

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
(Tıbbi Mikrobiyoloji) Anabilim Dalı

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDİDA SUŞLARININ FLUKONAZOL
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI VE
GENTAMİSİNİN BU DUYARLILIĞA ETKİSİ**

DR. SÜMEYRA EBRU UMUDUM

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. M. HAMİDULLAH UYANIK

ERZURUM-2020

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
TABLolar LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
RESİMLER LİSTESİ	iv
GRAFİKLER LİSTESİ	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Candida Türleri.....	3
2.2.Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.3. Candidaların Hücre Yapısı	4
2.4.Candidaların Virulans Faktörleri.....	4
2.5.Epidemiyoloji	7
2.6.Sık Karşılaşılan Patojen Türlerin Bazıları.....	8
2.7. Candida Enfeksiyonları	10
2.7.1. Yüzeysel Candida Enfeksiyonları	10
2.7.2.İnvaziv Candida Enfeksiyonları	11
2.8.Candidaların Laboratuvar Tanısı	13
2.8.1.Direkt Mikroskopik İnceleme.....	13
2.8.2.Kültür.....	14
2.8.3.Germ Tüp(Çimlenme Borusu) Testi.....	14
2.8.4.Mısır Unlu Agar Preparatı	15
2.8.5.Kromojenik Besiyerinde Morfoloji	16
2.8.6.Biyokimyasal Tanı	16
2.8.7.Üreaz Testi	16
2.8.8.Hızlı Testler	17
2.8.9.Serolojik Yöntemler	17
2.8.10.Moleküler Yöntemler	18
2.9.Antifungal Duyarlılık Testleri	18

2.10.Antifungal İlaçlar	20
3.GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1.İlk İzolasyon ve Tanımlama	22
3.1.1.Germ Tüp (Çimlenme Borusu) Testi.....	23
3.1.2.Kromojenik Besiyerinde Morfoloji	23
3.1.3.Mısır Unlu Agarda Mikroskobik Morfoloji.....	24
3.1.4.BD Phoenix Sistemi ile Biyokimyasal Tanımlama	25
3.2.Flukonazol Duyarlılık Testi.....	26
3.2.1.Besiyeri Hazırlama	26
3.2.2.Flukonazol Stok Solüsyonu	26
3.2.3.Maya Süspansiyonları	26
3.2.4.Plakların Hazırlanması ve İnokulum	26
3.2.5.Sonuçların Değerlendirilmesi.....	28
3.3.Flukonazol ile Gentamisin'in Candidalara Etkisinin ve İlaç Etkileşiminin Araştırılması	29
3.3.1.Stok Solüsyonlar.....	29
3.3.2.Maya Süspansiyonları	29
3.3.3.Plakların Hazırlanması	30
4.BULGULAR	33
4.1.Flukonazol ve Gentamisin Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi	35
4.2.Flukonazol ve Gentamisin Kombinasyonunun Değerlendirilmesi.....	38
5.TARTIŞMA	44
6.SONUÇ	52
7.KAYNAKLAR	54
8.EKLER.....	64

KISALTMALAR

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrom

ATCC: American Type Culture Collection

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

DBD: Doza Bağlı Duyarlı

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMB: Eozin Metilen Blue

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FİK (FIC): Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon

HIV: Human Immunodeficiency Virus

KOH: Potasyum Hidroksit

MİK (MIC): Minimal İnhibitör Konsantrasyon

QS: Quorum Sensing

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RIA: Radio İmmun Assay

RNA: Ribonükleik asit

SAP: Salgısal Asit Proteinaz

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

SDB: Sabouraud Dekstroz Broth

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1 Candida türlerinin flukonazol için epidemiyolojik eşik değerleri ve klinik duyarlılık sınır değerleri	28
Tablo 2 Flukonazol ve gentamisin mikrop plak kuyucuklarındaki konsantrasyonları	32
Tablo 3 Örnek türü dağılımı	34
Tablo 4 İzolatların flukonazol MİK değerleri	36
Tablo 5 İzolatların flukonazol duyarlılık değerleri	36
Tablo 6 C.albicans-non-albicans flukonazol direnç oranları (n(%))	37
Tablo 7 Candida türlerine ait flukonazol için MİK ₅₀ , MİK ₉₀ değerleri, MİK aralıkları ve ort.ları	37
Tablo 8 Dama tahtası yöntemi ile belirlenen flukonazol ve gentamisin MİK değerleri, FİKİ değerleri ve etkileşim türü	39
Tablo 9 Flukonazol/gentamisin sinerjizması tespit edilen 25 nolu izolatın MİK değerleri	42
Tablo 10 Flukonazol/gentamisin additif etki tespit edilen 36 nolu izolatın MİK değerleri	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Flukonazol mikrop plak kuyucuklarındaki konsantrasyonları	27
Şekil 2 Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değeri hesaplama	38

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1 Sensititre YeastOne ile yapılan antifungal duyarlılık çalışması (Çalışmamızdan)	19
Resim 2 C. albicans'a ait germ tüp yapısının fotomikrografı (400x)(Çalışmamızdan)	23
Resim 3 C. albicans (Çalışmamızdan)	24
Resim 4 C. kefir (Çalışmamızdan)	24
Resim 5 C. tropicalis (Çalışmamızdan)	24
Resim 6 C. krusei (Çalışmamızdan)	24
Resim 7 C. albicans (400x) (Çalışmamızdan)	25
Resim 8 C. glabrata (100x) (Çalışmamızdan)	25
Resim 9 C.parapsilosis (400x) (Çalışmamızdan)	25
Resim 10 C. kefir (100x) (Çalışmamızdan)	25
Resim 11 Flukonazol sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan mikrop plak (Çalışmamızdan)	28
Resim 12 Flukonazol ve gentamisin farklı konsantrasyonda kombinasyonlarının bulunduğu mikrop lakta üremiş C. albicans suşu (Çalışmamızdan)	31

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1 Suşların izole edildiği hasta örneklerinin gönderildikleri servislere göre dağılımları	33
Grafik 2 Candidaların tür düzeyinde dağılımı	34
Grafik 3 Kliniklere göre C. albicans non- albicans oranı	35

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmam sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. M. Hamidullah UYANIK'a,

Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ'ye ve hocalarımız Prof. Dr. Osman AKTAŞ, Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK, Prof. Dr. Halil YAZGI ve Prof. Dr. Hakan USLU'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Bahar ÇİMEN, Dr. Büşra AYYILDIZ, Dr. Şeyma TANYILDIZI, Dr. Zehranur TOSUNOĞLU'na ve uzmanlık eğitimine beraber başladığım, çalışmalarımdayan yanımda olan, manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Dr. Büşra ARDIÇ'a,

Tezimin istatistik çalışmalarında desteğini esirgemeyen Doç.Dr. Sinan KOPUZLU'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, sevgi ve desteklerini daima hissettiğim canım annem, babam, kardeşim ve geniş ailemin üyelerine, sevgileriyle bana güç veren kıymetli eşime ve minik kızıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Suşlarının Flukonazol Duyarlılıklarının Araştırılması ve Gentamisin'in Bu Duyarlılığa Etkisi

Fırsatçı patojen olan Candidaların enfeksiyonları sıklığı artan ve mortal seyirli, özellikle immünsuprese hastalarda bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte görülen yönetimi zor enfeksiyonlardır. Hastanelerin özellikle yoğunbakım servislerinde bu komplike enfeksiyonların tedavisinde gentamisin flukonazol farklı etkenlere yönelik sıklıkla birarada kullanılan antimikrobiyal ajanlardır.

Çalışmamıza Haziran 2018 ile Ocak 2020 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına değişik klinik örneklerden izole edilen 90 Candida suşu dâhil edilmiştir. İzole edilen Candida suşları germ tüp oluşumu, mısır-unlu agardaki morfolojik görünimleri ve Phoenix 100 (BD, ABD) otomatize sistem kullanılarak biyokimyasal özelliklerine göre tiplendirildi. Suşlarda, flukonazolün gentamisin ile kombinasyonlarının in vitro etkinliği, dama tahtası (checkerboard) mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı. İlaç etkileşimleri FİK indeks analizi ile değerlendirildi. Flukonazol/gentamisin kombinasyonunun etkileşim çalışmasına flukonazole dirençli ve duyarlı 90 klinik izolat ve *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart suşları dâhil edildi.

Çalışmamıza dâhil edilen izolatların 38'i *C. parapsilosis*, 29'u *C. albicans*, dokuzu *C. tropicalis*, beşi *C. kefyr*, dördü *C. glabrata*, ikisi *C. firmetaria*, biri *C. krusei*, biri *C. membranifacies* ve biri de *C. lusitaniae* idi. Suşların %56'sı yoğun bakımlardan, %41'i klinik servislerden, %3'ü polikliniklerden laboratuvarımıza gönderilen suşlardı. Duyarlılık test sonuçlarına göre 20 suşun flukonazole dirençli olduğu tespit edildi. Dirençli suşların 16'sı *C. parapsilosis*, 2'si *C. albicans*, 2'si *C. firmetaria* idi. 5 izolat ise flukonazole doza bağlı duyarlı bulundu ve bu suşların 4'ü *C. glabrata*, 1'i *C. tropicalis* idi. Flukonazol ve gentamisin kombinasyonlarında FİK indeks analizi sonucuna göre, 90 suştan 20'sinde sinerjistik etki tespit edildi, geri kalan 70 suştaki etkileşim additif etki olarak değerlendirildi, antagonizma görülmedi. Sinerjizma tespit edilen 20 izolatın 5'i flukonazol dirençli *C. parapsilosis*, 1'i doza bağımlı duyarlı *C. glabrata* izolatı idi. Geri kalan flukonazol duyarlı izolatların 6'sı *C. parapsilosis*, 4'ü

C. albicans, 3'ü *C. tropicalis*, 1'i de *C. lusitaniae*'dir. Sinerjizma tespit edilen izolatların MİK değerleri kombinasyon ile 3 katı kadar azaldı.

Sonuç olarak, *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan flukonazole karşı direnç ve azalmış duyarlılığın önemli bir oranda olduğu tespit edilmiştir. Farklı endikasyonlarla tedavide sıklıkla birlikte kullanılan gentamisin ve flukonazol kombinasyonu test edilen suşlarda additif ve sinerjistik etki göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulguların yapılacak daha kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi, etkili ilaç kombinasyonlarının bulunmasına ve tedavide kullanımına katkı sağlayacağını düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Candida*, Flukonazol, Gentamisin, Dama tahtası, Antimikrobiyal Kombinasyon

ABSTRACT

Investigation of Fluconazole Sensitivity of Candida Strains Isolated from Various Clinical Samples and the Effect of Gentamycin on This Sensitivity

Candida infections, which are opportunistic pathogens, are difficult to manage with increasing frequency and mortality, especially in immunosuppressed patients with bacterial infections. Gentamicin fluconazole are antimicrobial agents that are frequently used together for different pathogen in the treatment of these complicated infections, especially in the intensive care units of hospitals.

Ninety Candida strains isolated from different clinical samples in the Microbiology Laboratory of Atatürk University Medical Faculty Research Hospital between June 2018 and January 2020 were included in our study. The isolated Candida strains were identified according to their germ tube formation, their morphological appearance on corn-meal agar and their biochemical properties according to Phoenix 100 (BD, USA) automated system. The in vitro efficacy of fluconazole and gentamicin combinations in the strains was studied using the checkerboard microdilution method. Drug interactions were evaluated by FIC index analysis. Fluconazole / gentamicin combinations interaction applied to, 90 fluconazole-resistant and susceptible clinical isolates and standard strains of *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Of the strains included in our study, 38 were *C. parapsilosis*, 29 *C. albicans*, nine *C. tropicalis*, five *C. kefyr*, four *C. glabrata*, two *C. firmetaria*, one *C. krusei*, one *C. membranifacies* and one *C. lusitaniae*. 56% of these strains were sent to our laboratory from intensive care units, 41% from clinical services, and 3% from polyclinics. According to the sensitivity test results, twenty strains were found to be resistant to fluconazole. Sixteen of the resistant strains were *C. parapsilosis*, 2 were *C. albicans*, 2 were *C. firmetaria*. Five isolates were found to be dose-dependent susceptible to fluconazole, and 4 of these strains were *C. glabrata* and 1 was *C. tropicalis*. According to FIK index analysis results in fluconazole and gentamicin combinations, synergistic effect was detected in 20 of 90 strains, interaction in the remaining 70 strains was evaluated as additive effect, no antagonism was observed. Of the 20 isolates with synergism, 5 were fluconazole resistant *C. parapsilosis* and 1 was dose dependent susceptible *C. glabrata*. The remaining fluconazole susceptible

isolates were 6 *C. parapsilosis*, 4 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 1 *C. lusitaniae*. The MIC values of the isolates with synergism decreased by 3 times with the combination.

As a result, it has been found that resistance and decreased sensitivity to fluconazole, which is frequently used in the treatment of Candida infections, is found to be significant. The combination of gentamicin and fluconazole, which were frequently used together in treatment with different indications, showed an additive and synergistic effect in the strains tested. Investigation of the findings obtained in our study with more comprehensive in vitro and in vivo studies contribute to finding effective drug combinations and their use in treatment.

Key words: Candida, Fluconazole, Gentamycin, Checkerboard, Antimicrobial Combination

1. GİRİŞ

Ökaryotik fırsatçı patojenler olan *Candida* cinsi maya mantarları deri ve gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem ve solunum sisteminde flora üyesi olarak yer alır, ayrıca besinler ve toprakta bulunabilir. Enfeksiyon etkeni oldukları zaman klinik tabloyu primer olarak konak savunması belirler. Sadece deri-mukoza yerleşimli kandidozlar olduğu gibi kronik dissemine kandidoz, kandidemi gibi derin enfeksiyonlar da gelişebilmektedir (1, 2). 200'den fazla türü bulunan Candidalar arasında kandidozun en sık nedeni olan tür *Candida albicans*'tır. Bununla birlikte, kandidoz etkeni olarak *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* gibi non-*albicans* Candidaların görülme sıklığı giderek artmaktadır (3).

Hasta örneklerinden en sık izole edilen maya türlerinin ilk sırasında Candidalar yer almaktadır. Hastane yatış sürelerinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanılması, kateterizasyon gibi invaziv girişimlerin artması, kemoterapi, kök hücre ve solid organ nakli ile gelişen immunsupresyon klinik örneklerde *Candida* izolasyonundaki artışın başlıca nedenleridir (4). Nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında Candidalar ön sıralarda yer almaya başlamış olup Amerika'da 4. sıradadır (5, 6).

Azoller, ekinokandinler, nükleozit analogları ve polyenler gibi sınırlı sayıda antifungal ilaçlar *Candida* türü mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yer almaktadır. Son yıllarda *Candida* türlerinin etkeni olduğu sistemik enfeksiyonlarda artış, immunsupresif kandidemili olgularda görülen yüksek mortalite oranı, yoğun bakım servislerinde yatış sürelerinin uzaması, antifungal ilaçların uzun süreli ve/veya yüksek doz kullanımını artırmıştır ve azoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, isavukonazol), *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle ilk tercih olarak önerilmektedir. Bu nedenlerle başta azol türevleri olmak üzere antifungal ilaçlara karşı direçli suşlar gelişmiştir (1, 7-9).

