broth mikrodilüsyon sonuçlarına göre genel olarak daha düşük olarak bulunmuştur. Kaspofungin için de belirlenmiş bir standart duyarlılık değeri bulunmamakla birlikte, tüm suşlar için her iki yöntemle de MİK değerleri $2\mu\text{g/ml}$ 'nin altında bulunmuştur. Ayrıca flukonazole ve itrakonazole dirençli izolatların tümünün kaspofungin tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. Çizelge 4.1.2'de beş antifungalın iki farklı yöntem ile gösterdiği antifungal aktiviteler arasındaki uyum gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.2. E-test ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile 50 *C. glabrata* izolatına karşı amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin, itraconazol ve vorikonazolün antifungal aktiviteleri ($\mu\text{g/ml}$).

Antifungal ajan	Yöntem	MİK aralığı	% uyum
Amfoterisin B	BMD ^a	0.25-2 $\mu\text{g/ml}$	86
	ET ^b	0,0020-25 $\mu\text{g/ml}$,	
Flukonazol	BMD	4 - $\geq$ 64 $\mu\text{g/ml}$	92
	ET	6- $\geq$ 256 $\mu\text{g/ml}$	
Vorikonazol	BMD	4 - $\geq$ 64 $\mu\text{g/ml}$	84
	ET	0,38- 4 $\mu\text{g/ml}$,	
Kaspofungin	BMD	0,125 – 2 $\mu\text{g/ml}$	90
	ET	0,125- 1,5 $\mu\text{g/ml}$	
İtraconazol	BMD	0,125 – 2 $\mu\text{g/ml}$	58
	ET	0,125-32 $\mu\text{g/ml}$	

a; broth mikrodilüsyon, *b*; E-test

4. 2. *C.glabrata* İzolatlarının CAS+VORI, CAS+FLU, CAS+ITRA ve CAS+AmB Kombinasyonlarındaki Etkilerinin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

4. 2. 1. E-test 1 yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları

Araştırmamızda E-test-1 kombinasyonundan elde edilen sonuçlar ve belirlenen FİK indeks değerleri Çizelge 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.2.1.3 ve 4.2.1.4’de sırasıyla verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre CAS+AmB kombinasyonunda, izolatların 20’si (%40) sinerji, 29’u (%58)’ı indifference (I) etki göstermiş, 1’i (%2) antagonistik etki göstermiştir.. CAS+VORI kombinasyonunda izolatların 7’si (% 14) sinerji, 41’i (%82) indifference (I), 2’si de (% 4) antagonistik etki (A) göstermiştir. CAS+FLU kombinasyonunda izolatların tamamı (%100) antagonistik etki (A) göstermiştir. CAS+ITRA kombinasyonunun ise 13’ü (%26) indifference, 37’si (%74)’ü de antagonistik etki göstermiştir, sinerjiye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.2.1.1. CAS+AmB kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları

İzolat No	E-Test 1 CAS+AmB	Değerlendirme^b FİK İndeks^a	İzolat No	E-Test 1 CAS+AmB	Değerlendirme FİK İndeks^a
1	0,012	1,1	26	0,016	0,36
2	0,19	2,52	27	0,003	0,06
3	0,125	3,66	28	0,016	0,28
4	0,25	1,97	29	0,002	0,17
5	0,19	2,28	30	0,002	0,02
6	0,047	0,92	31	0,064	0,42
7	0,047	0,62	32	0,064	0,55
8	0,004	0,13	33	0,008	0,06
9	0,125	0,83	34	0,064	0,59
10	0,016	0,54	35	0,047	2,23
11	0,016	0,17	36	0,004	0,1
12	0,125	1,33	37	0,064	0,42
13	0,125	0,99	38	0,064	1,7
14	0,064	0,51	39	0,064	0,85
15	0,047	0,83	40	0,032	0,63
16	0,064	0,42	41	0,032	0,34
17	0,047	0,56	42	0,016	8,01
18	0,094	1,19	43	0,064	0,68
19	0,032	0,34	44	0,125	0,83
20	0,032	0,42	45	0,064	1,26
21	0,023	0,27	46	0,047	3
22	0,047	0,47	47	0,094	1,19
23	0,047	0,47	48	0,047	1,56
24	0,002	0,03	49	0,125	3,66
25	0,012	0,08	50	0,094	2,19

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, *d* sinerji, *e* antagonizma

Çizelge 4.2.1.2. CAS+VORI kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları.

izolat	E-Test 1	Değerlendirme	İzolat	E-Test 1	Değerlendirme
No	CAS+VORI	FİK İNDEKS	No	CAS+VORI	FİK İNDEKS
1	0,38	4,04	26	0,125	0,23
2	0,38	3,8	27	0,75	3,38
3	0,38	3,55	28	0,50	1,13
4	0,50	1,82	29	0,19	0,32
5	0,38	1,9	30	0,19	0,86
6	0,38	1,71	31	0,19	0,6
7	0,19	0,63	32	0,38	0,44
8	0,094	0,44	33	0,38	1,25
9	1,0	5,33	34	0,19	0,89
10	0,75	2,47	35	0,19	0,86
11	0,25	1,16	36	0,38	1,77
12	0,75	2,22	37	1,0	3,3
13	0,75	2,47	38	0,50	2,88
14	0,50	1,82	39	0,38	1,19
15	0,50	1,33	40	0,19	0,86
16	1,0	3,3	41	0,25	1,35
17	0,38	0,63	42	0,25	0,29
18	0,38	0,95	43	0,38	1,13
19	0,125	0,45	44	0,50	1,48
20	0,38	1,13	45	0,38	2,03
21	1,0	1,25	46	0,25	0,58
22	0,50	1,25	47	0,38	1,27
23	0,125	0,29	48	0,38	1,14
24	0,75	1,75	49	0,38	3,55
25	0,50	1,48	50	0,38	1,14

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, *d* sinerji, *e* antagonizma

Cizelge 4.2.1.3. CAS+FLU kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları.

İzolat	E-Test 1	Değerlendirme	İzolat	E-Test 1	Değerlendirme
No	CAS+FLU	FİK İNDEKS	No	CAS+FLU	FİK İNDEKS
1	8	64,25	26	12	16,38
2	8	64,25	27	32	128,5
3	6	48,13	28	8	16,25
4	8	21,22	29	12	12,75
5	8	32,25	30	12	48,13
6	6	24,02	31	8	21,3
7	16	42,17	32	12	8,38
8	8	16,08	33	16	42,61
9	16	64,13	34	8	32,08
10	12	32,33	35	12	48,75
11	24	64,66	36	24	96,75
12	12	31,67	37	12	31,83
13	24	63,25	38	8	42,44
14	12	31,63	39	12	31,83
15	12	24,75	40	24	96,5
16	12	31,83	41	12	63,53
17	24	33,5	42	32	22
18	16	34,67	43	12	31,83
19	8	21,22	44	16	42,77
20	8	21,39	45	8	32,17
21	12	12,38	46	12	16,05
22	8	16,33	47	12	24,5
23	8	16,17	48	24	48,75
24	32	65,33	49	6	48,13
25	16	42,61	50	8	16,17

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, *d* sinerji, *e* antagonizma

Çizelge 4.2.1.4. CAS+ITRA kombinasyonunun E-test 1 yöntemine göre sonuçları

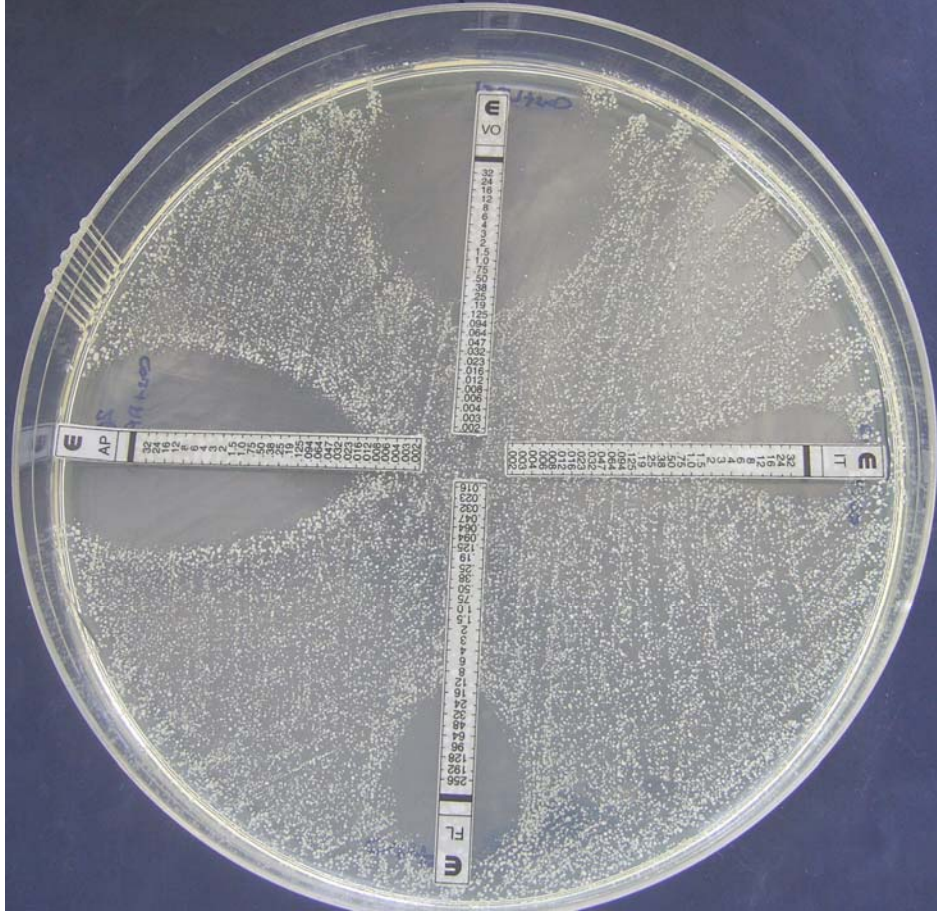
İzolat	E-Test 1	Değerlendirme	İzolat	E-Test 1	Değerlendirme
No	CAS+ITRA	FİK İNDEKS	No	CAS+ITRA	FİK İNDEKS
1	0,75	6,5	26	2	6,67
2	1,0	8,33	27	2	8,67
3	0,75	6,13	28	1,5	4
4	0,75	2,02	29	4	9,33
5	1,0	4,13	30	2	12
6	0,50	2,33	31	1,5	4,7
7	1,5	3,99	32	0,75	0,75
8	0,75	1,75	33	1,0	3,63
9	2	10,67	34	1,5	7,5
10	2	5,33	35	6	30
11	1,0	2,88	36	1,5	12
12	2	5,76	37	2	5,51
13	2	7,26	38	2	26,53
14	2	5,76	39	1,5	4,32
15	1,5	3,25	40	0,75	4,5
16	2	7,26	41	4	29,05
17	2	4	42	3	8
18	2	5,33	43	1,5	7,89
19	1,5	6,95	44	1,5	7,89
20	1,5	5,95	45	1,0	9,26
21	1,0	3	46	1,0	1,67
22	2	5,33	47	0,75	2,25
2	1,0	7,26	48	8	18,67
24	4	12	49	0,75	6,5
25	2	7,26	50	1,0	2,17

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, d sinerji, e antagonizma

Şekil 4.2.1.1.'de *C. glabrata*-26 izolatının E-test-1 metoduna göre kaspofunginle dört farklı antifungalin kombinasyonu sonucunda oluşturduğu MİK değerleri görülmektedir.



Şekil 4.2.1.1. E-test 1 metoduna göre kaspofunginin dört farklı antifungal ile *in vitro* aktivitesinin değerlendirilmesi

4.2.2. E-test-2 yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları

Araştırmamızda E-test-2 kombinasyonundan elde edilen sonuçlar ve belirlenen FİK indeks değerleri Çizelge 4.2.2.1, 4.2.2.2, 4.2.2.3 ve 4.2.2.4'de sırasıyla verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre CAS+AmB kombinasyonunda, izolatların 6'sı (%12) sinerji, 41'i (%82) indifference ve 3'ü (%6) antagonizma şeklinde tayin edilmiştir. CAS+VORI kombinasyonunun 16'sı (%32) sinerji, 34'ü (%68) indifference etki göstermiştir. CAS+FLU kombinasyonunun 1'i (%2) sinerji, 36'sı (%70) indifference etki ve 13'ü (%26) de

antagonistik etki belirirken, CAS+ITRA kombinasyonunda suşların tamamı (%100) indifference etki göstermiştir.

Çizelge 4.2.2.1. CAS+AmB kombinasyonunun E-test-2 yöntemine göre sonuçları.

İzolat No	E-Test 2 Kom. CAS-Kom. AmB	Değerlendirme FİK İNDEKS	İzolat No	E-Test 2 Kom.CAS-Kom.AmB	Değerlendirme FİK İNDEKS
1	0,064-0,08	7,18	26	0,38-0,023	1
2	0,064-0,094	1,01	27	0,125-0,047	1,23
3	0,25-0,016	2,34	28	0,125-0,032	0,75
4	0,19-0,125	1,16	29	0,50-0,006	1
5	0,125-0,094	1,25	30	0,023-0,002	0,11
6	0,094-0,023	0,74	31	0,125-0,125	0,83
7	0,125-0,047	0,83	32	0,25-0,064	0,68
8	0,38-0,023	1,48	33	0,125-0,094	0,82
9	0,094-0,19	0,88	34	0,064-0,023	0,38
10	0,25-0,016	1,16	35	0,064-0,094	4,34
11	0,125-0,047	0,7	36	0,064-0,094	2,26
12	0,125-0,032	0,58	37	0,19-0,19	1,26
13	0,094-0,047	0,49	38	0,125-0,032	1,34
14	0,125-0,064	0,67	39	0,032-0,064	0,77
15	0,25-0,023	0,86	40	0,125-0,047	1,23
16	0,125-0,125	0,83	41	0,094-0,094	0,99
17	0,38-0,047	1,01	42	0,25-0,016	8,17
18	0,19-0,047	0,88	43	0,125-0,023	0,51
19	0,125-0,032	0,58	44	0,125-0,094	0,7
20	0,125-0,023	0,57	45	0,19-0,016	1,01
21	0,125-0,023	0,37	46	0,50-0,012	1,42
22	0,19-0,064	0,89	47	0,25-0,064	1,18
23	0,125-0,023	0,43	48	0,25-0,016	1
24	0,125-0,012	0,38	49	0,094-0,032	1,43
25	0,125-0,125	0,83	50	0,25-0,032	1,18

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri-tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

Çizelge 4.2.2.2. CAS+VORI kombinasyonunun E-test-2 yöntemine göre sonuçları.

İzolot No	E-Test 2 Kom. CAS-Kom. VORI	Değerlendirme FİK İNDEKS	İzolot No	E-Test 2 Kom.CAS-Kom.VORI	Değerlendirme FİK İNDEKS
1	0,094-0,25	1,41	26	0,125-0,50	0,42
2	0,047-0,25	0,88	27	0,094-1,0	0,88
3	0,047-0,50	1,04	28	0,032-0,75	0,25
4	0,094-0,50	0,75	29	0,19-0,50	0,52
5	0,25-0,19	1,19	30	0,047-0,38	0,38
6	0,047-0,50	0,44	31	0,047-0,50	0,37
7	0,25-1,0	1,32	32	0,19-0,50	0,38
8	0,047-0,25	0,75	33	0,094-1,0	0,91
9	0,125-2	3,17	34	0,023-0,25	0,26
10	0,125-0,75	0,83	35	0,064-1,0	0,76
11	0,25-0,38	1,42	36	0,047-0,75	0,69
12	0,125-2	1	37	0,094-1,0	0,91
13	0,094-0,50	0,58	38	0,047-1,0	0,75
14	0,125-0,50	0,83	39	0,064-0,75	0,54
15	1,0-0,25	2,17	40	0,094-1,0	0,88
16	0,125-0,75	0,83	41	0,047-2	0,5
17	0,125-0,50	0,33	42	0,19-0,50	0,38
18	0,064-0,75	0,5	43	0,047-0,75	0,37
19	0,125-0,50	0,83	44	0,047-0,50	0,29
20	0,047-1,0	0,46	45	0,47-0,19	2,13
21	0,047-0,38	0,14	46	0,19-0,38	0,63
22	0,094-0,38	0,38	47	0,25-0,25	0,83
23	0,47-0,19	1	48	0,125-0,50	0,75
24	0,094-1,0	0,52	49	0,032-0,50	0,92
25	0,125-1,0	0,66	50	0,064-0,50	0,63

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks ≤ 0.5; sinerji, 0.5 < FİK indeks ≤ 4; etkisiz, 4 < FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, *d* sinerji, *e* antagonizma

Çizelge 4.2.2.3. CAS+FLU kombinasyonunun E-test-2 yöntemine göre sonuçları

İzolot No	E-Test 2 Kom. CAS- Kom. FLU	Değerlendirme FİK İNDEKS	İzolot No	E-Test 2 Kom. CAS- Kom. FLU	Değerlendirme FİK İNDEKS
1	0,12532	2	26	0,50-128	4,67
2	0.047-32	1,38	27	0,25-64	2
3	0,125-48	2	28	0,5-32	2
4	0,25-128	3,32	29	0,25-64	4,25
5	0,25-32	2	30	0,25-96	2
6	0,19-28	0,87	31	0,25-192	6,66
7	0,38-256	2	32	0,25-128	4,17
8	0,125-12	0,38	33	0,25-48	2,16
9	0,25-128	2	34	0,19-128	2,09
10	0,125-12	1,08	35	0,19-192	12,76
11	0,38-16	2	36	0,125-128	4,5
12	0,38-128	2	37	0,19-128	3,17
13	0,38->256	2	38	0,094-48	2,49
14	0,19-128	1	39	0,094-128	2,91
15	0,125-16	1,25	40	0,19-96	2,76
16	0,19-128	3,17	41	0,19-32	2
17	0,25-96	6,33	42	0,38-32	0,92
18	0,25-128	21,83	43	0,125-128	3
19	0,25-192	4,66	44	0,125-128	5,66
20	0,25-24	1,66	45	0,094-24	0,88
21	0,50-128	4,5	46	0,25-64	0,58
22	0,25-128	5,83	47	0,25-12	1
23	0,5-48	2	48	0,5-32	2
24	0,19-128	5,71	49	0,125-48	2
25	0,25-48	2,16	50	0,19-16	0,71

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, *d* sinerji, *e* antagonizma

Çizelge 4.2.2.4. CAS+ITRA kombinasyonunun E-test-2 yöntemine göre sonuçları.

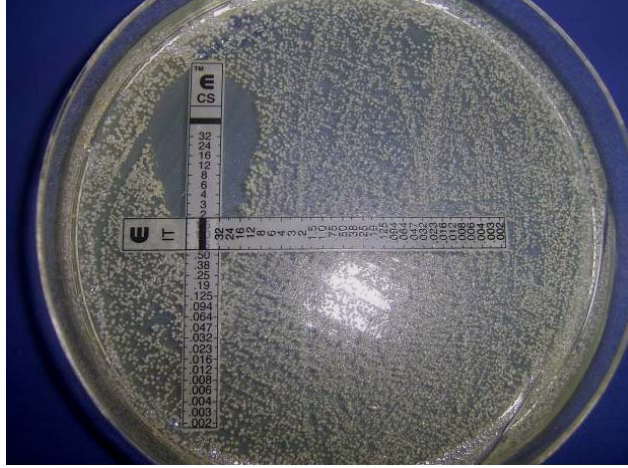
İzolat No	E-Test 2 Kom.CAS Kom.İTRA	Değerlendirme FİK İNDEKS	İzolat No	E-Test 2 Kom.CAS Kom.İTRA	Değerlendirme FİK İNDEKS
1	0,125-1	1,67	26	0,50-0,50	1,67
2	0,125-2	1,67	27	0,25-2	1,67
3	0,125-4	1,67	28	0,25-1,5	1,5
4	0,25-8	1,16	29	0,5-0,75	1,5
5	0,25-4	1,5	30	0,25-0,50	2
6	0,38-1	2,19	31	0,38-1	1,5
7	0,38-16	1,5	32	0,38-2	0,92
8	0,38-3	1,76	33	0,25-1	1,66
9	0,25-0,50	1,67	34	0,25-1	2
10	0,38-16	1,5	35	0,25-0,5	1,5
11	0,38-2	1,5	36	0,25-0,25	2
12	0,25-2	1,16	37	0,25-6	1,41
13	0,38-0,75	1,75	38	0,19-0,125	2
14	0,38-2	1,5	39	0,38-2	1,5
15	0,38-4	1,43	40	0,19-0,50	1,76
16	0,38-1	2	41	0,19-0,50	2
17	0,38-1	1,17	42	0,38-0,50	1,25
18	0,38-1	1,43	43	0,38-0,38	2
19	0,25-0,38	1,42	44	0,25-0,38	1,66
20	0,25-0,50	1,32	45	0,25-0,19	2
21	0,75-0,50	1,75	46	0,38-2	1,17
22	0,25-2	1,83	47	0,5-1	2
23	0,38-0,19	1,76	48	0,38-3	1,76
24	0,25-0,5	1	49	0,125-1,5	2
25	0,25-1	1,66	50	0,38-4	1,43

a FİK indeks=FİK CAS+ FİK AmB; FİK= ilacın kombinasyondaki MİK değeri/tek başına MİK değeri

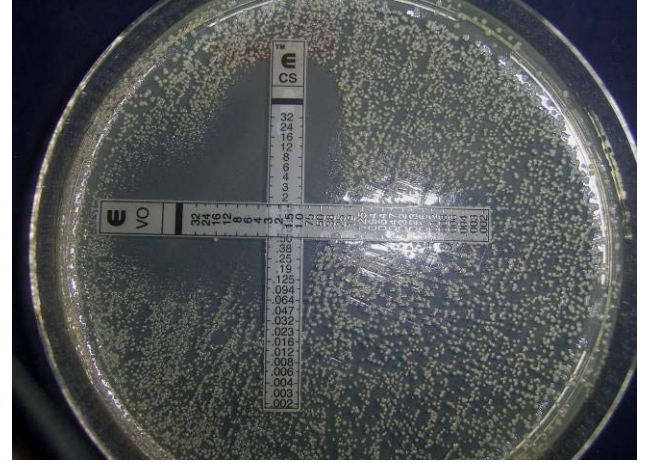
b FİK indeks≤ 0.5; sinerji, 0.5<FİK indeks≤4; etkisiz, 4< FİK indeks; antagonizma (Mukherjee, et al., 2005).

c Etkisiz, d sinerji, e antagonizma

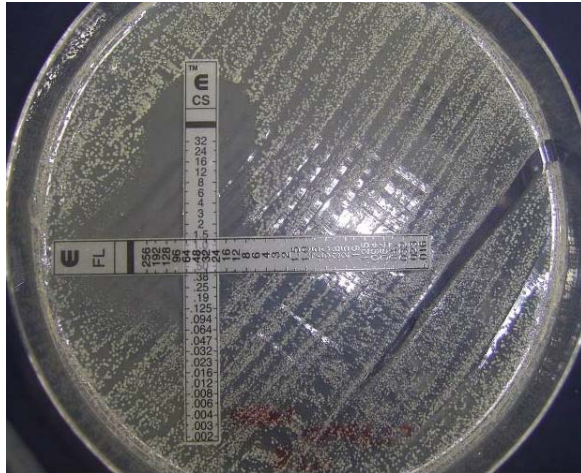
Şekil 4.2.2.1’de E-test-2 metoduna göre kaspofungin dört farklı antifungalle kombinasyonu görülmektedir.



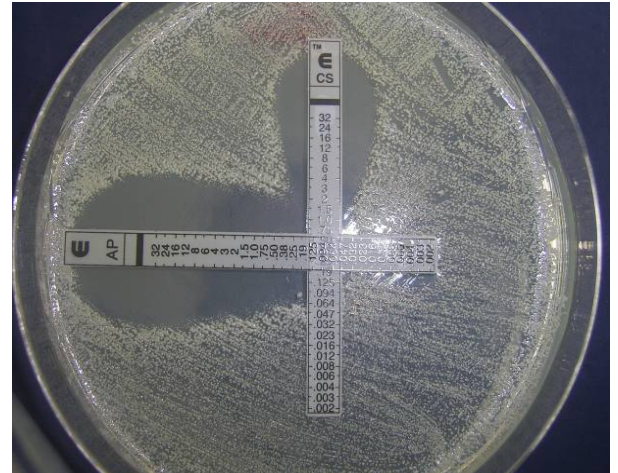
(a) CAS+ITRA



(b) CAS+VORI



(c) CAS+FLU



(d) CAS+AmB

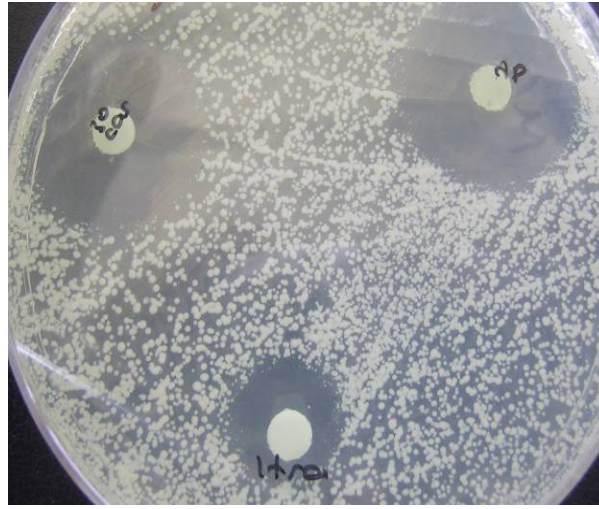
Şekil 4.2.1.2. E-test 2 metoduna göre kaspofunginin diğer antifungallerle kombinasyonu

a. CAS+ITRA b. CAS+VORI c. CAS+AmB d. CAS+FLU

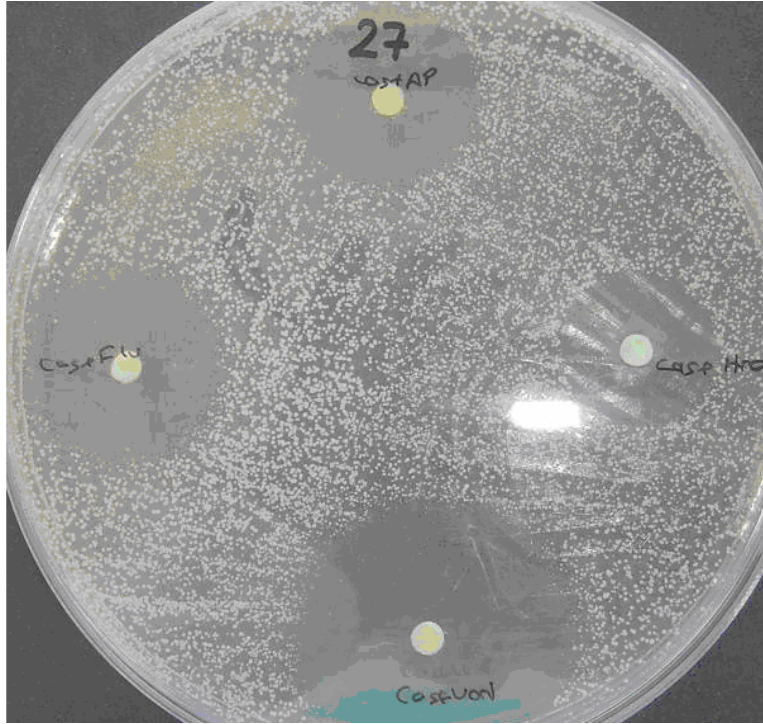
4. 2. 3. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları

Kaspofungin 4 farklı kombinasyonunun disk difüzyon yöntemi ile *in vitro* etkilerini değerlendirmede ilk aşamada farklı antifungalleri içeren diskler hazırlanarak izolatların her birinin tek başlarına oluşturdukları zon çapları belirlenmiştir (Şekil 4.2.3.1.). Bir sonraki aşamada ise antifungallerin kaspofungin ile kombine kullanımda oluşturdukları zon çapları

belirlenmiştir. Araştırmamızda kombinasyon testinde elde edilen zon çapları, ilaçların tek başına gösterdiği zon çaplarından genel olarak daha büyük bulunmuştur (Tablo 4.2.3.1.). Kombine kullanımda en kuvvetli antifungal aktiviteyi CAS+AmB ve CAS+VORI, en düşük antifungal aktiviteyi ise CAS+ITRA göstermiştir. Zon çapları ölçülürken AmB ve CAS için %100'lük inhibisyon, diğer antifungaller için ise %80 inhibisyon esas alınmıştır. Zon kenarındaki ya da içindeki mikrokoloniler dikkate alınmamıştır.



Şekil 4.2.3.1. a. *C.glabrata*-30 izolatının CAS,AmB ve ITRA antifungallerine karşı *in vitro* etkilerinin disk difüzyon testi ile gösterilmesi.



Şekil 4.2.3.1.b *C. glabrata*-27 izolatının CAS'in dört farklı antifungalle kombinasyonunun disk difüzyon yöntemi ile gösterilmesi

Çizelge 4.2.3.1. *C. glabrata*'nın 50 izolatına karşı CAS, FLU, ITRA, VORI ve AmB'nin *in vitro* aktivitelerinin tek başlarına ve kombine kullanımda disk difüzyon yöntemi ile oluşturduğu zon çapları (mm).

İzolat no	CAS	FLU	VORI	ITRA	AmB	CAS+ FLU	CAS+ VORI	CAS+ ITRA	CAS+ AmB
1	25	25	26	17	7	30	41	28	48
2	26	20	27	12	24	30	36	27	32
3	23	23	24	8	20	31	28	30	31
4	33	30	30	7	20	30	37	29	30
5	28	21	20	9	20	32	35	28	31
6	26	33	35	13	26	29	41	29	36
7	25	21	25	9	24	29	41	25	29
8	27	20	22	8	24	30	33	28	31
9	21	17	20	13	13	30	37	29	30
10	88	21	21	8	18	30	34	28	32
11	18	30	30	9	7	31	33	27	30
12	25	30	25	11	11	30	36	30	29
13	23	28	30	16	23	30	42	29	27
14	21	30	27	10	23	35	42	30	31
15	23	31	30	8	25	30	36	28	36
16	26	21	30	9	22	30	33	29	28

Çizelge 4.2.3.1. devam ediyor.									
17	23	20	30	16	25	31	51	28	40
18	23	21	31	17	23	31	47	28	32
19	25	20	25	17	21	30	40	29	27
20	21	21	23	14	24	30	35	27	28
21	31	18	25	10	30	27	31	26	30
22	23	17	20	17	21	26	33	28	30
23	21	25	30	29	25	29	40	33	31
24	23	20	21	17	24	30	34	27	32
25	26	21	25	18	22	31	41	25	28
26	23	23	23	24	29	31	49	25	30
27	23	30	30	12	25	30	43	26	29
28	26	20	20	25	25	30	42	28	30
29	27	25	25	28	26	34	42	30	29
30	24	23	23	12	23	35	38	25	28
31	22	21	22	19	19	40	50	26	30
32	25	21	22	17	23	31	43	28	29
33	25	20	20	17	23	32	51	27	25
34	25	26	26	19	25	35	51	27	31
35	23	27	27	23	27	32	42	30	27
36	25	20	20	26	25	29	41	27	28
37	27	21	21	21	27	33	41	28	29
38	25	17	17	20	22	36	50	39	30
39	27	26	26	22	21	42	52	25	28
40	22	20	20	19	23	36	46	28	29
41	22	23	23	25	24	32	39	30	28
42	24	20	20	25	25	36	45	23	29
43	25	25	25	23	23	38	46	25	26
44	24	22	22	20	22	35	50	20	29
45	24	25	25	21	23	28	52	25	8
46	24	21	21	21	25	40	45	27	30
47	27	21	22	23	24	40	50	27	29
48	29	21	22	20	24	35	42	27	29
49	23	20	20	18	22	40	50	29	30
50	23	30	30	19	24	41	45	30	30

Antifungallerin tek başlarına oluşturdukları zon çaplarına karşılık gelen MİK değerlerinin belirlenmesinde aşağıdaki tablodan yararlanılmıştır.

Çizelge 4.2.3.2. Antifungallerin disk difüzyon metoduna göre oluşturdukları zon çapları ve MİK değerleri (Online: www.mycology.org).

Antifungal	Zon çapı	MİK
<u>AmfoterisinB</u>	(10µg)	
Duyarlı	>15 mm.	<1 mg-ml.
Ortaderecede	10-14 mm.	2 mg-ml.
Dirençli	Zon yok	>4mg-ml.
<u>İtrakonazol</u>	(8 µg)	
Duyarlı	>16 mm.	<0.125 mg-ml.
Ortaderecede	10-15 mm.	0.25-0.5 mg-ml.
Dirençli	<9 mm.	>1 mg-ml.
<u>Flukonazol</u>	(25 µg)	
Duyarlı	>22 mm.	<8.0 mg-ml.
Orta derecede	15-21 mm.	16-32 mg-ml.
Dirençli	<14 mm.	>64 mg-ml.
<u>Vorikonazol</u>	(1 µg)	
Duyarlı	>14 mm	<1.0 mg-ml.

Araştırmamızda çalışılan izolatların tümü VORI'e duyarlı olarak bulunmuştur. AmB'ye 3 (%60) izolat orta derecede duyarlı, diğer 47 (%94) izolat duyarlı olarak bulunmuştur. İzolatların 9 (%18)'u ITRA'e dirençli, 9 (%18)'u orta derecede duyarlı ve 32 (%64)'si de duyarlı olarak bulunmuştur. FLU'e ise izolatların 29(%58)'u orta derecede duyarlı, 21(%42)'i ise duyarlı olarak bulunmuştur. Kaspofungin için ise henüz bir standardizasyon geliştirilmemiş olmakla beraber çalışmamızda kaspofungin kuvvetli bir antifungal etki göstermiştir.

Daha sonra iki ilaç arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için test edilen izolatın yayıldığı plağa A ve B ilaçlarını birlikte içeren diskler yerleştirilmiş ve aradaki mesafe ilaçların tek başlarına test edildiklerinde elde edilen inhibisyon zonlarının yarıçapları toplamı kadar olacak şekilde ayarlanmıştır (r). Plâğın alt kısmına da aralarında bu mesafenin yarısı kadar uzaklıkta olan iki disk yerleştirilmiştir (r/2). Değerlendirmede diskler arası mesafe değişebilmekle birlikte, sinerjistik etkileşimde iki ilacın inhibisyon zonlarının birleştiği alanda köprüleşme ya da genişleme, antagonistik kombinasyonda ise iki ilacın inhibisyon zonlarının birleşme yeri yakınındaki alanda inhibisyon zonlarında kesilme olup olmadığına bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, diskler arası mesafe (r) kadar alındığında, CAS+AmB kombinasyonunda 4 (%8) izolat sinerji, 46 (%92) izolat indifference etki göstermiş; CAS+VORI kombinasyonunda izolatların 11'i (%22) sinerji, 39'u (%78) ise indifference etki göstermiştir. CAS+FLU kombinasyonunda ise 10 (%20) izolat sinerji, 40 (%80) izolat ise indifference etki göstermiştir. CAS+ITRA kombinasyonu için izolatların 8'i (%16) sinerji, 42'si (%84) ise indifference olarak bulunmuştur. Diskler arası mesafe (r/2) kadar alındığında ise CAS+AmB kombinasyonunda 8 (%16) izolat indifference, 42 (%84) izolat sinerjik etki gösterirken, diğer tüm kombinasyonlar sinerji ile sonuçlanmıştır.

Çizelge 4.2.3.3'de CAS'in, *C. glabrata* izolatlarına karşı VORI, ITRA, AmB ve FLU ile kombinasyonundaki *in vitro* etkileri gösterilmiştir. Kombinasyonda diskler arası mesafeler sırasıyla önce (r) ve sonra (r/2) olarak alınmıştır.

Çizelge 4.2.3.3. CAS'in, *C. glabrata*'nın 50 izolatına karşı VORI, ITRA, AmB ve FLU ile kombinasyonundaki *in vitro* aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırılması.

İzolat no	CAS+ VORI (r)	CAS+ ITRA (r)	CAS+ AmB (r)	CAS+ FLU (r)	CAS+ VORI (r/2)	CAS+ ITRA (r/2)	CAS+ AmB (r/2)	CAS+ FLU (r/2)
1	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
2	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
3	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
4	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
5	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
6	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
7	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)
8	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)
9	(I)	(I)	(S)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
10	(I)	(S)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
11	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
12	(I)	(I)	(S)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
13	(I)	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
14	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)
15	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)
16	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
17	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(I)	(S)
18	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(I)	(S)
19	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(I)	(S)
20	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(I)	(S)
21	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
22	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
23	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
24	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
25	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
26	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)

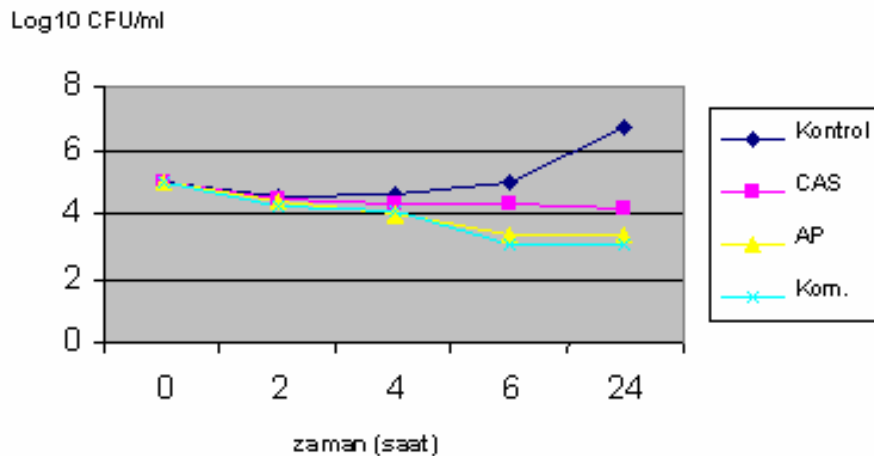
Çizelge 4.2.3.3. devam ediyor.								
27	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
28	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
29	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
30	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
31	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
32	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
33	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
34	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
35	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
36	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
37	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
38	(I)	(I)	(S)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
39	(S)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
40	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
41	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
42	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
43	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
44	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
45	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
46	(S)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
47	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
48	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
49	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)
50	(I)	(I)	(I)	(I)	(S)	(S)	(S)	(S)



Şekil 4.2.3.2. *C. glabrata*-49 no'lu izolatının disk difüzyon yöntemi ile CAS+AmB'ye karşı *in vitro* aktivitesi.