Antifungal ilaçlara direnç gelişen suşlar antifungal duyarlılık testleri ve *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* veya *European Committee of Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST)* tarafından belirlenen sınır değerler ile yorumlanıp tespit edilmektedir (10, 11). Antifungal ilaçlara dirençli suşların tespiti özellikle hastane enfeksiyonlarında mortal seyredebilen *Candida* enfeksiyonlarının

tedavisinde izlenecek yol için önemli veriler sunmaktadır. Dirençli suşlarda antifungal etkinlik oluşturacak veya var olan etkinliği sinerjistik mekanizmalarla artıracak yeni etken maddelerin denenmesine imkân sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda Haziran 2018- Mart 2020 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen Candida suşlarının flukonazol duyarlılıklarının araştırılması ve bir aminoglikozid türevi antibakteriyel ajan olan gentamisin bu duyarlılığa etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Candida Türleri

Deuteromycota'da Blastomycetes sınıfı Cryptococcales takımının Cryptococcaceae ailesinde sınıflandırılan ve fırsatçı patojen olan Candidalar 4-6µm büyüklüğünde, oval, dimorfik, blastokonidyumlar oluşturan maya şeklinde mantar hücrelerdir. İnsan ve hayvan mukoza, deri, gastrointestinal sistem florasında; doğada suda, toprakta ve besinlerde yer almaktadır. Florada yer almaları sebebiyle yüzeyel ve derin Candida enfeksiyonlarının birçoğu endojen kaynaklıdır. Enfeksiyon gelişmesinden önce floradaki mantar türünde sayıca artış meydana gelir (kolonizasyon) ve ardından enfeksiyon gelişir. Sistemik mikozun en sık erkeni 200'den fazla türü olan Candidalardır. Bu türler arasında derin ve yüzeyel mikozun da en sık etkeni *Candida albicans*'tır (12, 13).

2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Türlerin tamamına yakını makroskobik ve mikroskobik olarak benzerdir. Patojen türler 37°C'de, aerobik ortamda iyi üreyebilmektedir. Yüksek korbondiyoksit içeren ortamda da zayıf bir üreme görülebilir. Türlerin tamamı glukozu fermente eder fakat nitriti asimile edememektedirler. pH 5,5'te, 37°C'de Sabouraud Dekstroza Agarda (SDA) 2-3 günde kremsi beyaz, parlak/mat düzgün yüzeyli ya da kabarık görünümde, uzayan inkübasyonla kıvrımlı görünen 2-3 mm çaplı Candida kolonileri oluşmaktadır. Fenotipik değişimler sonucu tüylü koloniler de görülebilmektedir. Kültürde üreyen kolonilerin mikroskopisi gram olumlu boyanan oval hücreler şeklindedir. Türlerin morfolojik farklılıkları mısırunlu agar, Candida chrome agar gibi özel besiyerlerinde ortaya çıkar.

Candida blastosporları genellikle eşeysizdir (anamorf). Bazı türlerin eşeyli (telemorf) evreleri de vardır. Türler genellikle yalancı hif oluşturmaktadır. Klinik izolatlarda en sık rastlanan tür olan *Candida albicans* gerçek hif, germ tüp (çimlenme borusu) ve terminal yerleşimli klamidokonidyumlar oluşturabilir. *Candida dubliniensis* türü de germ tüp oluşturmaktadır. *Candida glabrata* ise hif, yalancı hif, germ tüp oluşturmamaktadır (4, 14).

2.3. Candidaların Hücre Yapısı

Hücre iskeleti hücre membranı ve duvarı ile ilişkili dinamik bir yapıdır ve turgor basıncına karşı koyar. Tomurcuklanma, septum oluşturma ve çeşitli enzimlerin düzenlenmesinde rol alır (15).

Hücre duvarı, hücreye şekil veren sert bir yapıdır. Hücreyi osmotik basınca karşı korumakla birlikte mayalarda değişik yüzeylere tutunmayı (adezyon) sağlamaktadır. Candidaların duvar yapısı antijenik determinat taşır ve bazı antifungallerin hedefi olmaktadır. Hücre duvarının %90'ını oluşturan karbonhidratların %30'u mannoprotein, %50-60'ı glukan ve %0,6-9'u kitin yapısındadır.

Candidaların hücre membranlarında bulunan sterol ün %95'i ergosterol yapıdadır ve antifungal ilaçların en önemli hedeflerindendir. Duvar sentezi, maya-hif dönüşümü gibi metabolik aktivitesi olan ve sinyal iletiminde görevli enzimler de membranda yer almaktadır (14).

2.4. Candidaların Virulans Faktörleri

Adezyon (Konak hücre yüzeyine yapışma): Mayaların konakla ilişkisinin başlaması ve devam etmesi için ilk aşamadır. *C. albicans* aderansı en yüksek türdür. Adezyonda konağa ait ümmunolojik özelliklerle birlikte mantar yüzey özellikleri de büyük önem taşımaktadır. Hücre yüzeylerinin hidrofobik özelliği adezyonu destekler. İC3b reseptörü (mayaların fagositozunu da engellediği düşünülmektedir), C3d reseptörü (plastik yüzeylere tutunma), fibronektin reseptörü (ekstrasellüler matriks proteinlerine ve böbrek, karaciğer, beyin hücrelerine), östrojen reseptörü (vajinal kolonizasyon), adezif mannoprotein, laminin reseptörü (aort ve mikrovasküler endotele), fibrinojen bağlayan proteinler (böbrek ve üretral epitel), ALS proteinleri (insan yanak epiteli ve fibronektine), HWP 1 P ve INT-1 proteinleri (yanak epiteline) gibi yüzey adezinleri kolonizasyonun ve invazyonun ilk aşaması olan epitel, endotel hücrelerine adezyonu sağlamaktadır (14).

Dimorfizm (Morfogenez): *C. albicans* ve *C. dubliniensis* için dimorfizm maya formundan hif ve yalancı hif olan filamantöz formlara geçiş anlamına gelmektedir. Bu geçişi, N-asetil glukozamin, serum, yetersiz besin, nötral pH, artan ısı (37°C-39°C), %5,5 CO₂ gibi koşullar kolaylaştırmaktadır. Hif formundan maya forma dönüş ise

düşük ısı ve asidik pH'da, serum yokluğunda ve yüksek konsantrasyonda glukoz varlığında gerçekleşmektedir. Maya formdan hif formuna geçişte pek çok gen düzenleyici görev almaktadır. Uygun koşullarda gen aktivasyonu ile maya hücresinde cAMP, cGMP ve diğer iyonların miktarlarında değişiklik oluşarak, bir iyon akımı ortaya çıkmakta ve hifal uzama gerçekleşmektedir. Hif formundan maya formuna geçişte ise; daha plastik bir duvar oluşur, dışarı doğru balonlaşma olur ve tomurcuk meydana gelir. Dokuya yayılımı maya daha etkili iken; hifler fagositik hücreleri mekanik lizise uğratarak diğer dokulara yayılır, ileri hasar ve invazyonda oldukça etkilidir (16).

Fenotipik değişim: Özellikle *C. albicans* suşlarında bulunduğu fizyolojik koşullara uyum sağlamak ve daha virulan olabilmek amacıyla spontan fenotipik değişimler meydana gelmektedir. Candidalarda salgısal aspartil proteinazla ilişkili SAP1-10 gen ailesinin rol aldığı düşünülen beyaz-opak, opak-beyaz yönündeki değişimler yüksek sıklıkta oluşmaktadır. Hem morfolojik hem biyokimyasal hem de moleküler değişim görülmektedir. Daha virulan olan beyaz hücreler agar yüzeyinde yuvarlak kabarık, opak hücreler yassı ve daha koyu renkli koloniler oluşturmaktadır. Bu dönüşüm koloni görünümünde de fotomikrograflarında da farklı görüntülere yol açar. Beyaz hücreler mikroskopik olarak yuvarlak, opak hücreler uzamış görünümündedir. Koloni morfolojisi 'Smooth' (S, düzgün yüzeyli) tipten miçelyal forma, halka tipi yıldız tipi şeklinde farklı formlara değişim görülebilmektedir. Fenotipik değişimin antifungal ilaçlara karşı gelişen dirençte etkinliği saptanmıştır (14, 16).

Fosfolipaz: Membran fosfolipidlerini lizisiyle epitele tutunmada ve dolayısı ile fungal enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynayan fosfolipazlar *C. albicans* suşlarının %79'unda saptanmıştır. Bu oran fungemi yapan suşlarda daha yüksektir (14). *C. albicans* dışı türlerde de fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (17).

Salgısal Aspartil Proteinazlar (SAP): Karboksil proteinaz, asit proteinaz olarak da bilinen salgısal aspartil proteinaz konağa ait kollojen, albümin, laminin, hemogloblin, kreatin gibi proteinleri denatüre eden proteolitik bir enzimdir. *C. albicans*'ın çoğu suşunda ve daha az oranda da *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* suşlarında farklı pH'larda aktifleşir ve konak hücre yüzey proteinlerini ve hücreler arası yapılarını lizise uğratar. Proteolitik aktivite sırası virulans sırası ile ilişkilidir (*C. albicans* en virulan, ardından

C. tropicalis ve *C.parapsilosis*). Candidaların adezyonunda dolayısı ile invazyonunda ve konak savunma sistemi hücrelerini harabederek konağın savunmasından kaçışında da rol aldığı bildirilmektedir (18).

Proteinaz enzimin farklı pH'larda aktifleşen ve çapraz reaksiyonlara yol açabilen birçok izoenzimi olduğu ve bu enzimlerin SAP1-10 arası genler tarafından kodlandığı saptanmıştır. SAP 1, 2, 3 mayalarda bulunur, düşük pH' da aktiftir. Erken aderens, invazyonda etkindir ve kutanöz enfeksiyonlarda önemli rol oynar. SAP 4, 5, 6, hif formları tarafından üretilir; pH: 5-7' de aktifleşir kolonizasyon ve farklı dokulara invazyonda etkindir. SAP 8 öncelikle penetrasyonda rol aldığı saptanmıştır. SAP 9 ve 10 ise hem maya hem hif formlarında bulunan, mantar hücre yüzeyine bağlı olarak yer alan serin proteazlar olarak bilinmektedir. Bunlar hem maya hem de hifal formda bulunurlar. *C. tropicalis* suşlarında SAP1-4 arası genler, *C. dubliniensis*'te yedi tip asit proteinaz tespit edilmiştir (14, 18, 19). Ayrıca pepstatin bir proteinaz inhibitörüdür ve in vivo şartlarda en fazla bulunan SAP2 enzimine karşı en etkili inhibisyonu sağladığı gözlemlenmiştir (20).

Biyofilm: Candidaların özellikle biyomateriyaller ile ilişkili fırsatçı enfeksiyonlar oluşturmada önemli bir yere sahiptir. Biyofilm, canlı ya da cansız yüzeylere tutunan polimerik bir matrikse gömülü halde bulunan mikrobiyal toplulukların oluşturduğu hidrate bir yapıdır. Candidaların yüzeylere tutunması için blastosporların hidrofobik ve elektrostatik kuvvetlerle yüzeye tutunması gibi nonspesifik; ALS gen ailesi, Efg1 düzenleyici proteini gibi spesifik faktörlere ihtiyacı vardır. Biyofilm oluşumu esnasında Candidalar arasındaki sinyal iletişimi (quorum sensing, QS) farnesol ve timosol molekülleriyle sağlanmaktadır. Olgunlaşmış bir biyofilimde %40'ı glukoz ve heksozamin içeren eksopolisakkaritlerden meydana gelen polimerik matriks içinde mayalar, yalancı ve gerçek hifler bulunmaktadır. Bu hif yapıları biyofilmin çok katmanlılığında ve yapısal bütünlüğün sağlanmasında esas rolü oynamaktadır. Quorum sensing molekülü olarak farnesol hif formunun oluşumunu inhibe ederken tirosol ise uygun şartlarda germ tüp ve filamentöz oluşumu indüklemektedir. Candida biyofilmlerinde antifungal ilaçlara direnç planktonik formlarından oldukça fazla saptanmıştır(14, 21, 22).

Plöidi ve Eşeyli Çoğalma: *C. albicans* genellikle izole edildiği gibi diploiddir ve sekiz çift homolog kromozoma sahiptir. MTL (Mating Type Locus) gen bölgesi eşeyli çoğalmayı sağlamaktadır ve genelde heterozigot olup, α/α allellerini içermektedir. WO-1 (beyaz/ opak) fenotipik dönüşümü gösteren suşlarda opak hücrelerin, MTL açısından (a/a) veya (α/α) olarak homozigot gen bölgesine sahip olduğu saptanmıştır. Böyle suşlarda özellikle insan derisinde çaprazlaşmalar sonucu $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ tetraploid yavrular oluşabilir; bunlar virulansı düşük formlardır; kalan hücreler ise mayoz dışı çoğalma yolu ile kromozom kaybına uğrarlar ve varlıklarını diploid veya anöploid yeni hücrelerle sürdürmektedirler. Opak hücrelerde üretilen α feromonunun, beyaz formlarda biyofilm üretimini artırdığı saptanmıştır. Azollere karşı dirençli *C. albicans* suşlarında MTL bölgesindeki homozigot allellerin ERG 11 direnç genleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(14, 16) .

2.5.Epidemiyoloji

200'den fazla türü tanımlanan Candidaların sadece yaklaşık 15-20 türü insanlar için hastalık etkenidir. İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinden *C. albicans* daha sık olmakla birlikte Candidalar izole edilmektedir. GİS (gastrointestinal sistem) izolatlarının %0-55'ini, vajen izolatlarının %2,2-68'ini *C. albicans* oluşturmaktadır. Sıklık sırası ile *C. tropicalis* en çok orofarenkste, *C. glabrata* vajende ve GİS'te kolonizedir. Bu kolonizasyon hospitalize hastalarda daha yüksek oranda gözlenmektedir (23).

Bir yandan tümör veya organ nakli sebebiyle uygulanan agresif kemoterapiler, invaziv tanı ve tedavi araçlarının kullanımında artış, artmış immunsupresif konak sayısı sebebiyle artan invaziv fungal enfeksiyon sıklığı diğer yandan laboratuvarlarda daha gelişmiş tanımlama ve antifungal duyarlılık yöntemlerinin katkısıyla epidemiyolojik veriler son yıllarda oldukça değişmektedir (24).

Candidalar invaziv fungal enfeksiyonların en sık etkenidir ve son yıllarda özellikle non-albicans Candida türlerinin artışı dikkat çekmektedir. Artan fırsatçı fungal enfeksiyonlarla birlikte azol türevi antifungal ilaçların profilaktik olarak kullanılması *C. albicans* suşlarında flukonazole duyarlılığın azalmasına ve *C. glabrata*, *C. krusei* gibi non-albicans Candida türlerinin invaziv enfeksiyonların etkeni olmasına neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda en fazla *C. parapsilosis* sıklığında artış görülmekte, bu artışın büyük bir kısmını çocuk hastalar ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen suşlar oluşturmaktadır (25-27). Ülkemizdeki birçok merkezde yapılan çalışmalarda da *C. albicans* %38-53 oranıyla fungemi etkeni olarak halen ilk sırada yer almaktadır, *C. parapsilosis* %14-30, *C. tropicalis* %5,5- 14 ve *C. glabrata* %5,5- 12 sıklık oranları ile diğer fungemi etkeni olarak izole edilen türlerdir (28-30).