4.2.4. Time-kill yöntemi ile antifungal kombinasyon çalışması sonuçları

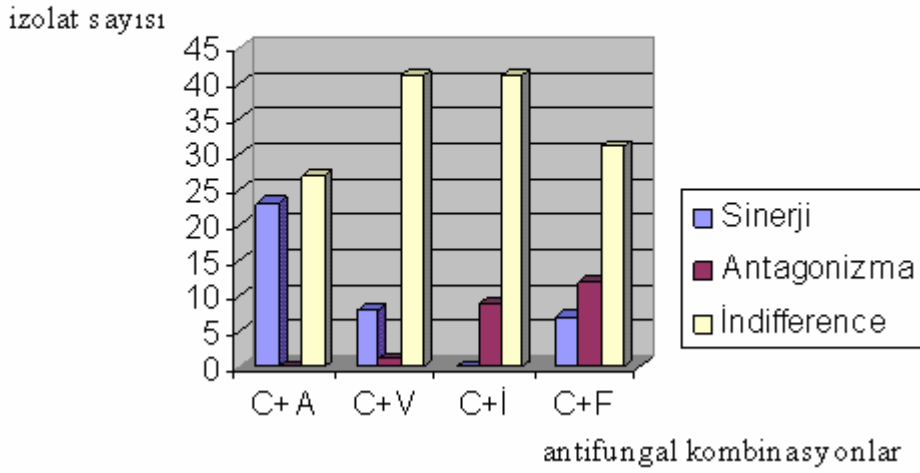
Time-kill çalışmalarında ilaçlar tek başına ve kombinasyonda 1x MİK değerinde çalışılmıştır. Koloni sayısı 0, 2, 6 ve 24. saatlerde tespit edilmiştir. Başlangıçtaki inokulum ile karşılaştırıldığında, her ml'de < %99,9 bir CFU sayısına ulaşılması fungisidal aktivite olarak kabul edilmiştir. Time-kill metodunda kaspofungin ile amfoterisin B kombinasyonlarının hiçbirisi antagonizma göstermemiştir. Şekil 4.2.4.1'te *C. glabrata*-11 izolatının CAS+AmB kombinasyonu ile etkilerinin zaman ölüm eğrisi sonuçları görülmektedir. Buna göre en aktif tek antimikrobiyal ajanın (AmB) etkisiyle kombinasyonun etkisi karşılaştırıldığında 10 kattan daha az bir değişim görülmektedir. Bu etkileşim de indifference olarak tanımlanmıştır. İndifference etki gösteren kombinasyonların hiçbirisi log-1,5'luk bir azalmadan daha fazlasını göstermemişlerdir.



Şekil 4.2.4.1. *C. glabrata* -10 izolatının CAS+AmB kombinasyonu ile etkilerinin Time kill metodu ile etkisi

Araştırmamızda CAS+AmB kombinasyonunda izolatların 23'ü (%46) sinerji, 27'si (%54) indifference etki göstermiştir. CAS+VORI kombinasyonunda izolatların 8'i (%16) sinerji, 41'i (%82) indifference etki ve 1'i (%2) antagonizma göstermiştir. CAS+FLU kombinasyonunda izolatların 7'si (%14) sinerji, 31'i (%62) indifference etki, 12'si (%24) antagonizma göstermiştir. CAS+ITRA kombinasyonunda da izolatların 41'i indifference (%82), 9'u (%18) antagonizma göstermiştir (Çizelge 4.2.4.2, Şekil 4.2.4.2.).

50 klinik *C. glabrata* izolatının time-kill kombinasyonu sonuçları



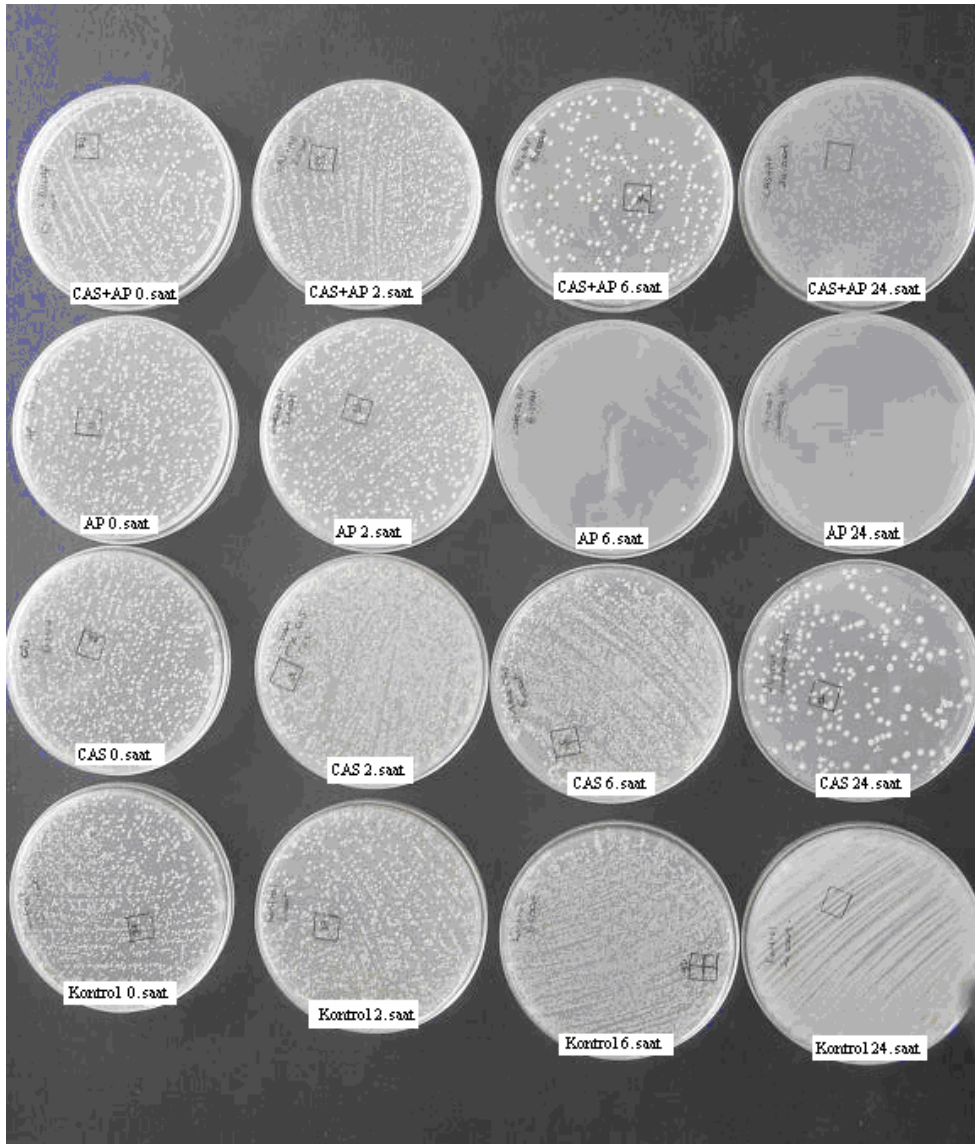
Şekil 4.2.4.2. Klinik *C. glabrata* izolatlarının Time-Kill kombinasyon testi sonuçlarına göre karşılaştırılması, (I), indifference etki; (A), antagonizma; (S),sinerji

Çizelge 4.2.4.2. *C. glabrata* izolatlarının Time-Kill kombinasyonu sonuçları.(I), indifference etki; (A), antagonizma; (S),sinerji.

İzolot	CAS+VORI	CAS+AmB	CAS+FLU	CAS+ITRA
No	Değerlendirme	Değerlendirme	Değerlendirme	Değerlendirme
1	I	I	I	I
2	I	I	I	I
3	I	I	I	I
4	I	I	I	I
5	I	I	I	I
6	I	I	I	I
7	I	I	I	I
8	S	S	S	I
9	A	S	S	I
10	I	I	I	I
11	I	S	S	I
12	I	S	S	I
13	I	I	I	I
14	I	I	I	I
15	I	I	I	I
16	I	S	I	A
17	I	I	A	A
18	I	I	A	I

Çizelge 4.2.4.2. devam ediyor.				
19	S	S	I	I
20	I	S	I	I
21	I	S	A	I
22	I	S	A	I
23	S	S	I	A
24	I	S	A	I
25	I	S	S	I
26	S	S	A	I
27	I	S	S	I
28	I	S	S	I
29	S	S	A	I
30	I	S	I	I
31	I	S	A	I
32	S	I	A	I
33	I	S	I	I
34	I	I	I	I
35	I	I	A	A
36	I	S	A	A
37	I	S	I	I
38	I	S	I	A
39	I	I	I	I
40	I	I	I	I
41	I	S	I	A
42	S	I	I	A
43	I	I	I	I
44	S	I	A	I
45	I	I	I	A
46	I	I	I	I
47	I	I	I	I
48	I	I	I	I
49	I	I	I	I
50	I	I	I	I

Şekil 4.2.4.3’de *C. glabrata*-11 izolatının Time-Kill sonuçları verilmiştir. 1. sütunda 0, 2, 6, 24. saatlerde kontrolün üremesi ile ikinci sütunda tek başına CAS, üçüncü sütunda tek başına AmB ve dördüncü sütunda CAS+AmB’nin kombine kullanımının zamana göre etkisi görülmektedir. Çalışma sonucunda plaklarda birkaç yerden 1mm’lik alanlar seçilerek koloni sayımları yapılmış ve tüm plaktaki koloni sayıları hesaplanmış ve logaritmik olarak grafiğe dökülmüştür.



Şekil 4.2.4.3. *C. glabrata*-10 no'lu izolatın CAS+AmB kombinasyonu sonuçları.

Çizelge 4.2.4.3.'de Kaspofunginin *C. glabrata* izolatlarına karşı FLU, ITRA, AmB ve VORI ile kombinasyonlarının time-kill, disk difüzyon ve E test yöntemi sonuçları görülmektedir

Çizelge 4.2.4.3. Kaspofunginin *C. glabrata* izolatlarına karşı FLU, ITRA, AmB ve VORI ile kombinasyonlarının time-kill, disk difüzyon ve E test yöntemi sonuçları

CAS+AP	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma
E test 1	20	29	1
E test 2	6	41	3
Disk difüzyon	4	46	-
Time kill	23	27	-
CAS+VORI	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma
E test 1	7	41	2
E test 2	16	34	-
Disk difüzyon	11	39	-
Time kill	8	41	1
CAS+FLU	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma
E test 1	-	-	50
E test 2	1	36	13
Disk difüzyon	10	40	-
Time kill	7	31	12
CAS+İTRA	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma
E test 1	-	13	37
E test 2	-	50	-
Disk difüzyon	8	42	-
Time kill	-	41	9

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yeni antifungal ilaçların gelişmesi, profilakside daha agresif yaklaşımları kolaylaştırmış ve fungal infeksiyonların tedavisinde endişe duyulan dirençli organizmaların ortaya çıkışına neden olmuştur (Canuto and Rodero, 2002). Son yıllarda yapılan araştırmalar, fungemilerde *C. albicans* izolatlarının sıklığının sabit kaldığını ve azol duyarlılığında bir farklılık olmadığını gösterirken, azollere duyarlılığı azalmış dirençli mantarlarda, özellikle de flukonazole dirençli *Candida* türlerine bağlı infeksiyonlarda önemli bir artış olduğunu doğrulamaktadır (Maenza, et al., 1998).

C. glabrata son yıllarda yüzeysel ve derin infeksiyonlarda önemli rol oynayan bir patojen durumuna gelmiştir. *C. glabrata*'nın yol açtığı sistemik infeksiyonlar yüksek bir mortalite ile karakterizedir ve bu türün azol grubu ilaçlara, özellikle de flukonazole karşı azalan duyarlılığı olması tedavisini zorlaştırmaktadır. Yeni bir ekinokandin bileşiği olan kaspofungin, *Candida* türlerine karşı potansiyel bir fungisidal etki göstermekte ve AmB deoksikolattan daha iyi tolere edilmektedir (Barchiesi, et al., 2005).

Kaspofungin, bir fungal hücre duvarı komponenti olan β (1,3) D-glukan üzerine etkilidir. Polyen ya da azol grubu ilaçlar ise doğrudan ya da dolaylı olarak hücre membranı üzerine etkilidirler. Araştırmamızda kaspofungin temel antifungal olarak alınmış, farklı hedefleri içeren ilaçların kombine kullanımlarının *C. glabrata*'ya karşı azalmış bir toksisite de göstererek etkili olabileceği düşünülmüştür.

Araştırmamızda ilk olarak 50 klinik *C. glabrata* izolatının broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemleriyle antifungal duyarlılıkları saptanmış, iki test arasındaki uyum belirlenmiştir.

C. glabrata suşlarının duyarlılığını saptamada broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri arasındaki uyum amfoterisin B için %86, flukonazol için %92, vorikonazol için %84, itraconazol için %58 ve kaspofungin için %90 olarak hesaplanmıştır. Yine araştırmamızda flukonazol ve itraconazole dirençli izolatların tümü kaspofungine duyarlı olarak bulunmuştur. Kaspofungin E-test henüz sadece araştırma amaçlı olarak kullanılmakta olup, çalışmamızda broth mikrodilüsyon testleri ile iyi bir korelasyon göstermiştir. Bu nedenle duyarlılık testlerinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Yücesoy ve arkadaşları 77 *C. albicans* izolatı ile yaptıkları çalışmada 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda, görsel ve spektrofotometrik olarak değerlendirdikleri mikrodilüsyon

yöntemini E-test yöntemi ile karşılaştırmışlardır. 48 saatlik inkübasyon ve görsel değerlendirme kriterlerine göre flukonazol için %80.0 ve amfoterisin B için %93.5 uyum saptamışlardır (Yücesoy, vd., 2001).

Beth ve arkadaşlarının 944 *Candida* izolatı ile ilgili yaptıkları bir çalışmada çalışılan 229 *C. glabrata* izolatının flukonazol ve itrakonazol duyarlılıkları araştırılmış ve 48 saatlik inkübasyonda MİK aralığı flukonazol için 1->64µg-ml, itrakonazol için 0.06->8µg-ml olarak bildirmişlerdir (Beth, et al., 2002).

Sewell ve arkadaşlarının 41 *Candida* türü ile yaptıkları çalışmada mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile elde edilen MİK aralığı flukonazol için sırasıyla 2.0-128µg-ml ve 0.12->256µg-ml şeklinde bulunmuştur (Sewell, et al., 1994).

Cheng ve arkadaşları 1996-1994 yılları arasında kandidemiye yol açan *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıkları ve dağılımlarını araştırmışlardır. Kandan izole edilen 383 *Candida* türünde, 20 *C. glabrata* türünün amfoterisin B MİK değeri 0,5-2 µg-ml olarak bulunmuş, flukonazol MİK değeri ise 2-128µg-ml değeri arasında bulunmuştur (Cheng, et al, 2004).

Pfaller ve arkadaşlarının 726 *Candida türü* ile yaptıkları bir araştırmada E-test metodu ile kaspofungin duyarlılıkları araştırılmış, sonuçlar broth mikrodilüsyon duyarlılıkları ile karşılaştırılmıştır. E-test MİK değerlerinin bazı suşlarda daha düşük olduğu belirtilmekle beraber kaspofungin duyarlılıklarının saptanmasında E-test kullanımının faydalı olabileceği açıklanmıştır. Çalışmada E-test, RPMI-1640 ve Antibiotic Medium-3 besiyerleri kullanılarak karşılaştırmalı çalışılmış, RPMI-1640 ile elde edilen sonuçlar referans broth mikrodilüsyon MİK'leriyle mükemmel bir uyum göstermiştir (Pfaller, et. al., 2001).

Yine Pfaller ve arkadaşlarının 312 *Candida* izolatına karşı vorikonazol duyarlılıklarının broth mikrodilüsyon ve 3 farklı besiyeri kullanılarak E-test yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada 55 *C. glabrata* izolatının referans broth mikrodilüsyon MİK aralığı 0.015-8.0 µg-ml olarak tespit edilmiştir. E-test yöntemi RPMI-1640, Antibiotic Medium-3 ve Casitone Agar besiyerleri kullanılarak çalışılmış, sonuçlar referans broth mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırıldığında RPMI-1640 (%91), CAS (%87), AM-3 (%58) uyum göstermiştir (Pfaller, et al., 2000).

Chryssanthou ve Manuel Cuenca-Estrella 102 *Candida türü* ve *Saccharomyces cerevisiae* örneği kullanarak vorikonazol ve kaspofungin duyarlılıklarını E-test ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlemiş, iki test arasında vorikonazol için %100, kaspofungin için %89 uyum belirlemişlerdir (Chryssanthou and Cuenca-Estrella, 2002).

Maxwell ve arkadaşları kandan nadiren izole edilen 279 *Candida* suşu için flukonazol ve vorikonazol MİK değerlerini saptamada E-test yöntemini değerlendirdikleri çalışmalarında, E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyumu suşların büyük kısmında flukonazol için > %97 ve vorikonazol için > %99 olarak bildirmişlerdir (Maxwell et al., 2003). Barry ve arkadaşları 495 sık izole edilen *Candida* suşunun flukonazole duyarlılık testlerinde E-test ve broth mikrodilüsyon yöntemi arasında %96 tutarlılık saptamışlardır (Barry, et al., 2002).

Pfaller ve arkadaşları, 601 invaziv *C. glabrata* izolatının antifungal duyarlılıkları ve coğrafik lokasyonları ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, izolatların %90'ı CAS'e duyarlı bulunmuş ve MİK değerleri ortalama 0,12 µg µg/ml şeklinde görülmüştür. Çalışılan tüm coğrafik bölgelerde en aktif ajanlar kaspofungin ve flusitozin olarak saptanmıştır. Çalışmada flukonazole dirençli 46 izolatın tümü kaspofungine karşı duyarlı bulunmuş ve bu izolatlar posakonazol, ravukonazol ve vorikonazole değişebilen oranlarda direnç göstermişlerdir (Pfaller, et al., 2004).

Maxwell ve arkadaşları *Cryptococcus neoformans* izolatlarını kullandıkları bir çalışmada iki test arasındaki uyumu vorikonazol için %94 ve amfoterisin B için %99 bildirmişlerdir (Maxwell, et al., 2003). Koç ve arkadaşları broth mikrodilüsyon ve E-test yöntemini karşılaştırmak için amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol gibi dört antifungal ajan ile yaptıkları çalışmalarında testler arası uyumu amfoterisin B için %93.1 ve flukonazol için %79.4 bulmuşlardır (Koç, et al., 2000).

Kronvall and Karlsson, 114 klinik *Candida* izolatının flukonazol ve vorikonazol duyarlılıkları ile ilgili yaptıkları araştırmada E-test ve disk difüzyon metodlarını kullanmışlar, tüm suşların vorikonazole duyarlı olduklarını ve *C. glabrata* ve *C. krusei* haricindeki çoğu izolatında flukonazole duyarlı olduklarını bulmuşlardır. 19 *C. glabrata* izolatının flukonazol duyarlılıkları 2-32 µg/ml arasında, vorikonazol duyarlılıkları ise 0,125-2 µg/ml arasında bulunmuştur (Kronvall and Karlsson, 2001).

7837 *Candida* örneği ile yapılan bir çalışmada izolatların 351'inin (flukonazol MİK $\geq$ 64 μ g/ml) dirençli olduğu saptanmış ve bu sayının toplam izolat sayısının %4'ünü oluşturduğu belirtilmiştir. Flukonazole dirençli izolatların tümü kaspofungin tarafından inhibe edilmiştir (Pfaller, et al., 2003). Bizim çalışmamızda da flukonazole dirençli izolatların tümünün kaspofungin tarafından inhibe edildiği görülmüştür.

Pfaller ve arkadaşları 402 maya izolatının flukonazol duyarlılığını broth mikrodilüsyon metod ve E-test ile araştırmışlardır. Çalışmada üç farklı besiyeri kullanılmış; E-test metodu için RPG (RPMI-1640) ve CAS (Casitone Agar) besiyerleri referans metodla iyi bir korelasyon göstermiş, MHA (Mueller Hinton Agar) besiyeri ise daha zayıf sonuçlar vermiştir (Pfaller, et al., 1998).

159 klinik ve 12 referans maya izolatu ile yapılan bir çalışmada *C. glabrata* izolatlarının flukonazol duyarlılıkları 2-16 μ g/ml oranlarında, itrakonazol duyarlılıkları ise 0,06-2 μ g/ml arasında değişmiştir (Nenoff, et al., 1999).

Çalışmamıza alınan *C. glabrata* suşlarının MİK değeri aralıkları sırasıyla broth mikrodilüsyon testlerinde MİK değerleri amfoterisin B için 0.125-0,5 μ g/ml, flukonazol için 8 - $\geq$ 64 μ g/ml, vorikonazol için 0,125-4 μ g/ml , kaspofungin için 0,125-2 μ g-ml ve itrakonazol için 0,25-4 μ g/ml arasında değişmiştir. E-test yöntemi ile elde edilen MİK değerleri ise amfoterisin B için 0,002-0,25 μ g-ml, flukonazol için 6- $>$ 256 μ g/ml, vorikonazol için 0,38- 4 μ g/ml, kaspofungin için 0,125- 1,5 μ g/ml ve itrakonazol için 0,125-32 μ g/ml olarak saptanmıştır.

1994-1998 yılları arasında İsveç'te yapılan bir çalışmada 233 kan örneğinden alınan *Candida* izolatlarında antifungal duyarlılık araştırılmıştır. NCCLS/CLSI ve E test metodları arasındaki uyum Amfoterisin B, flusitozin ve flukonazol için oldukça iyi sonuçlar verirken, itrakonazol uyumu % 66 olarak bulunmuştur (Chrysanthou, 2001).

Yukarıda verilen çalışmaların tümü ile bizim çalışmamızın sonuçları arasında benzerlik mevcuttur ve her iki test arasındaki tutarlılık oranları oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Bu sonuçların ışığında, uygulaması kolay ve pratik bir yöntem olan E-test yönteminin, antifungal duyarlılığın saptanmasında broth mikrodilüsyon yöntemine alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

Antifungal duyarlılığı saptamada standardize edilmiş yöntemler bulunmasına rağmen, antifungal kombinasyonların etkinliğini değerlendirmedeki yöntemler hala yetersizdir. Antifungal kombinasyonları test etmek için en sık kullanılan iki yöntem checkerboard ve time-kill testleridir. En iyi yöntemi saptamak için yapılmış az sayıda karşılaştırmalı çalışma mevcuttur . Bu yöntemlere son zamanlarda E-test yöntemi eklenmiştir. Kombinasyon tedavisi ile ilgili yayınlanan sonuçlar genellikle iki ilaç kombinasyonuna odaklanmıştır. *In vitro* ilaç etkileşimini gösteren çalışmalar, ilaçların *in vivo* etkilerini yansıtmayabilir. Çünkü bu çalışmalar, tek bir zaman noktasında ve sabit ilaç konsantrasyonlarında yapılmaktadır.

Son yıllarda invaziv infeksiyonların tedavisi için kombinasyon tedavisi sıkça kullanılmaktadır. Ancak konuyla ilgili *in vitro* çalışmalar, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Klinik denemelerden alınan sonuçlar, kombinasyon tedavisinin çoklu dirençli mantarların yol açtığı invaziv infeksiyonlar için monoterapiye bir alternatif olabileceğini desteklemektedir. Özellikle de monoterapiye olumsuz cevap veren hastalarda daha etkili olmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı bu konuda ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Kombinasyon tedavisinin tek ilaçla tedavi ile (monoterapi) karşılaştırıldığı klinik denemelere bakıldığında, sınırlı sayıda kombinasyonların bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda kombinasyon tedavisi monoterapi ile karşılaştırıldığında ya benzer sonuçlar alınmış ya da daha etkili sonuçlar elde edilmiştir. Kriptokokkal menenjit hariç olmak üzere, uygulanan kombinasyonların hiçbirinin tek ilaçla tedaviye göre açıkça üstün olmadığı saptanmıştır.

Canton ve arkadaşları 20 *Candida* izolatına karşı flukonazol ya da vorikonazolün terbinafinle kombinasyonundaki *in vitro* etkilerini checkerboard, time-kill, ve E-test metodlarını kullanarak çalışmışlardır. Sinerjizm *C. albicans*, *C. glabrata*, ve *C. tropicalis* izolatlarında sinerjizm ve indifference *C. krusei* izolatlarında indifference etkileşim görülmüştür. Metodlar arası korelasyon güzel olarak bulunmuştur. İlaç etkileşimlerini tespit etmede E-test uygun bir metod olarak önerilmiştir (Canton, et al., 2005).

Mukherjee ve arkadaşları kombinasyon çalışmaları sonuçlarındaki farklılıkların, farklı sayıda suş kullanımı, farklı test metodları, suş farklılıkları ya da kullanılan ilaç konsantrasyonlarından ileri gelebileceğini belirtmişlerdir (Mukherjee, et al., 2005).

Kandinler, 1,3 β -D glukon sentezini ve muhtemelen 1,6- β -D glukon sentezini bozmak suretiyle hücre duvarını inhibe ederler ve azollerin ya da AmB'nin aktivitesini, hücre membranına geçiş derecelerini ya da oranlarını artırmak yoluyla zenginleştirirler. Hossain ve arkadaşları, FLU terapisine başarısız cevap veren bir hastadan izole edilen azol-dirençli bir suşa karşı CAS+AmB nin *in vitro* etkisini değerlendirmişlerdir (Hossain, et al., 2003).

Dannaoui ve arkadaşları *A. fumigatus* ve *A. terreus*'a karşı CAS, AmB, VORI, 5FC nin üçlü kombinasyonlarını checkerboard tekniği kullanılarak çalışmışlardır. CAS'in ya AmB ya da VORI ile kombinasyonları tüm izolatlar için additive olup antagonizma gözlenmemiştir. CAS+5FC kombinasyonu 12 *A. fumigatus* izolatının 7'sinde sinerjistik ve 5 izolat için additive olup ve antagonizma gözlenmemiştir. VORI+5FC kombinasyonu ise izolatların %93'üne karşı antagonistiktir. CAS+ 5FC+ AmB çoğunlukla sinerjistik olup, CAS+5FC+VORI 12 izolatın 8'inde sinerjistik ve 4 izolatla additive etki göstermiştir. Her üçlü kombinasyonlar için kompleks etkileşimler bazı izolatlar için saptanmış ve CAS ve VORI'ün bazı konsantrasyonları için sinerji ve antagonizma yayınlanmıştır (Dannaoui, et al., 2004).

Ghannoum ve arkadaşları, checkerboard tekniği kullanılarak farklı filamentöz funguslara karşı VORI ile AmB, AB, FLU, MICAF (Mikafungin), RAVU (ravukonazol) ya da CAS'in kombine etkilerini araştırmışlardır. Çalışılan türler *A. fumigatus*, *A. terreus*, *P. boydii*, *S. prolificans*, ve *Acremonium* türlerini içerir. *S. prolificans* hariç tüm izolatlar VORI ve RAVU'e duyarlı, tüm izolatlar FLU, MICAF ve CAS'e dirençli bulunmuştur. AmB ve AB ye ise duyarlılıkları değişiklik göstermektedir. VORI+CAS kombinasyonları %33,3 additiv ve %66,6 indifferent, oysa VORI+AmB %20 additive ve %80 indifferent bulunmuştur. Hem VORI+MICAF hem de VORI+RAVU kombinasyonları %13 additive ve %87 additiv bulunmuştur. VORI+FLU ve VORI+AB kombinasyonları %100 indifferenttir. Tüm VORI kombinasyonlarının %14,5'u additiv ve %85,5'i indifferent olarak bulunmuştur (Ghannoum, et al., 1995).