2.6.Sık Karşılaşılan Patojen Türlerin Bazıları

Candida albicans: Mısır unlu agarda klamidospore ve /veya blastokonidya üretmesi tanıya yardımcı olur. Maya hücrelerinin filamantöz uzantısı olan gerçek germ tüpü *C. albicans* 'ta maya hücresinin yarısı genişliğinde 3 katı uzunluktadır, boyun kısmında daralma yoktur. Tüm *C. albicans* suşları germ tüp testi pozitif olmayıp (yaklaşık %5'i) mısır unlu agara ekimi yapılmalı biyokimyasal testler uygulanmalıdır (4). Virulansı en yüksek türdür, maya-hif döngüsü oluşturur ve hidroliz enzimleri içerir. Fırsatçı mantar enfeksiyonları oluşturur. En sık kandidiazis etkenidir. A ve B serotiplerinden klinik örneklerde serotip A daha sayıca fazla olmakla birlikte serotip B sıklığı artmaktadır (13, 14, 31).

Candida dubliniensis: Germ tüpü ve klamidospore oluşturmaması *C. albicans* 'a benzer özellikleridir. 45°C'de çok zayıf üremesi veya üreyememesi, beta-glukozidaz aktivitesi olmaması gibi özellikleri ile ayrılrsa da bu iki türün ayırımında en güvenilir yöntem PCR'dır. Bu türün patojenitesi HIV+ hastalarda daha sık görülür. Bu organizmanın flukonazole hızla direnç geliştirmesi nedeniyle tanımlanması önemlidir (14).

Candida tropicalis: SDA'da 2-3 günlük inkübasyonla kremsi koloniler olgunlaşırken yüzeyde pellikül (zarımsı katman) oluşturur. Yalancı hif ve blastokonidya oluşturur. Nadiren gerçek hif ve gözyaşı şekilli klamidospore oluşturur. İkinci en sık yüksek virulanslı mantar patojendir. Nötropenik lösemili hastalar veya diğer hematolojik maligniteli hastalarda fungemiler sık görülmektedir. Mukozal yüzeylerde kolonizasyon yapabilmektedir (31-33).

Candida glabrata: Diğer türlere göre daha yavaş ürer, yalancı hif oluşturmaz. Genellikle üriner sistem enfeksiyonlarının etkeni olup invaziv enfeksiyonlarda sıklığı artmaktadır. Flukonazole direnç artmakla birlikte, kaspafungine duyarlılığı azalmış ve dirençli suşlar bildirilmektedir (4, 14).

Candida parapsilosis (kompleks): Mısır unlu agarda 3 günlük inkubasyon sonrası 'çalı' , 'çam ormanı' görünümüne benzer satellit üreme paterni göstermesi bu türü tanımlamada önemli bir ipucudur. Moleküler analizlerle grup I (*C. Parapsilosis sensu stricto*), II (*C. Orthopsilosis*), III (*C. Metapsilosis*) şeklinde sınıflandırılmış olup klinik Nazokomiyal enfeksiyonlarda kaynak hastane personellerinin elleri olabilmektedir. *C. parapsilosis*'e bağlı endokardit, endoftalmit, peritonit olguları da bildirilmiştir. Ekinokandinlere karşı duyarlılığı azalmış suşlar saptanmıştır (4, 14, 34).

Candida kefyr: Eski adı *C. pseudotropicalis*'tir. Telemorfu *Kluyveromyces marxianus*'tur. SDA'da 25°C'de 72 saat inkübasyon ile diğer *Candida* kolonilerinden daha küçük koloniler oluşturur. Mısır unlu agar preparatlarında blastokonidyumların dizilimi 'nehirde yüzen kütük' görünümündedir. Genellikle non-patojenik tür olarak bilinen *Candida kefyr* son yıllarda GİS, genitoüriner sistem ve akciğer enfeksiyonlarında etken olarak tanımlanmaya başlamıştır (14, 35).

Candida krusei: Telemorfu *Issatchankea orientalis*'tir. SDA'da kuru, basık ve büyük koloniler oluşturur. Mısır unlu agar preparatında uzun 'ağaç' benzeri dizilim gösteren blastosporlar görülür. 25°C'de 3 günlük inkübasyon sonunda Sabouraud dekstrozu (SDB) yüzeyde kalın bir pedikül oluşturarak ürer. Önemi giderek artan fırsatçı bir patojendir. Nötropenik hastalarda ağır seyreden enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Flukonazole doğal dirençlidir (14, 36).

Candida guilliermondii: Mısır unlu agar preparatlarında kökene bağlı olarak az ya da çok fazla yalancı hif ve hiflerin boğumları çevresinde blastospor kümeleri görülmektedir. İnsanlardan, hayvanlardan ve çevresel kaynaklardan izole edilebilir. Damar içi madde bağımlılarında endokardite, heparin solüsyonlarına kolonize olarak yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde nazokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Flukonazole karşı azalmış duyarlılık bildirilmektedir(14, 37).

Candida lusitanae: İmmun yetmezlikli hastalarda sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Amfoterisin B'ye karşı doğal dirençli suşları nadir görülse de tedavide dikkat gerektirmektedir (14).

2.7. Candida Enfeksiyonları

Candida türleri deri ve mukozalarda yüzeysel enfeksiyonlara neden olmakta, immün enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynayan risk faktörleri; İmmünespresif tedavi almış olmak, diabetes mellitus (DM), kronik renal yetmezlik, maligniteler, organ transplantasyonu, nötropeyi, akut pankreatit, geçirilmiş batın cerrahisi, hemodiyaliz, ağır sepsis, mekanik ventilasyon, TPN kullanılması, santral venöz kateter ve/veya üriner kateter varlığı, Candida kolonizasyonu, hastanede yatış süresi, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi daha çok konağa ait çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (38-40).

Retrospektif çalışmalarda invaziv kandida enfeksiyonlarının tanısının ve tedavisinin gecikmesi ile ölüm oranları arasında ilişki görülmektedir. Candida enfeksiyonlarını öngörmek ve antifungal tedaviye erken geçebilmek adına yoğun bakım hastaları için 'Candida kolonizasyon indeksi' ve 'Candida skoru' gibi skrolama şablonları geliştirilmektedir (41).

2.7.1. Yüzeysel Candida Enfeksiyonları

Genellikle kişinin kendi florasından kaynaklanır, bulaş yoluyla da gelişebilmektedir. Oral mukozada akut pseudomembranoz oral kandidiazis (pamukçuk), kronik atrofik kandidiazis, kronik hiperplastik kandidiazis formunda lezyonlar oluşturmaktadır. Pamukçuk sadece bebeklerde ve yaşlılarda değil CD4+ hücre sayısı düşük olan HIV pozitif hastalarda, immünespresif tedavi alanlarda, inhaler steroid alanlarda da görülebilmektedir. Oral Candida enfeksiyonlarında en sık saptanan etken *C. albicans*'tır, kanser tedavisi alan hastalarda *C. glabrata* da sıklıkla orofaringeal kandidiyazis etkeni olabilmektedir.

Orofaringeal lezyonlarla birlikte veya bağımsız bir bulgu olarak ortaya çıkabilen Candida özefajiti derin enfeksiyon olarak da sınıflandırılabilir. Genellikle AIDS hastalarında görülmektedir.

DM, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı gibi risk faktörlerinin de zemin oluşturması ile kadınların birçoğunda Candida vulvovajinti meydana

gelmektedir. Genellikle vulva-vajende kaşıntı, eritem ve süt kesiği gibi görünen kötü kokulu vajinal akıntı hastanın kliniğine eşlik eder. Olguların %80 etkeni *C. albicans* nadiren ise *C. glabrata* ve *C. africanum*'dur. Azollere karşı gelişen direncin artması tedavinin başarısızlığına ve tekrar eden vajinitlere sebep olmaktadır. Erkeklerde gelişen penil kandidiazis (balanit) sıklıkla DM ile ilişkilidir.

Candidalar özellikle *C. albicans* obez ve DM'li hastalarada koltuk altı, meme altı, kasık, parmak araları gibi nemli deri katlantı yerlerinde kutanöz kandidiazislere sebep olmaktadır. Primer kutanöz kandidiazislerin en yaygını intertrigodur, püstüler lezyon olarak başlar fakat daha geniş eritemli lezyonlara da sebep olabilmektedir. Doğumdan sonra bebeklerde vezikülopüstüler lezyonlarla seyreden konjenital kutanöz kandidiazis nadiren görülmektedir. Bebeklerde bez kullanımına bağlı olarak perianal bölgede ise diaper raş görülebilmektedir.

Tırnaklarda mantar enfeksiyonları sık görülmektedir. Bunların %5-10'undan Candidalar (*C. albicans* ve *C. parapsilosis*) izole edilmektedir. Su ile teması sık olanlarda baş ve orta parmaklarda paronişi daha sık görülmektedir.

Hayatın ilk yıllarında konjenital endokrinopatiler ve hücrel immün yetmezliklerle birlikte ortaya çıkan saçlı deri, yüz ve ayaklar başta olmak üzere parmak uçları ve tırnakları da tutan; kronik mukokutanöz kandidiazis olarak adlandırılan klinik bir tablo meydana gelmektedir. Endokrinopatiler, timoma, sağırılık gibi Candida enfeksiyonuna eşlik eden bulgu ve semptomlar tanı için önem arz etmektedir (14).

2.7.2.İnvaziv Kandida Enfeksiyonları

Herhangi bir organ tutulumu olmadan en az bir kan kültüründe Candida üremiş olması kandidemi demektir. %40 mortal seyreden bu klinik tabloda etken olarak *C. albicans* dışı Candida türlerinin sıklığı artsa da ilk sırada hâlâ %40-70 oranlarında *C. albicans* saptanmaktadır.

Sistemik kandidiazis akut dissemine kandidiazis, kronik dissemine kandidiazis (hepato-splenik), kateter ilişkili kandidiazis ve derin organ kandidiazisi şeklinde dört klinik tablo şeklinde görülebilmektedir. Akut dissemine kandidiaziste birbirinden bağımsız iki organa hematojen yolla yayılım görülmektedir. Bu klinik tablo nötropenik olmayan hastalarda da görülebilmektedir. Fulminan seyirli olup genelde geniş

spektrumlu antibakteriyel tedaviye dirençli bir ateşle seyretmektedir. Endoftalmi, kutanöz lezyonlar, menenjit, beyin apsesi, renal apse, endokardit, myokardit gibi komplikasyonlara sık rastlanmaktadır. Kronik dissemine kandidiazis ise lösemili nötropenik hastalarda ısrarcı ateşle seyreden karın ağrıları, fizik muayenede hepatosplenomegali, artmış alkalen fosfataz (ALP) düzeyi, abdominal tomografide çoklu lezyonlar görülen bir klinik tablo oluşturmaktadır. Diğer karaciğer fonksiyonunu gösteren enzimler normal seviyede seyretmektedir. Kan kültürleri çoğunlukla negatif saptanmaktadır. *C. albicans* başlıca etiyolojik ajandır, ancak *C. tropicalis* de bazen rol oynamaktadır.

Dissemine kandidiazisli düşük doğum ağırlıklı bebeklerde Candida menenjitisi sık görülmekle birlikte, yetişkinlerde genellikle cerrahi sonrası bir komplikasyon olarak meydana gelmektedir. Uzun süreli geniş spektrumlu antibakteriyel tedavi, çoklu nöroşirürji prosedürleri, önceki bakteriyel menenjit ve inatçı BOS kaçağı önemli risk faktörleri olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon hematojen yayılım, organizmaların subdural boşluğa doğrudan inokülasyonu veya ventriküloperitoneal şantın distal kısmı boyunca yayılan retrograd sonucunda ortaya çıkmaktadır. Candida menenjit genellikle minimal ateşle birlikte kaba bir seyir izler. Klinik bulguları spesifik değildir ve beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları normal olabilmektedir. BOS kültürlerinin yaklaşık % 50'sinde pozitiflik görülmektedir.

Merkezi sinir sistemi kandidozunun diğer formları arasında beyin apsesi ve yaygın metastatik ensefalit bulunmaktadır. Bu klinik tablolar yaşam boyunca nadiren görülmektedir. Büyük beyin apseleri fokal nörolojik bulgulara neden olmaktadır, Lezyonlar manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya bilgisayarlı tomografi (BT) taramalarıyla tespit edilmektedir. Mayaların hematojen yolla yayılması daha sık belirgin nörolojik defisit üretmeyen çok sayıda küçük lezyonla sonuçlanmaktadır.

İdrarda Candida türlerinin varlığı yaygın olarak kalıcı bir idrar sondasının varlığına bağlı olarak alt üriner sistem kolonizasyonu veya enfeksiyonunu temsil etmektedir, bazen de böbrek kandidozunun bir göstergesi olmaktadır. Klinik görünüm değişkendir, ancak bakteriyel enfeksiyonları olanların aksine, kandidüri hastalarının çoğunda semptom yoktur. Kandidüri, antifungal tedavi verilsin ya da verilmesin, kateter yerinde iken devam etme eğilimindedir. Bununla birlikte, çoğu durumda,

kateterin çıkarılmasıyla sorun çözülmektedir. En sık *C. albicans* izole edilmektedir. Üretral kateterli ve diabeti olan hastalarda % 30 oranında *C. glabrata* etken olarak saptanmaktadır ve sıklıkla antifungal tedaviye dirençli enfeksiyonlara sebep olmaktadır.

Dissemine kandidiazisli hastaların %80'inde hematojen yayılım ile renal apse gelişebilmektedir. Hif kümelerinden renal pelvis ve üreterlerde tıkaçlar oluşup hidronefroza ve anüriye sebep olmaktadır.

Pulmoner kandidiazis mayaların hematojen olarak yayılmasının ardından veya kolonize orofaringeal veya mide içeriğinin aspirasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durum nötropenik hastalar arasında en yaygın olanıdır, ancak yoğun bakım tedavisi alanlarda da tanımlanmıştır. Alt solunum yolu kolonizasyonunu enfeksiyondan ayırt etmede güçlükler nedeniyle yaşam boyunca nadiren tanı konmaktadır. Klinik ve radyolojik prezentasyon spesifik değildir. Ateş, taşipne göğüs radyografilerinde yaygın nodüler infiltratlarla başvuran hastaların kliniği nozokomiyal pnömoninin diğer nedenlerinden ayırt edilememektedir. Bronkoalveoler lavaj (BAL) örneklerinin mikroskopik incelenmesi ve kültürü, kolonizasyonu enfeksiyondan ayırt edilememektedir. Bu kandidoz formunun kesin tanısı, akciğer dokusundaki mayaların histopatolojik olarak konmaktadır.

Hematojen yolla osteomyelite, myokardite, hatta endoftalmiye; travma veya cerrahi girişim sebebiyle artrite, peritonite sebep olmaktadır. Kalp kapak anomalisi olanlarda, protez kapağı olan hastalarda, uzun süreli intravasküler kateter varlığında *Candida* endokarditleri de görülmektedir (14, 42).