Perea ve arkadaşları, invaziv aspergillozlu hastalardan elde edilen 48 *Aspergillus* izolatında CAS ve VORI arasındaki etkileşimi araştırmak için NCCLS-CLSI broth mikrodilüsyon metodunu kullanmışlardır. Sonuçlarda %87,5 sinerji, %4,2 additive ya da %8,3 subadditive görülürken antagonizmaya rastlanmamıştır. Manavathu ve arkadaşları, *A. fumigatus*'a karşı CAS+VORI, CAS+ITRA, CAS+POSA, CAS+RAVU'nun etkisini *in vitro*

olarak araştırmışlardır. CAS+VORI ya da CAS+RAVU indifference; CAS+ITRA ve CAS+POSA kombinasyonları ise sinerji göstermiştir (Perea, et al., 2002).

Kontoyiannis ve arkadaşları, *Aspergillus* türlerine karşı calcineurin inhibitörleri ile kaspofungin kombinasyonunun etkisini disk difüzyon metodu ile araştırmışlardır. Tüm izolatlarda kaspofunginin calcineurin-TOR inhibitörleri ile artan bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (Kontoyiannis, et al., 2003).

Arıkan ve arkadaşları, 14 *Aspergillus* ve 6 *Fusarium* türüne karşı CAS ve AmB yi tek başına ve kombine olarak çalışmışlardır. *Aspergillus* için 24-48 saatte, %14 sinerji,%50 additive, %36 indifferent sonuçlar bulundu. *Fusarium* türleri için ise 24 saatte %50 sinerji, %17 additiv,%33 indifferent sonuçlar bulunmuş, antagonizmaya ise rastlanmamıştır. *C. neoformans* ile ilgili daha önceki bir çalışmaya benzer şekilde Arıkan ve arkadaşları *Aspergillus* 'a karşı CAS+AmB' nin artan bir etkisi olduğunu saptamış, CAS'ın fungal hücre duvarını tahrip ettiğini ve AmB ile de hücre zarına penetrasyonun arttığını saptamışlardır (Arıkan and Rex, 2003).

CAS, *C. neoformans*'a karşı tek başına kullanıldığında *in vitro*da hiçbir aktiviteye sahip değildir. Ancak Franzot ve Casadevall, CAS'ın AmB ya da FLU ile kombine edildiğinde *Cryptococcus neoformans*'a etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmada 18 *C. neoformans* suşu checkerboard metoduna dayanan *in vitro* kombinasyon testi ile incelenmiştir. AmB (0,03 den 1,0 µg/ml) ve CAS (8den 16 µg/ml) kombinasyonu her iki ilacın MİK inde ortalama 8 kat azalma göstermiştir. CAS+AmB kombinasyonları test edilen tüm suşlara karşı %100 sinerji göstermiştir. FLU (0,24 den 4 µg/ml) ve CAS kombinasyonunda %22 sinerji , %50 additive ve %28 indifferent etki gözlenmiş ve her bir ilacın MİK'inde iki katlı azalmayla sonuçlanmıştır. CAS+FLU kombinasyonunda hiç antagonizma gözlenmemiştir (Franzot, et al., 1997).

Roling ve arkadaşları, iki *C. neoformans* izolatına karşı düşük dozda CAS+FLU ve çok daha düşük dozda CAS+FLU kombinasyonunun etkisini değerlendirmek için time-kill metodunu kullanmışlardır. Ortalama CFU verileri (her mm de log10 CFU) fungal üremenin farklı zaman noktalarında çizilmiş ve başlangıç inokülümünden CFU'da $a \geq 3 \log_{10}(\%99,9)$ azalma olduğunda fungisidal olarak tanımlanmıştır. Fungistatik aktivite üremede $< \%99,9$ olacak kadar azalma olarak tanımlanmıştır. Bu kombinasyonların her ikisinde de etkileşimler infifference olarak sonuçlanmıştır (Roling, et al., 2002).

Pankey ve arkadaşları çoklu dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı ilaçların kombine kullanımının sinerjistik etki yaratabileceğini belirterek yaptıkları araştırmada E-test ve time-kill testlerini kullanmışlardır. İzolatların %42'sinde sinerjiye rastlanmış, antagonizma görülmemiştir. Diğer izolatlar ise indifferent olarak belirmiştir. E-test ile time-kill metodları arasında %65 uyum bulunmuştur (Pankey and Ashcraft, 2005).

Lewis ve arkadaşları, *Candida* türlerine karşı antifungal kombinasyonların etkileşimini değerlendirmek için checkerboard, time-kill ve E-test yöntemlerini karşılaştırmışlar ve E-test ile time-kill yöntemleri arasında, checkerboard yönteminin aksine oldukça uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Aynı çalışmada checkerboard yöntemi ile %33 oranında sinerji elde edilirken antagonizma saptanmamıştır. Ancak E-test yöntemi ile %17 oranında antagonizma saptanmasına karşın sinerji gözlenmemiştir (Lewis, et al., 1998).

Kontoyiannis ve arkadaşları, *Aspergillus fumigatus* izolatlarına karşı amfoterisin B+itakonazol kombinasyonunun antagonistik etkileşimini E-test ve agar dilüsyon yöntemi ile başarıyla göstermişlerdir (Kontoyiannis, et al., 2000).

In vitro deneyler genellikle belirli bir zamanda ve belirli ilaç konsantrasyonlarını test ettiklerinden ilacın vücuttaki hareketini yansıtmayabilirler. Bu nedenle *in vitro* test sonuçları, *in vivo* testlerle de doğrulanmalıdır. Louei ve arkadaşları sistemik kandidiyazlı fare modellerinde AmB+FLU kombinasyonunun etkinliğini değerlendirmek için *C. albicans*'ın bir FLU-duyarlı, iki orta düzeyde FLU-dirençli ve bir yüksek düzeyde FLU-dirençli suşlarını kullanmışlardır. FLU-duyarlı ve orta düzeyde FLU-dirençli suşlar için FLU+AmB kombinasyonu antagonistik bulunurken, yüksek düzeyde FLU-dirençli suş için bu kombinasyonda antagonizma saptanmamışlardır. Sanati ve arkadaşları kombinasyon tedavisinin maya hücrelerinin yok edilme hızını artırdığını, Louei ve arkadaşları ise bu kombinasyonun *in vivo* ortamda antagonistik etkileşim gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çelişkili sonuçlar nedeniyle ampirik antifungal tedavide, özellikle her iki ilaca da duyarlı suşların tedavisinde, bu iki ilacın kombinasyonunda dikkatli olunmalıdır (Louei, et al., 2001; Sanati, et al., 1997).

Klepser ve arkadaşları vorikonazolün *in vitro* farmakodinamik özelliklerini bir time-kill çalışması ile değerlendirmişlerdir. *C. albicans* ve *C. neoformans* için, konsantrasyon-etki ilişkileri flukonazole benzer bulunmuştur. Aynı çalışmada vorikonazol, fungostatik etki ve konsantrasyondan bağımsız farmakodinamik özellikler sergilemiştir (Klepser, et al., 2000).

C. glabrata izolatlarına karşı vorikonazolün diğer üç antifungal ajanla kombinasyonunun karşılaştırıldığı çalışmada Barchiesi ve arkadaşları dört ajanı tek başlarına ve ikili kombinasyonlarında checkerboard broth mikrodilüsyon yöntemi ile test etmişlerdir. Sinerji, VOR+TRB kombinasyonunun %75'inde, VOR+AmB kombinasyonunun %10'unda ve VOR+5FC kombinasyonunun %5'inde gözlenmiştir. Kombinasyonların hiçbirinde antagonistik etkileşme saptanmamıştır. Vorikonazolün terbinafin, amfoterisin B ve 5-florositozin ile kombinasyonunda sırası ile izolatların %25, 90 ve 95'inde ilaç etkileşimi saptanmamıştır(etkisiz). Aynı araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, patojen mayalara karşı, ergosterol sentezinde farklı bir adımı hedefleyen ya da farklı etki yollarına sahip olan ajanlarla kombinasyonun, vorikonazolün in vitro aktivitesini arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir (Barchiesi, et al., 2004).

Barchiesi ve arkadaşları *C. glabrata*'ya karşı kaspofungin ve amfoterisin B kombinasyonunun etkilerini time-kill metodu ile çalışmışlardır. Çalışmada ilaçlar tek başlarına ve kombinasyonda 1xMİK oranında çalışılmışlardır. CFU miktarları 0,2,6 ve 24. saatlerde belirlenmiştir. *In vitro* deneyler indifference bir etki gösterirken bir fare kandidemi modelinde organ sterilizasyonu ile sonuçlanan terapatik bir yaklaşım sergilenmiştir. Çalışmada bir suş kullanılmasına rağmen, alınan sonuçlar bu tedavisi zor fungal patojenin oluşturduğu infeksiyonlarda CAS+AmB kombinasyonunun faydalı bir yaklaşım olabileceğini göstermiştir (Barchiesi, et al., 2005).

Roling ve arkadaşları *Candida* ve *Cryptococcus* türlerine karşı FLU, CAS ve ANİDU (anidulafungin)'in tek başlarına ve kombinasyonda oluşturdukları etkileri time-kill metodu ile çalışmışlardır. Flukonazolün kaspofungin ya da anidulafungin ile kombinasyonları indifference olarak belirlenmiştir. Azol ve ekinokandin kombinasyonları antagonistik etki yaratmadığından, bu ajanlarla kombinasyonun gelecek çalışmalarda umut verici olabileceği belirtilmiştir (Roling, et al., 2001).

Klepser ve arkadaşları antifungal time-kill eğrisi çalışmalarına E-testin etkisini araştırdıkları bir çalışmada *Candida* türlerine karşı antifungal carryover, çalkalama ve başlangıç inokülümünün etkili olduğunu belirlemişler ve standardize metodların geliştirilmesi gerektiğini açıklamışlardır (Klepser, et al., 1998).

Orhan ve arkadaşları checkerboard ve E-test metodlarını kullanarak kandan izole edilen 16 *Brucella melitensis* izolatına karşı çeşitli antimikrobiyal kombinasyonlarının etkisini

araştırmışlardır. Her iki metotta farklı durumlar ve endpointler kullanılmasına rağmen sonuçların sıklıkla uyum gösterdiği belirlenmiştir (Orhan, et al., 2005). Çalışmada kullanılan E-test sinerji metodu bizim çalışmamızda da kullanılmıştır. (E-test-2).

Dannaoui ve arkadaşları *A. fumigatus* ve *A. terreus*'a karşı çeşitli antifungallerin ikili ve üçlü kombinasyonlarının etkisini checkerboard ve agar difüzyon testleri ile çalışmışlardır. 35 izolatın izolatlarda additive etki gözlenmiş ve antagonizmaya rastlanmamıştır. İzolatların %62'sinde CAS+5FC sinerjistik etki göstermiştir. VORI+5FC ise hiç sinerji göstermemiş ve izolatların %93'ünde antagonizma gözlenmiştir. CAS+FLU+AmB sinerjistik, CAS+FLU+VORI ise çoğunlukla sinerji göstermiştir. Bazı izolatlarda sinerji ya da antagonizma CAS ve VORI'nin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Dannaoui, et.al., 2004).

White ve arkadaşlarının sinerjik etkiyi saptamak için zaman-öldürme, dama tahtası ve E-test yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada E-test şeritlerini, her birinin tek başına MİK değerinin olduğu alanda çakışacak şekilde 90°'lik açı ile, bakteri yayılmış agar plağı üzerine yerleştirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucu olarak E-test yöntemi ile yapılan sinerji testlerinin diğer *in vitro* testlere alternatif olarak görüldüğü ileri sürülmüştür (White, et al., 1996).

E-test mikobakteriler ve aerob gram negatif basillere karşı ilaç kombinasyonlarını test etmek için başarıyla kullanılmıştır. Lewis ve arkadaşları yine üç sinerji testini karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada maya süspansiyonu yayılmış olan agar plağına antifungal şeritlerden birini yerleştirip ilacın diffüze olması için 1 saat bekledikten sonra birinci şeridi kaldırıp aynı alana diğer şeridi yerleştirmişlerdir. Çalışma sonunda üç yöntem içinde E-testin kullanımda en basit ve antifungal kombinasyonların testi için kabul edilebilir olduğu sonucuna varmışlardır (Lewis, et al., 1998).

Araştırmamızda iki farklı disk difüzyon metodu kullanılmış olup, bunlardan birinde diskler belli bir mesafede karşılıklı yerleştirilerek çalışılmıştır. İlk olarak ilaçların tek başlarına oluşturdukları inhibisyon zonlarının yarıçapları toplamı alınarak diskler arası mesafe ayarlanmıştır. Bu etkileşimde belirgin bir indifference etki gözlenirken, sinerjiye de rastlanmış, antagonizma belirlenmemiştir. Bu mesafeninde yarısı alındığında sinerjik etkileşim belirgin olarak gözlenmiştir.

Disk difüzyon yönteminin diğer bir modifikasyonu olarak çalışmamızda ilaçların tek başlarına oluşturdukları zon çaplarıyla, tek bir diskteki kombinasyonlarının oluşturduğu zon çapları karşılaştırılmıştır. İki ilacın birlikte gösterdiği inhibisyon zonları, ilacın tek başına gösterdiği zon çapından daha büyük olmasına rağmen, bu metotta sinerjistik ya da indifference etkileşimi ayırt etmede zorluk yaşanmıştır. Bununla beraber, bu tekniğin hazırlanması ve uygulanması oldukça kolay olup, antimikrobiyal etkileşim hakkında sadece kalitatif bilgi vermektedir.