2.8.Candidaların Laboratuvar Tanısı

Candida enfeksiyonlarında etkeni izole edebilmek için klinik materyalin uygun yerden doğru şekilde, asepsi kurallarına uyarak steril kaplara alınması ve en geç iki saatte laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir. Etkenin laboratuvar tanısında direkt mikroskopik inceleme, kültürden izolasyon ve identifikasyon yer almaktadır (4).

2.8.1.Direkt Mikroskopik İnceleme

Tanı için alınan klinik örneklerle yapılan direkt incelemedir. Klinik örneklerde etkenin belirlenmesi açısından yapılacak ilk işlem hızlı ve maliyeti düşük bir yöntem

olan direkt mikroskopik inceleme olmaktadır. Direkt mikroskopik incelemede; %10-30 KOH ile muamele edilen boyasız taze preparat, Gram, Giemsa, metilen mavisi gibi bazik boyalar veya kalkoflor beyazı gibi floresan ile boyanan preparat değerlendirilmektedir (4). KOH, konak hücrelerindeki protein yapıları sindirip mantar hücre duvarına zarar vermeden belirgin hale getirmektedir. Gram boyama Candidaların tespitinde daha sık kullanılmaktadır. Mayalar gram boyamada genellikle gram pozitif tomurcuklanmış maya hücreleri şeklinde görülmektedir. Direkt mikroskopik incelemede görülen tomurcuklanan maya hücreleri, hif ya da yalancı hifler tanıda anlamlı kabul edilmektedir. Tüm bu fotomikrografik bulguların görülememesi mantar enfeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmamaktadır (4, 43, 44).

2.8.2.Kültür

Klinik örneklerden Candidaların izolasyonu için SDA, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, mycosel veya mycobiotic agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır. Candidalar kanlı agar, Eozin Metilen Blue (EMB) agar gibi rutin bakteriyoloji laboratuvarında sık kullanılan besiyerlerinde 24-48 saatte kolayca üreyebilse de identifikasyon için primer izolasyonda genellikle SDA tercih edilmektedir. Polimikrobiyal örneklerde mantar dışı etkenlerin ve olası kontaminant bakteri veya küf mantarlarının üremesini önlemek amacıyla SDA besiyerine gentamisin, kloramfenikol, streptomisin, sikloheksimid (Actidione) gibi inhibitör ajanlar eklenerek kullanılmaktadır. Ekim yapılan besiyerleri hem 22-26°C’de hem de 37°C’de inkübe edilirken genelde 24-72 saatte üreme tespit edilmektedir. Üreyen ekşi mayamsı kokulu mat görünümlü gri beyaz renkli yumuşak dokulu maya kolonileri ileri tanımlama amacıyla mısır unlu agar ve kromojenik agar besiyerlerine pasajlanmakta, çeşitli karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testlerinde veya otomatize sistemlerde kullanılmaktadır (4, 13).

2.8.3.Germ Tüp(Çimlenme Borusu) Testi

Germ tüp maya hücresinin 3-4 katı uzunluğunda, yarısı kadar genişlikte filamentöz uzantısı olup bu uzantının maya hücresiyle bağlantılı olduğu yerde bir daralma bulunmamaktadır. Germ tüp gerçek hifal yapının başlangıcı kabul edilmektedir. *C. albicans* suşlarının %5’lik kısmı dışında tüm suşları gerçek germ tüp oluşturmaktadır. Germ tüp testi yaparken test yapılacak mayanın yarım veya bir

kolonisi 0,5 ml tavşan ya da insan serumunda 37°C’de yaklaşık iki saat inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrası bir damla maya-serum süspansiyonundan lama damlatılıp, lamel kapatılarak mikroskopta germ tüp varlığı değerlendirilmektedir. Üç saatten uzun inkübasyon süresi, yoğun maya inokulumu, bakteri ile kontaminasyon germ tüp oluşumunu engelleyebilmektedir. Germ tüp testi pozitifliğinde *C. albicans* ilk akla gelen ve raporlanan tür olmaktadır ancak *C. dubliniensis* de germ tüp oluşturmaktadır. Gerekirse bu iki türün ayrımı ek testlerle yapılmaktadır. *C. tropicalis* ise germ tüp ile karışan hif başlangıcı benzeri yapılar üretmektedir fakat hifin maya hücresiyle bağlantılı yerinde darlık görülmektedir (4, 45).

2.8.4.Mısır Unlu Agar Preparatı

Mısır unlu agar preparatında oluşan üreme şekilleri *Candida* türlerinin ayırıcı ön tanısında büyük fayda sağlamaktadır. Mısır unlu agara inokülasyon yaparken taze üremiş koloniden çok az bir miktar öze ile alınıp besiyeri yüzeyine çizgi şeklinde ekim yapılmakta, agarın üzerine ekim çizgilerini örtecek şekilde steril edilen bir lamel kapatılmaktadır. Mısır unlu agar 25-30°C de 48-72 saatlik inkübasyon sonrası lamelin üzerinden mikroskopik değerlendirmeler yapılmaktadır. Değerlendirme yapılırken ilk olarak yalancı hif ve blastokonidya varlığına bakılmaktadır, görülmesi halinde bilinmeyen izolat *Candida* cinsi içinde kabul edilmektedir. Mısır unlu agar preparatında *Candida albicans*’ın fotomikrografında klamidospor, yalancı hif boyunca dağılmış yoğun blastokonidya kümeleri tanımlamada yol göstericidir. *Candida tropicalis*’in fotomikrografında ise yalancı hiflerin daraldığı yerlerden çıkan hif boyunca düzensiz yerleşen az sayıda blastokonidya oluşumu görülmekte fakat bu görünüm bu türe özgün olmayıp karbonhidrat asimilasyon testlerine veya maya tanımlama sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *C. glabrata* mısır unlu agar preparatında kapsülenden ayrılma göstermeyen sıkı dizilmiş maya hücre kümeleri şeklinde görülmektedir. Mısır unlu agar preparatında çok sayıda fokal alanı olan çalı görünümünde satellit üreme paterni ve dev hifler *C. parapsilosis* ön tanısı için oldukça değerlidir. *C. kefir* fotomikrografında çok sayıda dikdörtgen şekilli uzun gevşek bağlantılı blastokonidya nehirde yüzen kütük şeklinde görünümü oluşturmaktadır. Yalancı hifler, kibrit çöpü kümesi gibi dizilim gösteren uzamış blastosporlar oluşturan *C.krusei* *C. kefir* ile benzer paternlidir. Bu türlerin ayrımında da karbonhidrat asimilasyon testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (4, 31).

2.8.5.Kromojenik Besiyerinde Morfoloji

Candidalara özgü kromagar, karışık üreme gösteren kültürlerde Candida türlerinin ayırımında veya primer izolasyon besiyeri olarak, koloninin rengine bağlı olarak erken tanı koymaya yardımcı olmaktadır. Bu besiyerlerinde farklı kromojenik substratlar vardır ve üreme oluştuğunda açığa çıkan enzimler (β -hekzosaminidaz) aracılığı ile substratın yıkılmasıyla oluşan kromojenik ürün, koloni renklerini değiştirmektedir. Bu besiyerleri *C. albicans* tanımlanmasında oldukça başarılıdır. Kromojenik substratın özelliğine göre *C. albicans* sarı-yeşil koloniler oluşturur. Ayrıca *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*'nın koloni renkleri de tanımlamaya destek olmaktadır. Ancak kromojenik agarlardaki türe bağlı renk çeşitleri besiyerinin üretildiği ticari firmaya göre değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalar üremiş kan kültür şişelerinin gram boyasında maya hücreleri var ise hemen kromojenik agara pasajlanmasını önermektedir (4, 36).

2.8.6.Biyokimyasal Tanı

Candida türleri karbonhidratı, oksijen varlığında (asimilasyon) ve oksijensiz şartlarda (fermentasyon) tek karbon kaynağı olarak kullanabilmesine göre tanımlanmaktadır. Bu amaçlarla API 20C AUX, API Candida, RapID Yeast Plus system, Bacti-Card Candida, gibi ticari testler ve ID 32C, Vitek 2 ID-YST, Abbot Quantum II gibi otomatize sistemler mevcuttur. Bu sistemlerde farklı substratlar olan kuyucuklarda gelişen kimyasal reaksiyonlar turbidite artışı veya renk üretimi değerlendirilerek tanımlanmaktadır. Bu testlerin çoğu 24-72 saatte sonuç vermektedir. Rutin laboratuvarlarda en sık kullanılan API 20 C AUX testleridir. Ticari tanımlama sistemleri sık görülen mayaların tanımlanmasında nadir türlere çok daha başarılıdır (46, 47).

2.8.7.Üreaz Testi

Mayanın üreaz oluşturma yeteneğini araştırmak için kullanılmaktadır. Üreaz aktivitesi ile mayalar üreyi hidroliz eder ve amonyak oluşturur. Amonyak ise pH'ı yükselterek besiyerinde sarıdan pembeye renk değişimine neden olmaktadır. Üreaz testi Candida türlerinin, Trichosporon gibi üreaz pozitif diğer mayalardan ayırımında kullanılmaktadır. *C. lipolytica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları dışında, Candida türleri üreaz negatiftir (36).

2.8.8.Hızlı Testler

Koloninin olduğu gün içinde kesin veya olası hızlı tanımlamayı sağlamak için kullanılmaktadır. *C. glabrata*'nın trehalozu asimile etmesine dayanarak tanımlama yapan hızlı bir test bulunmaktadır. Bu testte kolonilerin SDA ve kromojenik agar besiyerlerinden alınması halinde yanlış pozitiflikler görülmektedir. Duyarlılığı ve özgüllüğü %94'ün üzerinde bulunan bir diğer testte (GLABRATA RTT) trehaloz ve maltoz hidrolizi değerlendirilmekte ve bu test 15-20 dakikada sonuç vermektedir. Germ tüp pozitif olan mayaların *C. albicans* olarak doğrulanmasında da hızlı testler uzun süren tanımlama testlerinin yerine kullanılabilir (36, 48).

2.8.9.Serolojik Yöntemler

Serolojik testlerde mantar antijenlerine karşı oluşan antikorlar veya mantar antijenleri ve metabolik ürünleri tespit edilmektedir.

Mannoz, enolaz ve ısıya duyarlı antijen tespiti invaziv Candida enfeksiyonlarının tanısında oldukça değerlidir. Rutin laboratuvarlarda en sık kullanılan mannan antijen testidir. Mannanın kan ve diğer vücut sıvılarında düzeyi hızlı düşmekte dolayısı ile tespiti için hastadan sık örnek alınması gerekmektedir. Antijen testleri ve antikor testlerinin birlikte uygulanıp değerlendirilmesi tanıya daha çok yardımcı olmaktadır. Candidaların hücre duvarında bulunan bir antijeni olan β -D-glukanın kanda saptanabilmesi için FDA onayı almış testleri piyasada ticari olarak bulunmaktadır. Candidanın invaziv enfeksiyonlarının erken tanısında kullanılmaktadır fakat diğer mantar enfeksiyonlarında da pozitif sonuçlar olabilmektedir (44, 49).

Candida türlerine karşı oluşan antikorlar lateks aglütinasyon, İFA, RİA ve enzim immünoassay (EIA) yöntemleri ile araştırılmaktadır. Fakat immün sistemi baskılanmış hastada yeterli antikor oluşamaması, pozitif antikorların kolonizasyon ve enfeksiyonu ayırt edememesi, nötralizan antikorlar, anti-mannan antikorunun hızla kandan uzaklaşması nedenleriyle antikor aranmasının duyarlılığı düşüktür. Mannan dolaşıma geçtiğinde güçlü bir anti-mannan antikor yanıtı oluşturmaktadır. Anti-mannan antikorlar da kolonizasyon ile invaziv enfeksiyonu ayıramamaktadır. Aspartik proteinaz, metallopeptidaz ve enolaz gibi Candida antijenlerine karşı oluşan antikorlar, tanıda araştırılabilir (50).

2.8.10.Moleküler Yöntemler

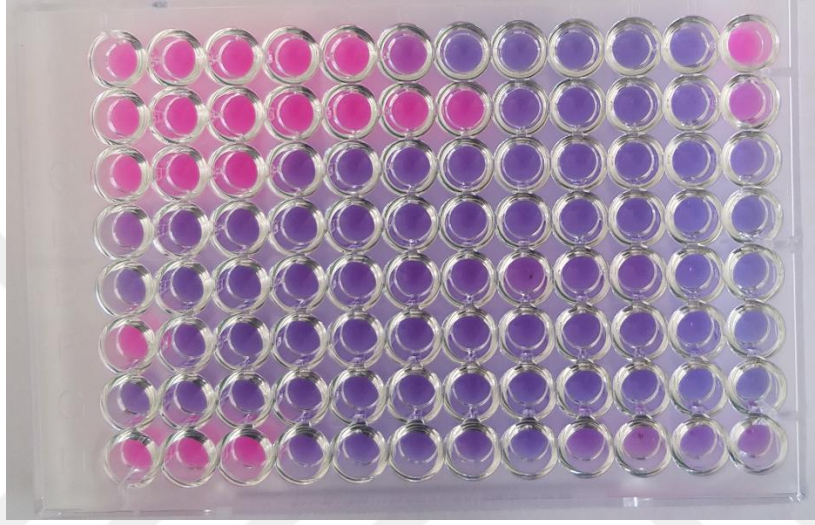
Mikoloji laboratuvarlarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı; patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce kısa sürede saptanması ve kültürde üretilmiş olan mantarın kısa sürede tanımlanmasıdır (92). Mantara ait DNA'nın tespiti, immun sistemden bağımsız olup, daha antikor oluşmadan erken tanıyı sağlayabilmektedir. Birden fazla etkenin oluşturduğu enfeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanımlayabilme kolaylığı sağlamaktadır (88). Klinik örneklerden mantarın saptanması ve tanımlanması için ilk olarak örnekten nükleik asitler açığa çıkarılıp çoğaltılacak bir hedef seçilmektedir ve ardından hedef bölgenin varlığını tanımlayan PCR, DNA problemleri ve floresan in situ hibridizasyon gibi yöntemler belirlenmektedir. Klinik örneklerden mantarların saptanmasında moleküler yöntemler, diğer yöntemlere göre yüksek duyarlılıklara sahiptir. Kolonizasyon, subklinik enfeksiyonlar nedeniyle asemptomatik hastalarda pozitif PCR sonuçları olabilmektedir. Candida DNA kantitasyonu ile kolonizasyonla invaziv enfeksiyon ayrımı yapılabilmektedir (14).

2.9.Antifungal Duyarlılık Testleri

Mayaların antifungal ajanlara duyarlılıklarını belirlemek için CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) Antifungal Duyarlılık Test Alt Komitesi standart yöntemler oluşturmuştur. Bu standartlar ışığında özellikle mayalar için klinik sonuçlarla uyumlu ve daha kullanışlı kavuzlar geliştirilmektedir. Bunlar CLSI tarafından maya (CLSI, M27-A2) ve küfler (CLSI, M38-A) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, CLSI tarafından Candidalar (flukonazol, vorikonazol) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir (EUCAST E.Dis 7.1). MİK direnç sınır değerleri, henüz sadece Candida-flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve flusitozin için belirlenmiş olup, diğer mantarlar ve antifungal ajanlar için direnç sınırları kesin bilinmemektedir (51).

Dilüsyon temeline dayalı yöntemler olan buyyon (sıvı) makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri referans yöntem olarak kabul edilmekte olup sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antifungal duyarlılık testleri içinde çoğunlukla tercih edilen

yöntemdir. Agar dilüsyon yöntemi de nadir kullanılan bir diğer dilüsyon temeline dayalı yöntemdir. Sensititre YeastOne kromojenik olarak değerlendirilen 96 kuyucuklu ticari bir mikrodilüsyon plağıdır. YeastOne sistemi, referans mikrodilüsyon yöntemleri ile yüksek oranda uyumlu sonuçlar vermektedir. 24 saatte MİK sonucunu verebilmesi ve yorumlanmasının daha kolay olması YeastOne sistemini daha avantajlı hale getirmektedir (52). Resim 1’de Sensititre YeastOne ile yapılan antifungal duyarlılık çalışmasına ait mikropalak görüntüsü verilmiştir.



Resim 1 Sensititre YeastOne ile yapılan antifungal duyarlılık çalışması (Çalışmamızdan)

Difüzyon temeline dayalı bir yöntem olan disk difüzyon yöntemi CLSI M44-A kriterlerine göre flukonazol (25µg) ve vorikonazol (1µg) diskleri kullanılarak Candidalar için de kolayca uygulanabilmektedir. Sonuçları referans yöntemlerle koreledir. Gradient difüzyon yöntemi bir antimikrobiyalın, dengeli şekilde artan konsantrasyonda yerleştirildiği plastik bir şerit aracılığıyla agar besiyerine difüzyonu temeline dayanmaktadır. Strip gradient test ile MİK değerleri 24-48 saatte tespit edilebilmektedir (53).

Ergosterol sentezinin kantitasyonu ve flovsitometrik yöntemler de antifungallerin etkin olup olmadığı hakkında bilgi veren ve daha çok bilimsel araştırmalarda kullanılan yöntemlerdir (4).

Birden fazla antimikrobiyalın kombinasyonlarının etkinliğini in vitro ölçmek için, dama tahtası (Checkerboard) titrasyon yöntemi, zamana bağlı öldürme kinetiğinin

değerlendirilmesi (Time-kill), disk difüzyon ve gradient difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır.(54)

2.10.Antifungal İlaçlar

Nistatin ve Amfoterisin B Streptomyces türlerinin metabolitlerinden elde edilen polyen grubu antifungallerdir. Antifungal etkinliğini mantar hücre membranında bulunan ergosterole bağlanıp porlar oluşumuna ve membran stabilitesinin bozulmasına yol açarak oluşturmaktadır. Nistatin yalnızca topikal kullanılırken amfoterisin B parenteral yolla kullanılan geniş spektrumlu bir antifungaldir (12, 14).

Anidulafungin, caspofungin, micafungin gibi ekinokandin grubu antifungaller mantar hücre duvarında bulunan glukanın sentezinden sorumlu 1,3 β -D glukan sentaz enziminin yarışmasız inhibisyonu üzerinden mantar hücre duvarı sentezini bozup mantar hücrelerini lizise uğratmaktadır. Ekinokandinler de sistemik etkili geniş spektrumlu parenteral yoldan kullanılan antifungallerdir (12, 55).

Sitozinin düşük molekül ağırlıklı sentetik analogu olan Flusitozin (5-FC) aktif bir antifungal değildir. Hücre sitoplazmasında sitozin deaminaz tarafından deamine olup bu reaksiyon sonucu oluşan aktif metabolitleri ile DNA, RNA ve protein sentezini inhibe etmektedir. 5-FC dar spektrumludur ve genelde amfoterisin B, flukonazol ile kombine olarak kullanılmaktadır (56).

Azoller antifungal etkilerini, sitoplazmik membran sentezinde görev alan olan sitokrom P450'ye bağlı 14 α -demetilaz enzimini inhibisyona uğratarak göstermektedir. Bu inhibisyon ile etken mantara ve tercih edilen azole bağlı olarak ya fungistatik ya da fungisidal aktivite gösterir (57, 58). Azoller, azol halkasındaki nitrojen sayısına göre imidazoller (ketokonazol, klotrimazol, mikonazol) ve triazoller (flukonazol, itrakonazol vorikonazol) şeklinde ikiye ayrılmaktadır (59). Candida enfeksiyonlarının profilaksisinde ve tedavisinde en çok tercih edilen azol flukonazoldür. *Candida albicans* türleri genellikle flukonazole duyarlıyken, albicans dışı türlerde flukonazol direnç oranları daha yüksektir. *C. albicans* dışı Candida türlerinden *C. krusei*, flukonazole doğal dirençlidir. *C. glabrata* ve *C. tropicalis* suşları flukonazole genellikle dirençli veya doza bağlı duyarlıdır (60).

Azol direnci gelişimini açıklayan birinci mekanizma hücre içindeki ilaç birikiminin azalmasıdır. Membranda yer alan sterollerin, fosfolipitlerin değişimiyle membran geçirgenliğinin azalması sebebiyle hücreye ilaç alımının azalması, ilaç pompa sistemlerin aktivitesinde artış olması hücredeki ilaç düzeyini azaltmaktadır. Mantarların ilaç direncine sebep olan “major facilitator” süper ailesi (MFs) ve ATP bağlayan kaset (ABC) süper ailesi iki tip aktif atılım pompasıdır. *Candida* suşlarındaki azol direnci ile ABC taşıyıcılarını kodlayan CDR genleri ilişkili olup direnç tespit edilen suşlarda CDR1 ve CDR2’nin fazla eksprese edilmektedir. MFs proteinleri yapısal bileşiklerin transportunda görev almaktadır. MFs’ler arasında MDR1 geninin ekspresyonunda artış flukonazole spesifik azol direnci ile ilişkilidir (73). Azol direnci gelişimini açıklayan ikinci mekanizma Erg11p’nin azollere afinitesinin nokta mutasyonlar nedeniyle azalmasıdır. Tespit edilen bir diğer mekanizmada ise ERG11 geninin ekspresyon artışıyla 14- α -demetilaz enzim sentezi aşırı miktarda artmakta ve birden fazla ilaç etkin olsa da enzimin fazlalığı sebebiyle ergosterol sentezi sürmekte ve ilacın etkisi ortadan kalkmaktadır. Azollere direnç tespit edilen mayaların sterol yapıları incelendiğinde, ERG3 ile kodlanan ergosterol sentez yolu mutasyonlarla değişmekte ve dolayısıyla membran sterolünün yapısı değişerek azol direnci ortaya çıkmaktadır (61). Ayrıca oluşan biyofilm ile *Candida*larda ilaç penetrasyonu azaltmakta ve ilaç matriks dışına atılmaktadır. *Candida* patogeneğinde yer alan SAP, *C. albicans* dışında *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* tarafından da salgılanıp konakta invazyon ve adezyon ile antimikrobiyal direnci gelişmesine yol açmaktadır (62).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun B.30.2.ATA.0.01.00/214 sayı ve 22.04.2019 tarihli kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmamıza Haziran 2018 ile Ocak 2020 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gelen örneklerden izole edilen 90 *Candida* suşu dâhil edilmiş ve çalışmamızda kullanılacak zamana kadar gliserollü, boncuklu besiyerinde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmamızda standart suş olarak *C. albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019 suşları kullanılmıştır.

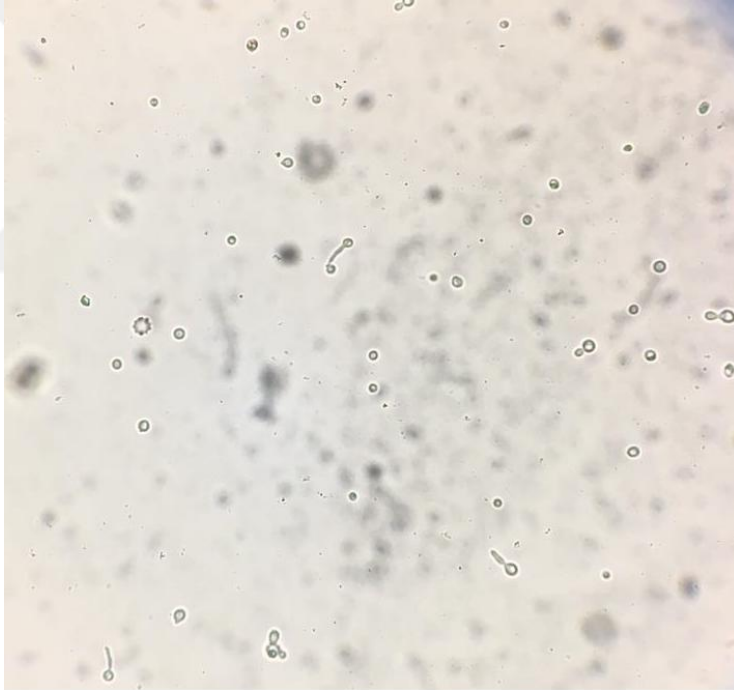
3.1 İlk İzolasyon ve Tanımlama

Laboratuvara gelen BOS, kan, plevral ve periton mayi, vitreus materyali, aspirasyon materyalleri kan kültür şişelerine (BD, New Jersey, ABD) inoküle ekilip BACTEC™ (BD, New Jersey, ABD) otomatize kan kültür cihazına yüklendi. Kan kültür cihazında üreme sinyali veren şişelerden koyun kanlı agar, (Oxoid, İngiltere), çikolatamsı agar (Oxoid, İngiltere) ve EMB agara (Oxoid, İngiltere) pasajlar yapıldı. Etüvde 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon sürelerini tamamlayan pasajların besiyeri üzerindeki üremeleri değerlendirildi. Besiyeri üzerinde üremiş kolonilerin gram boyama ile maya hücresi olduğu tespit edildi ve tür düzeyinde tanımla ile antifungal duyarlılık çalışmaları yapılmak üzere SDA besiyerine (Oxoid, İngiltere) pasajlandı. Laboratuvarımıza gelen idrar ve yara kültürü örnekleri ise koyun kanlı agar ve EMB agara pasajlandı, etüvde 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonunda üreyen koloniler gram boyama ile değerlendirildi. Gram boyamada maya hücresi tespit edilen idrar ve yara kültürlerinden izole edilen suşlar için gönderilen kliniklerle görüşüldü, tür düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık istenen suşlar SDA besiyerine pasajlandı. Steril vücut bölgelerinden izole edilmiş *Candida* spp. suşları, *Candida* enfeksiyonunda tedavi başarısızlığı gelişmesi, bir veya daha fazla antifungale dirençli olduğu bilinen bir *Candida* türünün izole edilmesi ve intravenöz antifungal tedavi sonrası direnç geliştiği

düşünülen durumlar değerlendirildi, çalışma kapsamına alındı ve antifungal duyarlılık çalışmaları yapıldı.

3.1.1.Germ Tüp (Çimlenme Borusu) Testi

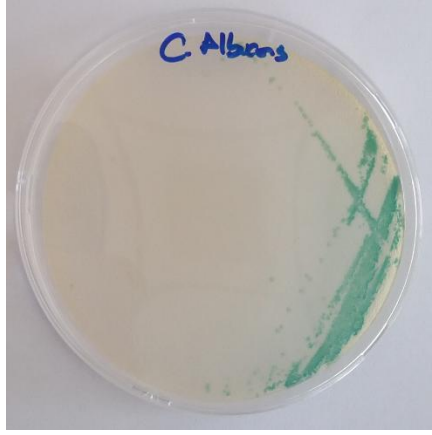
SDA' da üreyen maya kolonilerinden steril bir öze ile yarım koloni kadar alınıp içerisinde 0,5 cc insan serumu bulunan tüp içine aktarıldı. Bu süspansiyonlar etüvde 37°C'de iki saat inkübe edildikten sonra bir damla maya-serum süspansiyonundan lama damlatılıp, lamel kapatılarak ışık mikroskopunda 40x objektifiyle germ tüp varlığı incelendi. Maya hücresinden çıkma noktasında boğumlanma olmayan hifal uzantılar görülmesi germ tüp olarak değerlendirildi ve suşlar *C. albicans* lehine yorumlandı. Resim 2'de *C. albicans*'a ait germ tüp yapısının fotomikrografı verilmiştir.



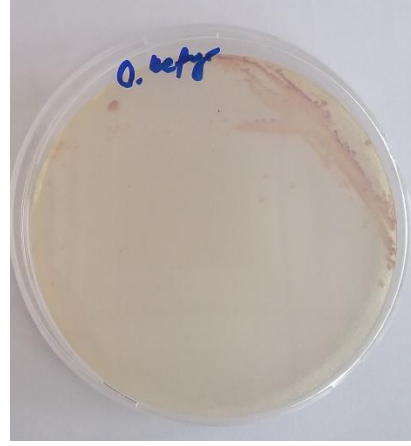
Resim 2 *C. albicans*'a ait germ tüp yapısının fotomikrografı (400x)(Çalışmamızdan)

3.1.2.Kromojenik Besiyerinde Morfoloji

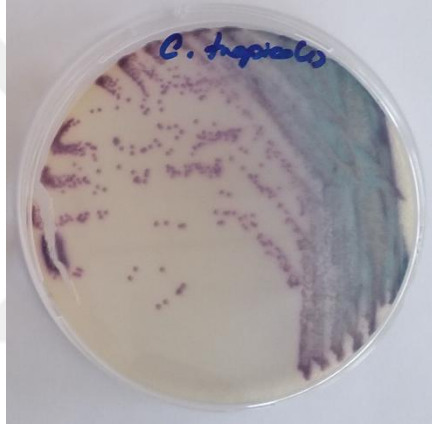
SDA' da üreyen maya kolonilerinden steril bir öze ile alınıp kromojenik agara (HiMedia, Hindistan) pasajlanarak etüvde 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası maya kolonilerinde oluşan renk değişimleri kromojenik agarı temin ettiğimiz üretici firmanın hazırladığı kullanım kılavuzuna göre değerlendirildi. Resim 3, 4, 5, 6'da çeşitli *Candida* türlerinin kromagar morfolojileri verilmiştir.