Çalışmamızda iki farklı E-test kombinasyonu sonuçları karşılaştırıldığında benzerlikler görülmesine rağmen bazı suşlardaki farklılıklar dikkatleri çekmektedir. Metotlardan birinde E-test stripleri eşzamanlı kullanılmış, diğerinde ise önce kaspofungine maruz bırakılmış ve sonradan ikinci strip konulmuştur. Etki mekanizmaları tam bilinmemekle beraber, farklılıkların ilaçların veriliş zamanıyla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz.

Ernst ve arkadaşları broth mikrodilüsyon, E-test ve time-kill çalışmalarını kullanarak, 11 *C. lusitaniae* izolatına karşı amfoterisin B, flukonazol, 5-florositozin ve vorikonazolün tek başına ve kombine olarak antifungal aktivitelerini çalışmışlardır. Amfoterisin B, test edilen çoğu izolata karşı fungusidal aktivite gösterirken, flukonazol, vorikonazol ve 5-florositozin başlıca fungostatik aktivite sergilemişlerdir. Amfoterisin B-dirençli suşlar için (MİK $\geq 3\mu\text{g-ml}$), tek başına amfoterisin B ile karşılaştırıldığında, AmB+5FC kombinasyonunda fungusidal son noktaya erişmek için daha kısa süre yeterli olmuştur. Diğer kombinasyonlarda, tek başına ajanların aktivitelerine göre artış saptanmamıştır. Amfoterisin B uygulaması öncesinde izolatların azol antifungallere maruz bırakılması amfoterisin B aktivitesinde azalma ile sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada E-test ile elde edilen MİK değerlerinin, broth mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre, öldürme oranı ile daha iyi bir uyum gösterdiğini saptamışlar ve amfoterisin B'nin MİK değerini elde etmek için E-testin daha uygun olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Ernst, et al. , 1998).

Genel olarak, şimdiye kadar yapılan kombinasyon çalışmalarına bakıldığında *Candida*, *Aspergillus* ve *Cryptococcus neoformans* izolatlarına karşı amfoterisin B ve kaspofungin kombinasyonları sinerjik ve indifference etki gösterirken, antagonizmaya rastlanmamıştır.

Kaspofungin ile azol grubu ilaçların kombinasyonlarına bakıldığında ise, ilaç etkileşimlerinin suşa bağımlı olduğu ve bu yüzden tahmin edilemeyeceği söylenebilir. Time-kill metodunun kullanıldığı bir çalışmada *Candida* ve *Cryptococcus neoformans* türlerine

karşı kaspofungin ve flukonazol etkileşim göstermezken, başka bir çalışmada aynı kombinasyonlar sinerji ile sonuçlanmıştır (Röling, et al., 2002; Franzot and Casadewall, 1997).

Antifungal duyarlılık testleri ile ilgili olarak standardize edilmiş metodlar bulunmasına rağmen, antifungallerin kombinasyondaki aktivitelerini tayin etmede tam bir standardizasyona gidilememiştir. Antifungal kombinasyon çalışmalarında en sıklıkla kullanılan metodlar, checkerboard ve time-kill metodlarıdır. En iyi metodu belirlemek için yapılmış çok az sayıda karşılaştırmalı çalışma bulunmaktadır. Ve bu konuda yapılan araştırmalarda time-kill metodundan elde edilen sonuçların daha değerli olduğu belirtilmektedir.

Araştırmamızda time-kill testi sonuçları incelendiğinde CAS+AmB antagonizma göstermemiş, en umut verici olan kombinasyon olarak belirlenmiştir. CAS+VORI kombinasyonu da etkili sonuçlar vermiş, ancak bir suşta antagonizmaya rastlanmıştır. CAS+ITRA ve CAS+FLU kombinasyonlarında sinerji ve antagonizma az sayıda suşta gözlenmiş, indifference etki daha belirgin olarak gözlenmiştir. Konu ile ilgili araştırma sonuçlarının tümü bizim sonuçlarımızla benzeşmekle birlikte sonuçlar arasındaki çelişkilerin, çalışılan suşların farklılığı, değerlendirme yöntemleri, yorumlama kriterleri, değerlendiricinin bilgi ve tecrübesi, testler için standardize edilmiş bir yöntemin bulunmaması gibi faktörlere bağlı olduğu düşüncesindeyiz.

Kaspofunginin polyen ya da azol grubu antifungallerle sinerjik ya da additive etki gösterme mekanizmalarının nasıl olduğu halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Muhtemelen kaspofungin $\beta(1,3)$ D-glukan inhibisyonu ile fungal hücre membranına zarar vermekte bu da ikinci antifungalın hücre membranına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır.

Dikkat edilmesi gereken bir nokta da antifungal ilaç – ilaç etkileşimlerinin suşa spesifik olmasından dolayı, verilen bir türdeki tüm üyelere uyması için bir kombinasyonu seçmenin mümkün olamayacağıdır. Bu, her belirli klinik suş için optimal kombinasyonun testini gerekli kılar. Açık biçimde bu, zarar ve maliyetle ilgili olarak büyük yük getirir ve rutin olarak yürütülemez (Mukherjee, et al., 2005).

Kombinasyon testlerinde ilaçların hareketlerini takip etmesi açısından, time-kill testleri kullanışlı gibi görünmekle birlikte, oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Checkerboard testleri ilaç etkilerini karşılaştırmak için en fazla tercih edilen testlerdir. Nispeten uygulaması pratik

ve değerlendirmesi kolaydır. İlaç etkileşimlerini hesaplamak için kullanılan yöntemleri de basittir. Ancak amfoterisin B'yi içeren kombinasyon çalışmalarında duyarlılıktaki küçük farkların ayrışmasına engel olan MİK kümeleşmesi görülebilir. E-test yöntemi bunlar arasında en pratik olanıdır ve hem ilaçların duyarlılığını hem de kombinasyondaki etkileşimi saptamada oldukça etkilidir. Bu yöntem antifungal duyarlılık ve kombinasyon testlerinde broth mikrodilüsyon yöntemine alternatif olabilir. Bunun yanı sıra testler arasında gözlenen geniş varyasyonlar sıklıkla suşların farklılığından, ilaç konsantrasyonlarından, metod değerlendirmesinden, yorumlama kriterinden ya da kılavuzların birlik olması gerekliliğinden ileri gelir (Mukherjee, et al. , 2005).

Araştırmamızda iki farklı E-test metodu kullanılmış olup, bunlardan biri daha önce antibakteriyellere karşı çalışılan, striplerin 90°lik açıyla eş zamanlı yerleştirilmesi esasına dayanan metottur (E-test-2). Çalışmamızda polyen, azol ve ekinokandin grubu 3 farklı ilaç kullanılmış olup, bunların besiyerinde farklı bir difüzyon karakteristiği göstermiş olması mümkündür. Bunun sonucu olarak da antifungaller birbirine benzemeyen elips modelleri göstermiş olabilirler. Ayrıca, E-test için MİK ölçümünde kullanılan gelişim endpointleri farklı antifungal ajanlar için ayrılıklar göstermektedir. Bu yüzden, E-test-2 metoduyla sonuçları yorumlamanın daha zor olduğunu düşünmekteyiz. Time-kill metodu standart metod olarak alındığında, E-test-1, E-test-2 ve disk difüzyon metodundan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, CAS+FLU ve CAS+ITRA kombinasyonu sonuçları daha zayıf bir uyum gösterirken, CAS+AmB ve CAS+VORI kombinasyonları için elde edilen sonuçlar büyük ölçüde benzerlik göstermiştir.

Son yıllarda *Candida glabrata*'nın yol açtığı fırsatçı infeksiyonların artışı ile birlikte, bu infeksiyonlardan ölüm oranında da bir artış görülmektedir. Dar spektrumlu, toksisitesi yüksek ve tolere edilebilirliği düşük tedavi seçenekleri, invaziv infeksiyonların tedavisinde ilaç kombinasyonunu gerekli kılmaktadır. Klinikte, tek ilaçla tedaviye cevap vermeyen hastalarda ve antifungale direnç gelişmesi durumunda kombinasyon tedavisi gündeme gelmektedir. Araştırmamızda kaspofunginin vorikonazol, itrakonazol, amfoterisin B ve flukonazol ile kombinasyonları sinerjizmden indifference etkiye ve bazı kombinasyonlarda da antagonizmaya doğru değişen oranlarda sonuçlar göstermiştir ve alınan sonuçların kullanılan metottan büyük ölçüde etkilendiği saptanmıştır. Kaspofungin ile amfoterisin B antifungallerinin kombinasyonunda belirgin bir sinerjik ve indifference etki saptanmakla birlikte, antagonistik etkileşimin görülmemesi ya da çok az görülmesinin ümit verici

olduğunu düşünmekteyiz. Yine kaspofungin ile vorikonazol kombinasyonunda da paralel sonuçlar alınmış, antagonizmaya çok az rastlanmıştır. Burada antifungal ilaç etkileşimlerinin suşa bağlı olduğu da unutulmamalıdır. Ayrıca bu kombinasyon yaklaşımlarının hayvan modelleri üzerindeki sonuçlarının da çalışılması çok faydalı olacaktır. Sonuç olarak, tedaviye cevapsız ya da dirençli *Candida* suşları ile oluşmuş infeksiyonların tedavisinde kombinasyon tedavisi ümit vaatetmektedir. Ancak çok merkezli, geniş kapsamlı, *in vitro* ve klinik çalışmalara, standardize edilmiş *in vitro* yöntemlere ve yorumlama kriterlerine gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR DİZİNİ

Arikan, S. and Rex, J. H., 2003, Antifungal Agents, Manuel of Clinical Microbiology In: Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M.A., Jorgensen, J. H., Tenover, R.H., ASM Press, 8th ed. Washington DC, 1859-1868.

Asmundsdottir, L.R., Erlendsdottir, H., Gottfredsson, M., 2002, Increasing incidence of candidemia: results from a 20 year nationwide study in Iceland, Journal of Clinical Microbiology, 40, 9, 3489-3492.

Barchiesi, F., Spreghini, E., Maracci, M., Fothergill, A.W., Baldassarri, I., Rinaldi, M. G., Scalise, G., 2004, *In vitro* activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *C. glabrata*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 9, 3317-3322.

Barchiesi, F., Spreghini, E., Fothergill, A.W., Arzeni, D., Greganti, G., Giannini, D. , Rinaldi, M.G., Scalise, G., 2005, Caspofungin in combination with amphotericin B against *C. glabrata*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2546-2549.

Barry, A.L. , Pfaller, M.A., Rennie, R.P. , Fuchs, P.C., Brown, S.D., 2002, Precision and accuracy of fluconazole susceptibility tests by broth microdilution, E-test, and disk diffusion methods, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46, 1781-1784.

Beth, A., Arthington-Skaggs, Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Frade, J.P., Brandt, M.E., Hajjeh, R.A., Harrison, L.H., Sofair, A.N., Warnock, D.W., 2002, Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for *In vitro* Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing *Candida* Isolates, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2477-2481.

Bru, V.L., Herbrecht, R., 2003, Caspofungin: the first representative of a new antifungal class, The journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 513, 552.

Canuto, M.M., Rodero, F.G., 2002, Antifungal drug resistance to azoles and polyenes, Lancet Infectious Diseases, 2, 550-556.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A., Espinel-Ingroff, A, 2005, Synergistic Activities of Fluconazole and Voriconazole with Terbinafine against Four *Candida* Species Determined by Checkerboard, Time-Kill, and E-test Methods, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4, 1593–1596.

Cheng, M.F, Yu, K.W., Tang, R.B., Fan, Y.H., Yang, Y.L., Hsieh, K.S., Ho, M., Lo, H. J., 2004, Distribution and antifungal susceptibility of *Candida*, *Mycology*, 33-37.

Chryssanthou, E., 2001, Trends in Antifungal Susceptibility among Swedish *Candida* Species Bloodstream Isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A Reference Method, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 11, 4181-4183.

Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., 2002, Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European Committee on antibiotic susceptibility testing proposed Standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and Caspofungin susceptibility testing yeast species, *American Society for Microbiology*, 3841-3844.

Clinical Laboratory Standards Institute, 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard, NCCLS Document M27-A2, CLSI , Wayne, Pa.

Clinical Laboratory Standards Institute, 2002, Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing in yeasts, Approved Guideline, Vol, M-44-A, CLSI, Wayne, PA.

Clinical Laboratory Standards Institute, 2002, Method for determinig bactericidal activity of antimicrobial agents, Approved Guideline, Vol, M-26-A, CLSI, Wayne, PA.

Cooke, V.M., Miles, R.J., Price, R.G., Midgley, G, Khamri, W., Richardson, A.C., 2002, New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 7, 3622-3627.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Çetinkaya, Z., Kiraz, N., 2005, *In vitro* investigation of antifungal activities of phenotypic variation *C. albicans* strains against fluconazole, itraconazole and voriconazole, Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 46,3, 197-201.

Dannaoui, E., Lortholary, O., and Dromer, F., 2004, *In vitro* Evaluation of Double and Triple Combinations of Antifungal Drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 3, 970, 978.

Dismukes, W.E., 2000, Introduction to antifungal drugs, Clinical Infectious Diseases, 30, 653-657.

Edwards, J.E., 2000, *Candida* species, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York, Churchill Livingstone Inc, 2656-2674.

Elewski, B.E., 1998, Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis and management, Clinical Microbiology Reviews, 11,3, 415-429.

Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., 2000, Antimicrobial Combinations. In: Lorian V ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed, Williams and Wilkins, Baltimore, MD USA; 432-49.

Ernst, E.J., Klepser, M.E., Ernst, M.E, Shawn, A.M., Pfaller, M.A., 1998, *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by Time-Kill methods, Diagnostic Microbiol Infect Dis, 33, 75-80.

Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M.A., 2003, Susceptibility test Methods: Yeast and Filamentous Fungi, In: Murray, P.R., Baron, E.J , Pfaller, M.A , Jorgensen, J.H., Tenover, R. H., Manual of Clinical Microbiology ASM Press, 8th ed, Washington DC, 1880-1893.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., 2002, *Candida albicans* hyphal formation and expression of the Efg1-regulated proteinases Sap 4 to Sap 6 are required for the invasion of parenchymal organs, Infection and Immunity, 70, 3689-3700.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Fidel, P.L., Vazquez, J.A., Sobel, J.D., 1999, *C.glabrata*; Review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. Clinical Microbiology Reviews, 12, 1, 80-86.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., 2002, Laboratory Methods in Basic Mycology, 2002, Weissfeld AS Bailey and Scott's, Diagnostic Microbiology, 11th ed, St. Louis, Mosby, 53, 779-789.

Fromtling, R.A., Rhodes, J.C., Dixon, D.M., 2003, Taxonomy, Classification, and Morphology of the Fungi. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Jorgesen, J. NH., Tenen, R.H., Manual of Clinical microbiology ASM Pres, 8th ed, Washington DC, 1653-1658.

Ghannoum, M.A., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Mortara, L.A., Shafiq, M.C., Edwards, J.E., Criddle, R.S., 1995, *In vitro* determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39, 2459-2465.

Ghannoum, M.A., Rice, L.B., 1999, Clinical Microbiology Reviews, Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, 12, 4, 501-517.

Goodway, G.W., 1995, Cell Membrane, In Gow, N. A. R., Goadd, G. M., The growing Fungus, London, Chapman and Hall, 63-74.

Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995, The search for synergy: a critical review from a response surface perspective, Pharmacological reviews, 47, 331-385.

Gumbo, T., Isada, C.M., Hall, G, Karafa, M.T., Gordon, S.M, 1999, *C. glabrata* Fungemia, Medicine, 78, 4, 220-227.

Hazen, K.C., Howell, S.A., 2003, *Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeasts of Medical Importance, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Jorgensen, J.H., Tenen, R.H., Manual of Clinical microbiology, ASM Press, 8th ed, Washington DC, 1693-1711.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Hossain, M.A., G., Reyes, L., Long, P.K., 2003, Mukherjee, M.A., Ghannoum, Efficacy of Caspofungin combined with Amphotericin B against azole resistant *Candida albicans*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 1427-1429.

Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.R., 2004, Combination Antifungal Therapy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 693-715.

Kiraz, N., Ang, O. Akgün, Y., Erturan, Z., 2000, Phenotypic variation and antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* strains isolated from neutropenic patients, Mycoses, 43, 3-4, 119, 123.

Klepser, M.E., Wolfe, E.J., Pfaller, M.A., 1998, Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, 397-401.

Klepser, M.E., Malone, D., Lewis, R.E., Ernst, E.J., Pfaller, M.A., 2000, Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44, 1917-1920.

Kwan Chung, K.J., Bennet, J.E., 1992, Medical Mycology, Philadelphia ; Lea and Fabinger, 280-336.

Koç, A.N., Gökahmetoğlu, S., Oguzkaya, M., 2000, Comparison of E-test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. Mycoses, 43,7, 293-297.

Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., Sagar, N., May, G., Prince, R.A., Rolston, K.V., 2000, Itraconazole-amphotericin B antagonism in *Aspergillus fumigatus*: an E-test-based strategy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 2915-2918.

Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., Osherov, N., 2003, Combination of Caspofungin with inhibitors of the calcineurin pathway attenuates growth *in vitro* in *Aspergillus* species, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 313-316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kronvall, G., Karlsson, I., 2001, Fluconazole and voriconazole multidisk testing of *Candida* species for disk test calibration and MIC estimation, *Journal of Clinical Microbiology*, 1422-1428.

Kurtz, M.B., Heath, I.B., Marinan, S., Dreikorn, S., Onishi, J., Douglas, C., 1994, Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against 1,3-D glucan synthase, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1480-1489.

Kwan Chung, K. J., Bennet, J.E., 1992, *Medical Mycology*, Philadelphia, Lea and Fabinger, 280-336.

Larone, D.H., 1995, *Medically important fungi a guide to identification*, 3rd ed. , ASM Press, Washington D.

Lehmann, P.F., 1998, *Fungal Structure and Morphology*. In: Collier, L., Balows, A., Susman, M., eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 4 Ajello, L., Hay, R.J., *Medical Mycology*, 9th ed, London, 3, 57.

Lewis, R.E., Diekema, D.J., Messer, S.A., Pfaller, M.A., Klepser, M.E., 2002, Comparison of E-test, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 345.

Lewis, R.E., Lund, B.C., Klepser, M.E., Ernst, E.J., Pfaller, M.A., 1998, Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1382-1386.

Lozano-Chiu, M., Nelson, P.W., Paetznick, V.L., Rex, J.H., 1999, Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of *Candida* spp. to MK-0991, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1625-1627.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Louie, A., Kaw, P., Banerjee, P., Liu, W., Chen, G., Miller, M.H., 2001, Impact of the order of initiation of fluconazole and amphotericin B in sequential or combination therapy on killing of *Candida albicans in vitro* and in a rabbit model of endocarditis and pyelonephritis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 485-494.

Maenza, J.R., Merz, W.G., 1998, *Candida albicans* and Related Species. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases*, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1987-1998.

Maxwell, M.J., Messer, S.A., Hollis, R.J, Boyken, L., Tendolkar, S., Diekema, D.J., Pfaller, M.A. and International Fungal Surveillance Participant Group, 2003, Evaluation of E-test method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3, 1087-1090.

Merz, W.G., Roberts, G.D., 2003, Algorithms for detection and identification of fungi, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Jorgensen, J.H., Tenover, R.H., *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, 8th edition, Washington DC, 1668-1685.

Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Ghannoum, M.A., 2005, Combination treatment of invasive fungal infections, *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 1, 163-194.

Munro, C.A., Bates, S., Burman, E.T., Hughes, E.B., MacCallum, D.M., Bertram, G., 2004, Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant α -1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1, 36.

Murray, P.R., Rosenthal, K., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A., 2002, *Medical Microbiology*, 4th ed. USA, Mosby, 71, 664-672.

Nenoff, P., Osfeld, U., Haustein, U.F., 1999, *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole, Evaluation of a microdilution test, *Mycoses*, 42, 11-12, 629-639.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Oh, K.B., Miyazawa, H., Naito, T., Matsuoka, H., 2001, Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*, Microbiology, 98, 8, 4664-4668.

Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., Balcı, I., 2005, Synergy tests by E-test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. Journal of Clinical Microbiology, 43, 1, 140-143.

Pankey, G., A., Ashcraft, D.S., 2005, *In vitro* Synergy of Ciprofloxacin and Gatifloxacin against Ciprofloxacin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 7, 2959–2964.

Perea, S., Gonzalez, G., Fothergill, W., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., 2002, *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole against clinical isolates of *C. glabrata* with decreased susceptibility to azoles. Journal of Clinical Microbiology, 40, 5, 1831-33.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Karlsson, A., Bolmström A., 1998, Evaluation of the E-test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media, Journal of Clinical Microbiology, 36, 9, 2586-2589.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Houston, A., Mills, K., Bolmstrom, A., Jones, R.N., 2000, Evaluation of the Etest Method for Determining Voriconazole Susceptibilities of 312 Clinical Isolates of *Candida* Species by Using Three Different Agar Media, Journal of Clinical Microbiology, 38, 10, 3715-3717.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Mills, K., Bolmstrom, A., Jones, 2001, Evaluation of Etest Method for Determining Caspofungin (MK-0991) Susceptibilities of 726 Clinical Isolates of *Candida* Species, Journal of Clinical Microbiology, 39, 12, 4387-4389.

Pfaller, M.A., Yu, W.L., 2001, Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications, Infectious Diseases Clinical North America, 15, 1227-1261.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Boyken, L., Messer, S.A., Tendolkar, S., Hollis, R.J., 2003, Evaluation of the E-test and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *C. glabrata* to fluconazole and voriconazole, Journal of Clinical Microbiology, 41, 5, 1875-1880.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, R.J., Diekema, D. J, 2003, Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*, Pfaller, M. A. , Yu, W. L. , 2001, Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications, Infectious Diseases Clinical North America, 15, 1227-1261.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Tendolkar, S., Hollis, R.J., Diekema, D.J., 2004, Geographic Variation in the Susceptibilities of Invasive Isolates of *C. glabrata* to Seven Systemically Active Antifungal Agents: a Global Assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program Conducted in 2001 and 2002, Journal of Clinical Microbiology, 42, 7, 3142-3146.

Pujol, C., Renaud, F., Mallie, M., De Meeus, T., Bastide, J.M., 1997, Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients, Journal of Medical Veterinary Mycology, 35, 115-121.

Rex, J., Pfaller, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, M.A., Ghannoum, M.A., Goseyö, L.L., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J., Warnock, D.W., 2001, Antifungal susceptibility testing : practical aspects and current challenges, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 14, 643-658.

Richardson, M.D., Warnock, D.W., 1997, Fungal Infection: Diagnosis and Management, 2nd ed, Blackwell Science, Oxford, 9-18.

Richardson, M.D., Carlson, P., 2002, Culture and Non-culture Based Diagnostics, for *Candida* Species, In: Calderone RA ed. *Candida* and Candidiasis. Washington DC, ASM Press, 378-394.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Roling, E.E., Klepser, M.E., Wasson, A., 2002, Antifungal activities of fluconazole, Caspofungin (MK 0991) and anidulafungin (LY303366) alone and in combination against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods, Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 43, 13-17.

Segal, E., Elad, D., 1998, *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. v. 4 Ajello, L., Hay, R.J., v. eds. Medical Mycology, 9th ed, London, 423-460.

Sewell, D.I., Pfaller, M.A., Barry, A.L., 1994, Comparison of the broth macrodilution and E-test antifungal susceptibility tests for fluconazole, Journal of Clinical Microbiology, 32, 2099-2102.

Sanati, H., Ramos, C.F., Bayer, A.S., 1997, Ghannoum M.A., Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, 1345-1348.

Stevens, D.A., Bennet, J.E. , 2000, Antifungal Agents. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds, Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed, New York, Churchill Livingstone Inc. , 46, 395-401.

Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M., 1999, Current and emerging azole antifungal agents, Clinical Microbiology Reviews, 12, 4, 40-79.

Sigmundsdottir, G., Christensson, B. , Björklund, L.J., Hakansson, K., Pehrson, C., Larsson, L., 2000, Urine D-arabinitol-L-arabinitol ratio in diagnosis of invasive candidiasis in newborn infants Journal of Clinical Microbiology, 38, 8, 3039-3042.

Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., Guide to Clinically Significant Fungi. Williams and Wilkins, 1st ed. Baltimore, 1998, 1-23.

Topçu, A. W. , Çerikcioğlu, N. , 2002, *Candida* Türleri, Topçu, A. W. , Söyletir, G. , Doğanay, M. , İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2. baskı, cilt 2, Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları, İstanbul, 1798-1808.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Tümbay, E., 1999, *Candida* Türleri. Ustaçelebi, Ş. , (Ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 12, 1081-1091.

Te Dorsthorst, D.T.A., Verweij, P.E., Meletiadis, J., Bergervoet, M., Punt, N.C., Meis, J.F.G.M., Mouton, J.W., 2002, *In vitro* interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 9, 2982-89.

Vargas, K.G., Srikantha, R., Holke, A., Sifri, T., Morris, R., Joly, S., 2004, *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness, *Medical Science Monitor*, 10, 7, 198-206.

Warren, N., Hazen, K.C., 1995, *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.J., Tenover, R.H., eds, *Manual of Clinical Microbiology*, 6th. Edition, Washington, ASM Press, 723-737.

White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M., Bosso, J.A., 1996, Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E-test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 8, 1914-1918.

Yang, Y.L., 2003, Virulence factors of *Candida* species, *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 36, 223-228.

Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S., 1999, *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 30, 236-246.

Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S., 2000, *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* , 30, 3, 172-186.

Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S., 2001, Hastane kaynaklı (nozokomiyal) mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 32, 4, 259-269.

Yücesoy, M., Mutlu, E., Yuluğ, N., 2001, Antifungal duyarlılığın saptanmasında E-test yönteminin değerlendirilmesi, *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 15, 4, 670-677.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Yıldıran, Ş.T., 1999, Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuar tanı, Ustaçelebi, Ş. , Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 1129-1144.

Vargas, K.G., Srikantha, R., Holke, A, Sifri, T., Morris, R, Joly, S., 2004, *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness, Medical Science Monitor, 10, 7, 198-206.

ÖZGEÇMİŞ

Bu tez ile Doktora çalışmasını sunan İlknur Dağ, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup, 01.11.1973 tarihinde Polatlı'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini Polatlı'da tamamladı. 1994 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden lisans derecesini aldı. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı'ndan yüksek lisansa başladı ve 1997 yılında tamamladı. Halen Biyoloji öğretmeni olarak görev yapmakta olup, evli ve iki çocuk annesidir.