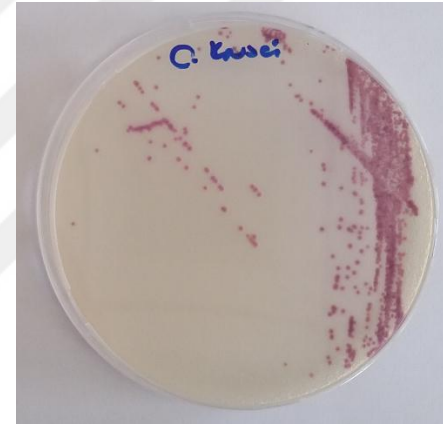
Resim 3 *C. albicans* (Çalışmamızdan)



Resim 4 *C. kefir* (Çalışmamızdan)



Resim 5 *C. tropicalis* (Çalışmamızdan)



Resim 6 *C. krusei* (Çalışmamızdan)

3.1.3. Mısır Unlu Agarda Mikroskobik Morfoloji

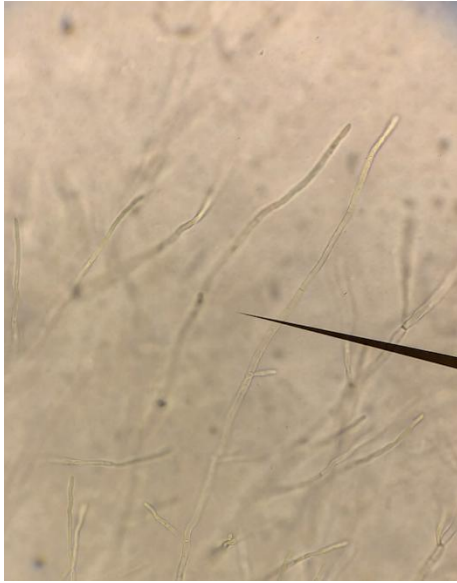
SDA'da üreyen maya kolonileri mısır unlu agara (Hi Media, Hindistan) Dalmau tekniğiyle pasajlanarak ekim çizgilerinin üzeri lamel ile kapatıldı. 25°C'de 48-72 saatlik inkübasyonun sonunda ışık mikroskopunda incelendi. Mısır unlu agar preparatında kalın çeperli klamidospore, yalancı hif boyunca dağılmış yoğun blastokonidya kümeleri *C. albicans* (Resim 7), ayrılma göstermeyen sıkı dizilmiş maya hücre kümeleri *C. glabrata* (Resim 8) olarak değerlendirildi. Çok sayıda fokal alanı olan çalı görünümünde satellit üreme paterni ve dev hifler *C. parapsilosis* (Resim 9) lehine yorumlandı. Dikdörtgen şekilli uzun gevşek bağlantılı blastokonidyalardan nehirde yüzen kütük şeklinde görünümü oluşturması *C. kefir* (Resim 10) lehine yorumlandı.



Resim 7 *C. albicans* (400x) (Çalışmamızdan)



Resim 8 *C. glabrata* (100x) (Çalışmamızdan)



Resim 9 *C. parapsilosis* (400x) (Çalışmamızdan)



Resim 10 *C. kefyr* (100x) (Çalışmamızdan)

3.1.4. BD Phoenix Sistemi ile Biyokimyasal Tanımlama

Maya kolonilerinden Phoenix ID solüsyonunda 2 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar Phoenix Yeast ID kitine inoküle edildi. Kitler BD Phoenix 100 (BD, ABD) cihazında 16 -24 saat inkübe edildi ve

cihazın test ettiği karbonhidrat asimilasyonu ve enzimatik reaksiyonlar gibi biyokimyasal parametreler ile tür tayini tamamlandı.

3.2 Flukonazol Duyarlılık Testi

Suşların flukonazol duyarlılıkları buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI'in M27-A3 ve M27-S4 klavuzlarındaki kriterlere uygun olarak in vitro şartlarda belirlendi.

3.2.1.Besiyeri Hazırlama

Mikrodilüsyon ile duyarlılık testi için RPMI 1640 (bikarbonatsız, L-glutaminli, pH indikatörlü) (Sigma, ABD) besiyeri kullanıldı. Besiyeri için;

- Toz RPMI 1640(Sigma, ABD) 10,4 gr,
- 0.165 M MOPS buffer (Sigma, ABD)34,5 gr

tartılarak 900 ml distile suya ilave edildi ve homojen halde eritildi. Karışımın pH'ı NaOH ile pH 7.0 olacak şekilde ayarlandı. Toplam hacim distile su eklenerek 1000 ml'ye eşitlendi. Besiyeri 0.22 µm çaplı membran filtreler ile steril kaplara süzülerek steril edildi ve +4°C'de 3 ay muhafaza edildi.

3.2.2.Flukonazol Stok Solüsyonu

Stok solüsyonların hazırlanmasında flukonazolün (Pfizer, ABD) liyofilize toz formu ile 5120 mg/L konsantrasyonunda steril distile suda hazırlandı ve -20°C'de çalışma yapılınca kadar muhafaza edildi.

3.2.3.Maya Süspansiyonları

SDA' ya tekrar paşajlanan saf maya kolonileriyle PhoenixSpec (BD, Fransa) cihazında ölçüm yapılarak serum fizyolojik ile 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) bulanıklığında maya süspansiyonları hazırlandı.

3.2.4.Plakların Hazırlanması ve İnokulum

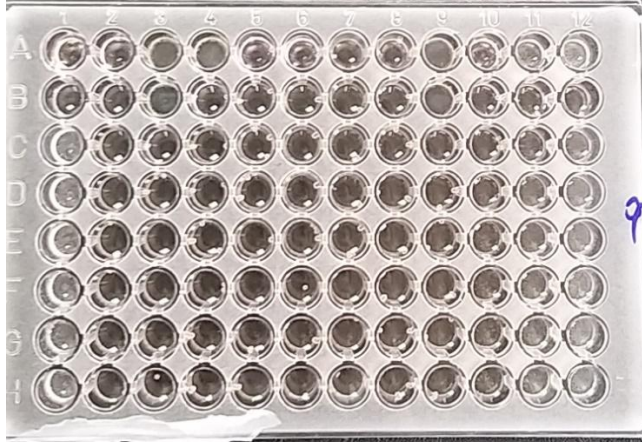
Çalışmaya başlarken önce flukonazol stok solüsyonları dondurucudan çıkarılıp erimesi beklendi. Flukonazol stok solüsyonu RPMI besiyeri ile önerilen final konsantrasyonunun ($64 - 0,125 \mu\text{g/ml}$) iki katı olacak şekilde dilüe edildi. Direnç tespit edilen suşlar için MİK değerlerini belirlemek adına flukonazol konsantrasyonu artırılarak test tekrar edildi. Çalışma için kullanılan steril U tabanlı 96 kuyucuklu

mikroplakların 11 ve 12. kuyucuğuna 100 µl RPMI besiyeri eklendi fakat antifungal eklenmedi. 11. kuyucuk üreme kontrol kuyucuğu, 12. kuyucuk sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlendi. Mikroplağın her bir yatay sırasında en yüksek ilaç konsantrasyonu (64 µg/ml) 1. kuyucuğa, en düşük ilaç konsantrasyonu (0,125 µg/ml) 10. kuyucuğa denk gelecek şekilde ilk kuyucuklara flukonazol otomatik çoklu pipetle 100'er mikrolitre (µl) dağıtıldı ve seri dilüsyonları yapıldı.

0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonları vorteksle homojenize edildi, her bir süspansiyondan 0,1 ml alınarak 4.9 ml serum fizyolojik içeren tüpe konuldu (1/50 dilüsyon). Tekrar vortekslenip homojenize edildikten sonra süspansiyondan 0.25 ml alınarak 4.75 ml serum fizyolojik içeren tüpün içine konuldu (1/20 dilüsyon). Sonuç olarak maya süspansiyonları $1/20 \times 1/50 = 1/1000$ oranında dilüe edildi ($1-5 \times 10^3$ hücre/ml). Hazırlanan inoklüm süspansiyonundan, mikrolakta ilk 10 kuyucuğa ve üreme kontrol kuyucuğu olan 11. kuyucuğa 100 µl eklendi. Sterilite kontrol kuyucuğu olan 12. kuyucuğa inokülüm konulmadı. Flukonazol konsantrasyonları ve maya inokülüm miktarı ($0,5- 2,5 \times 10^3$ hücre/ml) final değerlere ulaşmış oldu. Mikroplaklar kapakları ile kapatılıp 37°C'de 48 saat etüvde inkübe edildi. Şekil 1'de Flukonazolün mikrolak kuyucuklarındaki final konsantrasyon değerleri verilmiştir. Resim 11'de flukonazol sıvı mikrodilüsyon çalışması için hazırlanan mikrolak görüntüsü verilmiştir.

SUŞ NO	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4µg/ml	2 µg/ml	1µg/ml	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	ÜREME KONT.	STERİLİT E KONT.
1	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
2	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
3	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
4	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
5	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
6	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
7	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
8	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Şekil 1 Flukonazol mikrolak kuyucuklarındaki konsantrasyonları



Resim 11 Flukonazol sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan mikropalak (Çalışmamızdan)

3.2.5.Sonuçların Değerlendirilmesi

37°C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda yeterli üreme görülen plaklar iki farklı araştırmacı tarafından görsel olarak değerlendirildi, 48 saat sonra ise ilk 24 saatte yeterli üreme gözlenmeyen plaklar değerlendirildi. CLSI M27-A3 klavuzundaki standartlara göre üremenin %50 oranında azaldığı ilk kuyucuktaki flukonazol konsantrasyon değeri MİK değeri olarak kabul edildi. MİK değerleri 0,125 µg/ml’den daha düşük ve 64 µg/ml’den daha yüksek izolatlar için mikrodilüsyon çalışması iki kat daha geniş konsantrasyonlarda tekrarlandı. Flukonazol için MİK değerleri belirlenen suşların flukonazol duyarlılıkları CLSI M27- A3 ve CLSI M27- S4 klavuzundaki sınır değerlere göre saptandı (8). Tablo 1’de Candida türleri için CLSI tarafından belirlenen flukonazol sınır değerler ve C. glabrata için EUCAST önerilerine yer verilmiştir (63).

Tablo 1 Candida türlerinin flukonazol için epidemiyolojik eşik değerleri ve klinik duyarlılık sınır değerleri

Candida türü	Epidemiyolojik eşik değeri (µg/ml)		Klinik sınır değerler (µg/ml)		
	WT ¹	NonWT ¹	S ¹	SDD ¹	Dirençli ¹
<i>C. albicans</i>	≤0,5	>0,5	≤2	4	≥8
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	>2	≤2	4	≥8
<i>C. tropicalis</i>	≤2	>2	≤2	4	≥8
<i>C. glabrata</i>	<32	>32	≤0,002 ²	<32	≥64
<i>C. krusei</i>	<64	>64			
<i>C. kefyr</i>	<1	>1	≤8	16-32	≥64
<i>C. lusitanae</i>	<2	>0,5			
<i>C. dubliniensis</i>	<0,5	>0,5			
<i>C. guilliermondii</i>	<8	>8	≤2	4	≥8

1: WT: Vahşi tip, nonWT: Vahşi olmayan tip, S: Duyarlı, SDD: Doza bağlı duyarlı, R: Dirençli 2: EUCAST önerilerinde C. glabrata’nın flukonazol duyarlılık sınırı ≤ 0.002 olup, ≤ 32 µg/ml olan suşların doza bağlı duyarlı olarak kabul edilmesi yer almaktadır.

3.3.Flukonazol ile Gentamisinin Candidalara Etkisinin ve İlaç Etkileşiminin Araştırılması

Flukonazol ile bir aminoglikozid türevi antibiyotik olan gentamisinin Candidalar üzerine birlikte etkisinin araştırılmasında ilaç etkileşimi araştırmalarında en sık kullanılan yöntem olan dama tahtası yöntemi kullanıldı, flukonazol ve gentamisinin bir arada etkili oldukları en uygun konsantrasyonlu kombinasyonlar tespit edildi (64).

Dama tahtası yönteminde, araştırılması amaçlanan ilaçların, çeşitli konsantrasyon kombinasyonları 96 kuyucuklu plaklarda bir araya getirilerek kombinasyonların etkinlikleri test edilmektedir. İlaçların bir aradayken belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleriyle tek başlarına iken olan MİK değerleri oranlanıp, fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) belirlenmektedir. Kombinasyonlardaki antimikrobiyallerin FİK değerlerinin toplamı FİK indeksini (FİKİ) vermektedir. FİKİ değerinin 0.5'ten küçük olması sinerji, FİKİ değerinin 4'ten büyük olması ise antagonizma şeklinde tanımlanmaktadır. Bu kesin tanımlar dışındaki durumlar için ($0.5 < \text{FİKİ} \leq 4$) additif etki tanımının kullanılması önerilmektedir (65-68).

Türlere göre MİK ortalamaları dağılımı, flukonazole direnç oranlarının dağılımı ve ilaç etkileşim türü oranları ki-kare (χ^2) testi ile analiz edildi. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Söz konusu istatistiksel değerlendirmeler SPSS 20.0 istatistik yazılımıyla gerçekleştirildi.

3.3.1.Stok Solüsyonlar

Flukonazol duyarlılık çalışması için hazırlanan stok solüsyonu kullanıldı. Gentamisin sülfat (Sigma) standart toz formu steril distile su ile sulandırılarak 5120 mg/L konsantrasyonunda stok solüsyonu hazırlandı.

3.3.2.Maya Süspansiyonları

SDA' ya tekrar pasajlanan saf maya kolonileriyle PhoenixSpec (BD, Fransa) cihazında ölçüm yapılarak serum fizyolojik ile $0,5 \text{ McFarland}$ ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) bulanıklığında maya süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar plaklarda son

inokulum konsantrasyonu 5×10^2 - $2,5 \times 10^3$ CFU/ml olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırıldı.

3.3.3.Plakların Hazırlanması

Besiyeri olarak flukonazol duyarlılık testinde kullanıldığı gibi MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce stok flukonazol ve gentamisin solüsyonları dirençli ve duyarlı suşlar için farklı konsantrasyonlarda RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı. Standartlara uygun hazırlanan ilaç sulandırımaları 96 kuyucuklu U tabanlı mikrolaklarda bir araya getirildi. Her plakta A1 sterilite kontrol kuyucuğu, H12 ise üreme kontrol kuyucuğu olarak bırakıldı. Plaklar kapakları ile kapatılıp 37°C etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun süresinin sonunda MİK değerleri, mikroorganizmanın mikrolak kuyucuklarındaki üremenin en az %50'sini inhibe eden kuyucuklar değerlendirilip en düşük antimikrobiyal konsantrasyonlu kombinasyonlar tespit edildi. Resim 12'de dama tahtası yöntemi ile hazırlanan flukonazol ve gentamisinin farklı konsantrasyonda kombinasyonlarının bulunduğu mikrolakta üremiş *C. albicans* suşu verilmiştir. Tablo 2'de flukonazol ve gentamisinin mikrolak kuyucuklarındaki konsantrasyonları verilmiştir.



Resim 12 Flukonazol ve gentamisinin farklı konsantrasyonda kombinasyonlarının bulunduğu mikropakta üremiş *C. albicans* suşu (Çalışmamızdan)

Tablo 2 Flukonazol ve gentamisin mikrop plak kuyucuklarındaki konsantrasyonları

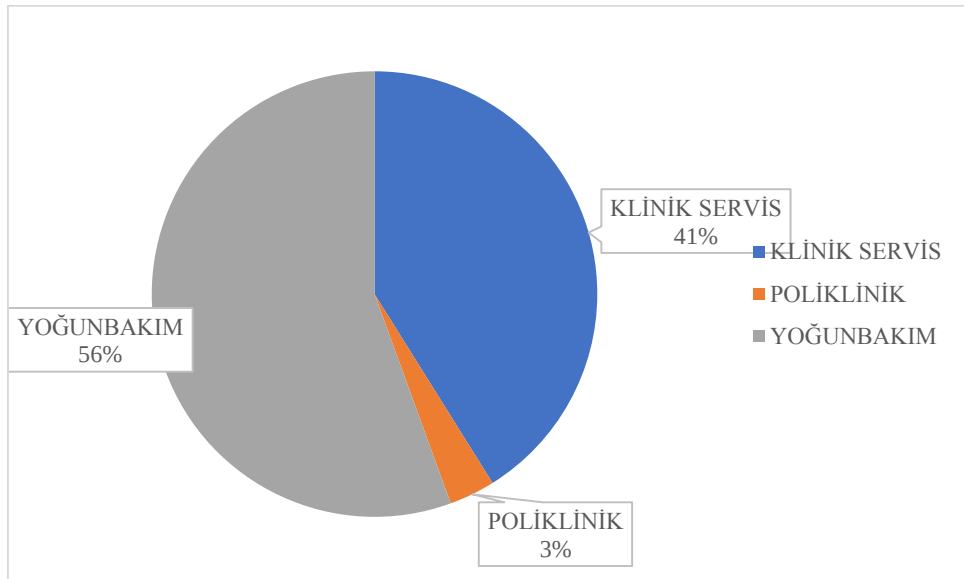
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK	F128	F64	F32	F16	F8	F4	F2	F1	F0,5	F0,25	F0,125
B	G256	F128 G256	F64 G256	F32 G256	F16 G256	F8 G256	F4 G256	F2 G256	F1 G256	F0,5 G256	F0,25 G256	F0,125 G256
C	G128	F128 G128	F64 G128	F32 G128	F16 G128	F8 G128	F4 G128	F2 G128	F1 G128	F0,5 G128	F0,25 G128	F0,125 G128
D	G64	F128 G64	F64 G64	F32 G64	F16 G64	F8 G64	F4 G64	F2 G64	F1 G64	F0,5 G64	F0,25 G64	F0,125 G64
E	G32	F128 G32	F64 G32	F32 G32	F16 G32	F8 G32	F4 G32	F2 G32	F1 G32	F0,5 G32	F0,25 G32	F0,125 G32
F	G16	F128 G16	F64 G16	F32 G16	F16 G16	F8 G16	F4 G16	F2 G16	F1 G16	F0,5 G16	F0,25 G16	F0,125 G16
G	G8	F128 G8	F64 G8	F32 G8	F16 G8	F8 G8	F4 G8	F2 G8	F1 G8	F0,5 G8	F0,25 G8	F0,125 G8
H	G4	F128 G4	F64 G4	F32 G4	F16 G4	F8 G4	F4 G4	F2 G4	F1 G54	F0,5 G4	F0,25 G4	ÜK

F:Flukonazol G:Gentamisin SK:Sterilite kontrol ÜK:Üreme kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi µg/ml'dir. (F128= Flukonazol 128 µg/ml, G256= Gentamisin 256 µg/ml)

4.BULGULAR

Çalışmamıza Haziran 2018 ile Ocak 2020 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına yoğun bakım servislerinden 50 (%55,5), pediatri kliniklerinden 11 (%12,2), dâhiliye kliniklerinden 9 (%10), göz hastalıkları kliniğinden 4 (%4,4), göğüs cerrahi kliniğinden 4 (%4,4), beyin cerrahi kliniğinden 3 (%3,3), göğüs hastalıkları kliniğinden 2 (%2,2), plastik cerrahi kliniğinden 1 (%1,1), üroloji kliniğinden 1 (%1,1), organ nakli kliniğinden 1 (%1,1), genel cerrahi kliniğinden 1(%1,1) ve ortopedi polikliniğinden 2 (%2,2), plastik cerrahi polikliniğinden 1 (%1,1) gelen örneklerden toplam 90 Candida suşu izole edildi. Suşların izole edildiği hasta örneklerinin en büyük kısmı (%56) yoğun bakım servislerinden, %24,4'ünün dâhili klinik servislerden, % 16,6'sının cerrahi klinik servislerden gönderildiği tespit edildi. Grafik 1'de suşların izole edildiği hasta örneklerinin gönderildikleri servislere göre dağılımları gösterilmiştir.



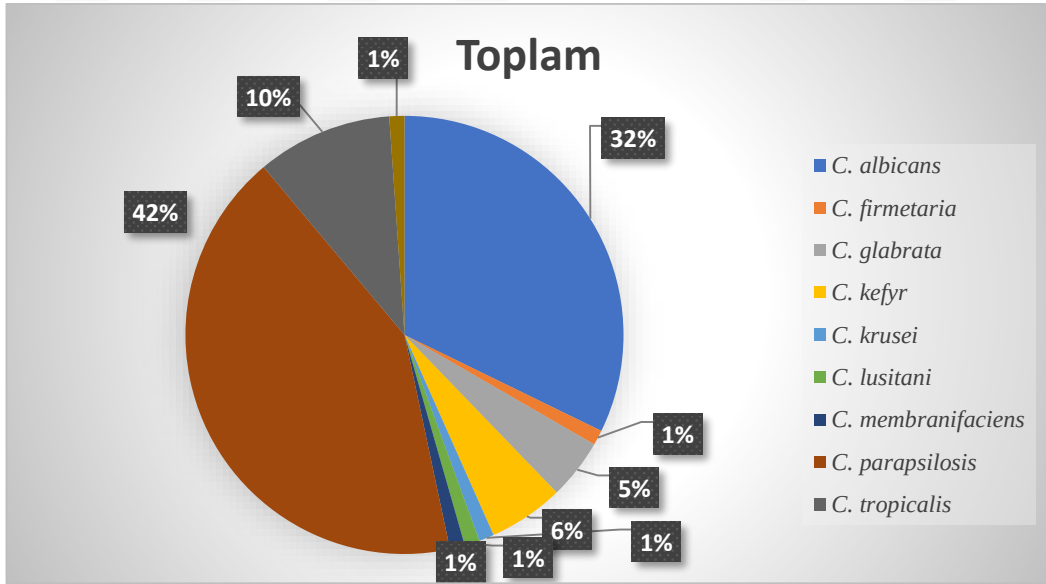
Grafik 1 Suşların izole edildiği hasta örneklerinin gönderildikleri servislere göre dağılımları

Gönderilen invaziv örneklerin 70'i kan, 6'sı plevral mayı, 4'ü vitreus sıvısı, 3'ü BOS, biri derin trakeal aspirat örneği ve biri de apse materyalidir. Non-invaziv örneklerin 4'ü yara biri de idrar örneğidir. Tablo 3'te örnek türü dağılımı verilmiştir.

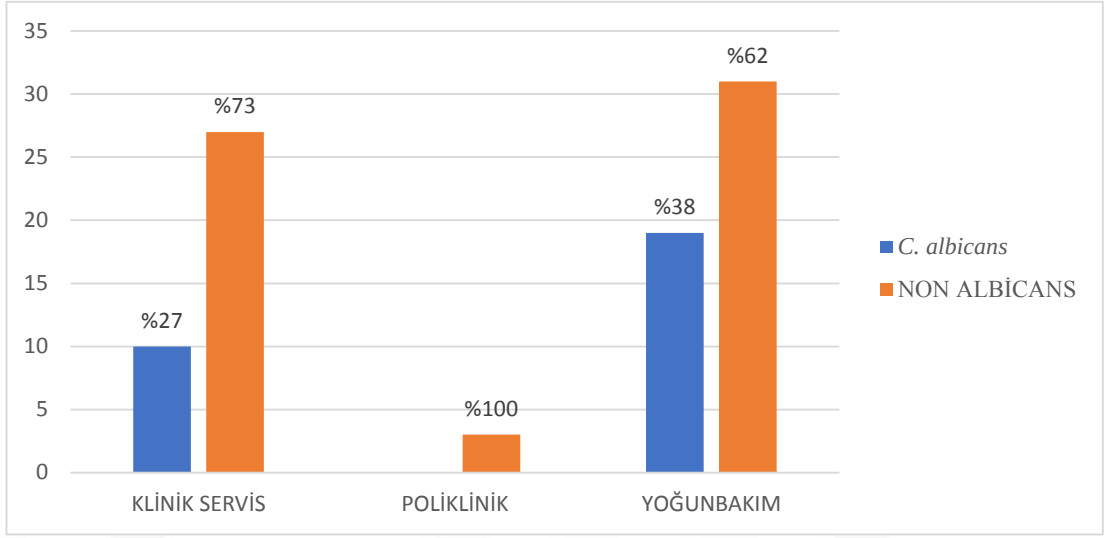
Tablo 3 Örnek türü dağılımı

ÖRNEK TÜRÜ	SAYI(n)	YÜZDE (%)
APSE		
MATERYALİ	1	1,11%
BOS	3	3,33%
İDRAR	1	1,11%
KAN	70	77,78%
PLEVRAL		
MAYİ	6	6,67%
TRAKEAL		
ASPIRAT	1	1,11%
VİTREUS	4	4,44%
YARA	4	4,44%
Genel Toplam	90	100,00%

Çalışmaya dâhil edilen Candida suşlarının, 38'ini oluşturan *C. parapsilosis* (%42) en sık izole edilen tür oldu. *C. parapsilosis*'ten sonra tüm suşların 29'unu *C. albicans* (%32), 9'unu *C. tropicalis* (%10) türleri oluşturdu. Gönderilen klinik örneklerden izole edilen Candida suşların %68'ini non-albicans Candida türlerinin oluşturduğu tespit edildi. Grafik 2'de Candidaların tür düzeyinde dağılımı verilmiştir. Grafik 3'te klinik servislere göre *C. albicans* ve non-albicans oranı verilmiştir.



Grafik 2 Candidaların tür düzeyinde dağılımı



Grafik 3 Kliniklere göre *C. albicans* non- *albicans* oranı

4.1. Flukonazol ve Gentamisin Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

MİK, mantarın üremesini tamamen durduran veya önemli miktarını azaltan en düşük ilaç konsantrasyonudur. Antifungal ilaç direnci, MİK'nun belirlenmesi ile kantitatif olarak saptanır ve MİK değerlerinin yorumlanması için o ilaca ait direnç sınır değerlerinin belirlenmiş olması gerekmektedir (3). İzolatların flukonazol ve gentamisin duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışıldı. Bu yöntemle her bir suşa ait flukonazol MİK değerleri belirlendi, CLSI M27 S4 dökümanına göre değerlendirildi ve antifungal duyarlılık sonuçları raporlandı. Yine bu yöntemle her bir suşa ait gentamisin MİK değerleri belirlendi. Test edilen tüm suşlarda ve kalite kontrol suşlarında gentamisin MİK değeri 512 µg/ml nin üzerindeydi. Bu nedenle tek başına gentamisinin Candida izolatları üzerinde antimikrobiyal bir etkisi olmadığı tespit edildi. Tablo 4'te izolatların flukonazol ve gentamisin MİK değerleri verilmiştir.

Tablo 4 İzolatların flukonazol MİK değerleri

F MİK (µg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida firmetaria</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida lusitani</i>	<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Genel Toplam
0,06	2			2					1	5
0,125				1			1			2
0,25	14			2		1		4		21
0,5	6							9	1	16
1	2							5	1	8
2	3							3	5	11
4			1					2	1	4
8	1		2					4		7
16		1	1					5		7
32	1				1			3		5
64								2		2
128		1						1		2
Genel Toplam	29	2	4	5	1	1	1	38	9	90

90 *Candida* suşunun flukonazol için tespit edilen MİK değerlerinden en küçük MİK değeri 0,06 µg/ml iken en büyük MİK değeri 128 µg/ml idi. Bu 90 suşun ortalama MİK değeri 8,58 µg/ml olarak saptandı. 20 izolatın flukonazole dirençli olduğu tespit edildi. Dirençli izolatların 16'sı *C. parapsilosis*, 2'si *C. albicans*, 2'si *C. firmetaria* idi. 5 izolat ise flukonazole doza bağımlı duyarlı bulundu ve bu suşların 4'ü *C. glabrata*, 1'i *C. tropicalis* idi. Bir *C. krusei* suşu flukonazole intrinsek dirençli olduğundan flukonazol için MİK değeri 32 µg/ml olarak saptandı. Tablo 5'te izolatların flukonazol duyarlılık değerleri verilmiştir.

Tablo 5 İzolatların flukonazol duyarlılık değerleri

CANDIDA TÜRÜ	Duyarlı	DBD	Dirençli	Genel Toplam
<i>C. albicans</i>	27		2	29
<i>C. firmetaria</i>			2	2
<i>C. glabrata</i>		4		4
<i>C. kefyr</i>	5			5
<i>C. krusei</i>			*	1
<i>C. lusitaniae</i>	1			1
<i>C. membranifaciens</i>	1			1
<i>C. parapsilosis</i>	22		16	38
<i>C. tropicalis</i>	8	1		9
Genel Toplam	64	5	21	90

* intrinsek direnç

Flukonazol MİK değerlerinin ortalamaları karşılaştırıldığında 29 *C. albicans* suşuna ait ortalama flukonazol MİK değeri 1,88 µg/ml iken 38 *C. parapsilosis* suşunun ortalama flukonazol MİK değeri 12,86 µg/ml olduğu dikkat çekmektedir. Tüm non-*albicans* türlerin ortalama flukonazol MİK değeri 11,76 bulunmuştur. *C. albicans* ile non-*albicans* *Candida* türlerinin ortalama MİK değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). *C. albicans* suşlarının %7,1' i flukonazol dirençli olup geri kalan tüm suşlar flukonazol duyarlı olarak tespit edilmiştir. Non- *albicans* *Candida* türlerinin ise %34,5'inde flukonazol direnci tespit edilmiştir. Bu fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,01$)(Tablo 6) Tablo 7'de *Candida* türlerine ait flukonazol için MİK aralıkları ve ortalamaları verilmiştir.

Tablo 6 *C.albicans-non-albicans flukonazol direnç oranları (n(%))*

	C. albicans	Non-albicans	Toplam	p değeri
Flukonazol duyarlı	26(%92,9)	36(%65,5)	62(%74,7)	0,007
Flukonazol dirençli	2(%7,1)	19(%34,5)	21(%25,3)	

Tablo 7 *Candida* türlerine ait flukonazol için MİK50, MİK90 değerleri, MİK aralıkları ve ortalamaları

Candida Tür	MİK 50 (µg/ml)	MİK 90 (µg/ml)	MİK Ortalama	MİK Aralığı
<i>Tüm Candidalar (90)</i>	1	16	8,58	0,06-128
<i>C. albicans (29)</i>	0,25	2	1,88	0,06-32
<i>Non- albicans Candida (61)</i>	2	32	11,76	0,06-128
<i>C. parapsilosis (38)</i>	1	32	12,86	0,25-128
<i>C. tropicalis (9)</i>	2	2	1,73	0,06-4
<i>C. kefyr (5)</i>			0,15	0,06-0,25
<i>C. glabrata (4)</i>			9	4-16
<i>C. firmetaria (2)</i>			72	16-128
<i>C. krusei (1)</i>			32	32
<i>C. lusitaniae (1)</i>			0,25	0,25
<i>C. membranifaciens (1)</i>			0,125	0,125

4.2 Flukonazol ve Gentamisin Kombinasyonunun Değerlendirilmesi

Çalışmaya dâhil edilen 90 izolata ve *C. albicans* (ATCC) 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart suşlarına dama tahtası yöntemi ile flukonazol ve gentamisin oranlarının farklı birçok konsantrasyonlarında kombinasyonları test edildi ve FİK değerleri Şekil 2’de belirtildiği gibi hesaplandı. Bu hesaplamalara göre klinik örneklerden elde edilen izolatlarda 20 adet sinerjistik etki, 70 adet additif etki saptandı. *C.parapsilosis* ATCC 22019 standart suşunda da sinerjistik etki tespit edilirken diğer standart suşlarda additif etkileşim saptandı. Antimikrobiyal ajanların sinerjistik etki gösterdiği izolatların 4’ü *C. albicans*, 16’sı non-albicans Candida türüdür. İki ilacın etkileşim türü ile Candida türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (p=0,172) Tablo 8’de flukonazol ve gentamisinin MİK değerleri, FİKİ değerleri ve etkileşim türü verilmiştir.

$FİK\ G = \frac{MİK\ G\ kombinasyondaki}{MİK\ G}$
$FİK\ F = \frac{MİK\ F\ kombinasyondaki}{MİK\ F}$
$FİK\ indeksi\ (FİKİ) = FİK\ G + FİK\ F\ FİKİ \leq 0,5\ İSE\ SİNERJİK\ ETKİ$
$0,5 < FİKİ \leq 4\ İSE\ ADDİTİF\ ETKİ$
$FİKİ > 4\ İSE\ ANTAGONİSTİK\ ETKİ$

Şekil 2 Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değeri hesaplama

Tablo 8 Dama tahtası yöntemi ile belirlenen flukonazol ve gentamisinin MİK değerleri, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

İZOLAT SAYISI	CANDİDA TÜRÜ	MİK _F	MİK _G	KOMBİNASYONDAKİ F/G DOZU (µg/ml)	FİKİ	ETKİLEŞİM TÜRÜ
1	<i>C. parapsilosis</i>	16	>512	8/256	1	additif etki
2	<i>C. firmetaria</i>	16	>512	16/256	1,5	additif etki
3	<i>C. parapsilosis</i>	16	>512	8/256	1	additif etki
4	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,125/256	0,75	additif etki
5	<i>C. tropicalis</i>	2	>512	0,5/256	0,75	additif etki
6	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	>512	0,125/256	1	additif etki
7	<i>C. tropicalis</i>	2	>512	1/256	1	additif etki
8	<i>C. glabrata</i>	8	>512	4/256	1	additif etki
9	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,5/256	1,5	additif etki
10	<i>C. parapsilosis</i>	32	>512	16/128	0,75	additif etki
11	<i>C. parapsilosis</i>	128	>512	32/64	0,375	sinerjistik etki
12	<i>C. parapsilosis</i>	2	>512	2/256	1,5	additif etki
13	<i>C. parapsilosis</i>	16	>512	8/128	0,75	additif etki
14	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
15	<i>C. glabrata</i>	16	>512	4/16	0,28	sinerjistik etki
16	<i>C. lusitaniae</i>	0,25	>512	0,125/4	0,5	sinerjistik etki
17	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	>512	0,125/4	0,5	sinerjistik etki
18	<i>C. parapsilosis</i>	64	>512	32/128	0,75	additif etki
19	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	0,5/64	0,625	additif etki
20	<i>C. kefir</i>	0,25	>512	0,25/64	1,125	additif etki
21	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,25/128	0,75	additif etki
22	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,125/256	1	additif etki
23	<i>C. membranifaciens</i>	0,125	>512	0,125/256	1,5	additif etki
24	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,125/128	0,5	sinerjistik etki
25	<i>C. parapsilosis</i>	8	>512	1/128	0,375	sinerjistik etki
26	<i>C. parapsilosis</i>	32	>512	8/64	0,5	sinerjistik etki
27	<i>C. parapsilosis</i>	2	>512	1/256	1	additif etki
28	<i>C. parapsilosis</i>	4	>512	0,5/256	0,625	additif etki
29	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,125/64	0,625	additif etki

30	<i>C. kefir</i>	0,125	>512	0,125/256	1,5	additif etki
31	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
32	<i>C. albicans</i>	2	>512	0,5/64	0,375	sinerjistik etki
33	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,125/64	0,375	sinerjistik etki
34	<i>C. parapsilosis</i>	4	>512	1/256	0,75	additif etki
35	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	1/256	1,5	additif etki
36	<i>C. parapsilosis</i>	64	>512	16/256	0,75	additif etki
37	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,125/64	0,375	sinerjistik etki
38	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	>512	0,25(256	1,5	additif etki
39	<i>C. albicans</i>	8	>512	2/256	0,75	additif etki
40	<i>C. tropicalis</i>	0,06	>512	0,06/256	1,5	additif etki
41	<i>C. parapsilosis</i>	8	>512	8/256	1,5	additif etki
42	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,125/256	0,75	additif etki
43	<i>C. albicans</i>	1	>512	0,25/4	0,257	sinerjistik etki
44	<i>C. albicans</i>	2	>512	0,25/64	0,25	sinerjistik etki
45	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,125/256	1	additif etki
46	<i>C. kefir</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
47	<i>C. kefir</i>	0,06	>512	0,06/256	1,5	additif etki
48	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,125/128	0,5	sinerjistik etki
49	<i>C. albicans</i>	1	>512	0,5/256	1	additif etki
50	<i>C. albicans</i>	32	>512	32/256	1,5	additif etki
51	<i>C. parapsilosis</i>	8	>512	8/256	1,5	additif etki
52	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
53	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
54	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
55	<i>C. glabrata</i>	4	>512	1/256	0,75	additif etki
56	<i>C. albicans</i>	0,06	>512	0,06/256	1,5	additif etki
57	<i>C. parapsilosis</i>	16	>512	4/128	0,5	sinerjistik etki
58	<i>C. tropicalis</i>	2	>512	2/256	1,5	additif etki
59	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
60	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>512	0,125/128	0,5	sinerjistik etki
61	<i>C. tropicalis</i>	2	>512	1/8	0,5	sinerjistik etki
62	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,06/32	0,312	sinerjistik etki
63	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,125/256	0,75	additif etki

64	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,06/256	0,625	additif etki
65	<i>C. kefyr</i>	0,06	>512	0,03/128	0,75	additif etki
66	<i>C. albicans</i>	0,06	>512	0,06/256	1,5	additif etki
67	<i>C. albicans</i>	2	>512	2/256	1,5	additif etki
68	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
69	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
70	<i>C. tropicalis</i>	4	>512	0,5/256	0,625	additif etki
71	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
72	<i>C. glabrata</i>	8	>512	4/32	0,56	additif etki
73	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,5/256	1,5	additif etki
74	<i>C. parapsilosis</i>	8	>512	1/256	0,625	additif etki
75	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	0,125/256	0,625	additif etki
76	<i>C. firmetaria</i>	128	>512	32/256	0,75	additif etki
77	<i>C. parapsilosis</i>	16	>512	16/256	1,5	additif etki
78	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	0,25/256	0,75	additif etki
79	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,5/256	1,5	additif etki
80	<i>C. tropicalis</i>	1	>512	0,25/256	0,75	additif etki
81	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
82	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,25/256	1	additif etki
83	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	1/256	1,5	additif etki
84	<i>C. parapsilosis</i>	2	>512	0,5/128	0,5	sinerjistik etki
85	<i>C. krusei</i>	32	>512	32/256	1,5	additif etki
86	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>512	0,5/256	1,5	additif etki
87	<i>C. parapsilosis</i>	32	>512	8/32	0,312	sinerjistik etki
88	<i>C. tropicalis</i>	2	>512	0,5/32	0,312	sinerjistik etki
89	<i>C. albicans</i>	0,25	>512	0,25/256	1,5	additif etki
90	<i>C. albicans</i>	0,5	>512	0,5/256	1,5	additif etki
91*	<i>C. krusei</i>	32	>512	32/256	1,5	additif etki
92**	<i>C. parapsilosis</i>	1	>512	0,25/64	0,375	sinerjistik etki
93***	<i>C. albicans</i>	1	>512	0,5/128	0,75	additif etki

* *C. krusei* ATCC 6258

** *C. parapsilosis* ATCC 22019

*** *C. albicans* (ATCC) 90028

Dama tahtası yöntemi ile test edilip flukonazol ile gentamisin sinerjistik etkisi saptanan 20 izolatın 5'i flukonazol dirençli *C. parapsilosis*, 1'i doza bağımlı duyarlı *C. glabrata* izolatıdır. Geri kalan flukonazol duyarlı izolatların 6'sı *C. parapsilosis*, 4'ü *C. albicans*, 3'ü *C. tropicalis*, 1'i de *C. lusitaniae*'dir. Gentamisinin tüm suşlar üzerinde etkinliği sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle denenip, her bir izolatın MİK değeri >512 olarak saptandı. Tek başına Candida suşları üzerinde etkinliği olmayan gentamisinin sinerjizma saptanan izolatlar için test edilen kombinasyonlarda en düşük konsantrasyonu 4 µg/ml, en yüksek konsantrasyonu 256 µg/ml idi. Tablo 9'da flukonazol/gentamisin sinerjistik etkisi tespit edilen 25 nolu izolatın mikrolaktaki MİK değerleri, Tablo 10'da flukonazol/gentamisin additif etki tespit edilen 36 nolu izolatın mikrolaktaki MİK değerleri verilmiştir.

Tablo 9 Flukonazol/gentamisin sinerjizması tespit edilen 25 nolu izolatın mikrolaktaki MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK	F128	F64	F32	F16	F8	F4	F2	F1	F0,5	F0,25	F0,125
B	G256	F128 G256	F64 G256	F32 G256	F16 G256	F8 G256	F4 G256	F2 G256	F1 G256	F0,5 G256	F0,25 G256	F0,125 G256
C	G128	F128 G128	F64 G128	F32 G128	F16 G128	F8 G128	F4 G128	F2 G128	F1 G128	F0,5 G128	F0,25 G128	F0,125 G128
D	G64	F128 G64	F64 G64	F32 G64	F16 G64	F8 G64	F4 G64	F2 G64	F1 G64	F0,5 G64	F0,25 G64	F0,125 G64
E	G32	F128 G32	F64 G32	F32 G32	F16 G32	F8 G32	F4 G32	F2 G32	F1 G32	F0,5 G32	F0,25 G32	F0,125 G32
F	G16	F128 G16	F64 G16	F32 G16	F16 G16	F8 G16	F4 G16	F2 G16	F1 G16	F0,5 G16	F0,25 G16	F0,125 G16
G	G8	F128 G8	F64 G8	F32 G8	F16 G8	F8 G8	F4 G8	F2 G8	F1 G8	F0,5 G8	F0,25 G8	F0,125 G8
H	G4	F128 G4	F64 G4	F32 G4	F16 G4	F8 G4	F4 G4	F2 G4	F1 G54	F0,5 G4	F0,25 G4	ÜK

F:Flukonazol G:Gentamisin SK: Sterilite kontrol

ÜK: Üreme kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi µg/ml'dir. (F128= Flukonazol 128 µg/ml, G256= Gentamisin 256 µg/ml)

☒ Üremenin ÜK kuyucuğunun %50'sinin üzerinde olması

☐ Üremenin ÜK kuyucuğunun %50'si ve altında olması

(C9 kuyucuğunda F1 µg/ml /G128 µg/ml konsantrasyon kombinasyonunda sinerjistik etki saptandı.)

Tablo 10 Flukonazol/gentamisin additif etki tespit edilen 36 nolu izolatin mikroplaktaki MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SK	F128	F64	F32	F16	F8	F4	F2	F1	F0,5	F0,25	F0,125
B	G256	F128 G256	F64 G256	F32 G256	F16 G256	F8 G256	F4 G256	F2 G256	F1 G256	F0,5 G256	F0,25 G256	F0,125 G256
C	G128	F128 G128	F64 G128	F32 G128	F16 G128	F8 G128	F4 G128	F2 G128	F1 G128	F0,5 G128	F0,25 G128	F0,125 G128
D	G64	F128 G64	F64 G64	F32 G64	F16 G64	F8 G64	F4 G64	F2 G64	F1 G64	F0,5 G64	F0,25 G64	F0,125 G64
E	G32	F128 G32	F64 G32	F32 G32	F16 G32	F8 G32	F4 G32	F2 G32	F1 G32	F0,5 G32	F0,25 G32	F0,125 G32
F	G16	F128 G16	F64 G16	F32 G16	F16 G16	F8 G16	F4 G16	F2 G16	F1 G16	F0,5 G16	F0,25 G16	F0,125 G16
G	G8	F128 G8	F64 G8	F32 G8	F16 G8	F8 G8	F4 G8	F2 G8	F1 G8	F0,5 G8	F0,25 G8	F0,125 G8
H	G4	F128 G4	F64 G4	F32 G4	F16 G4	F8 G4	F4 G4	F2 G4	F1 G54	F0,5 G4	F0,25 G4	ÜK

F:Flukonazol G:Gentamisin SK:Sterilite kontrol ÜK:Üreme kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi µg/ml'dir. (F128= Flukonazol 128 µg/ml, G256= Gentamisin 256 µg/ml)

☒ Üremenin ÜK kuyucuğunun %50'sinin üzerinde olması

☐ Üremenin ÜK kuyucuğunun %50'si ve altında olması

(B5 kuyucuğunda F16 µg/ml /G256 µg/ml konsantrasyon kombinasyonunda additif etki saptandı.)

5.TARTIŞMA

Doğadan, çevreden ve insan vücudundan izole edilebilen ve 200'den fazla türü tanımlanabilen Candidaların insanlarda enfeksiyonlara sebep olan türleri genelde endojen kaynaklıdır. Candidaların ilk sırada olduğu bu maya enfeksiyonları immunsupresif hasta sayısında artış ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının ve tanı veya tedavi için uygulanan invaziv yöntemlerin yaygınlaşması gibi sebeplerle son iki dekada daha sık görülmüştür (23).

Candida enfeksiyonlarının sıklığındaki artış morbidite ve mortalite oranlarında artışa, ampirik antifungal tedavinin yaygınlaşmasına, dirençli Candida suşlarının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu sebeple etkin antifungal tedavinin uygulanabilmesi için antifungal duyarlılık testlerinin gerekliliği ortaya çıkmıştır (12).

Artan Candida enfeksiyonlarında hala en sık *C. albicans* izole edilse de 1990'dan günümüze albicans dışı türlerin izolasyon sıklığı artmıştır. Bu artışın en önemli nedeni başta flukonazol olmak üzere azol türevi ilaçların yaygın olarak kullanılmasıdır (23).

Lamoth ve ark'nın 2000-2015 yılları arasını kapsayan 15 yıllık bir süreci kapsayan çok merkezli süveyans çalışmasında kandidemi tanılı hastaların verileri toplanmış ABD'de 2008-2011 ile 2013 yıllarında yapılan süveyans çalışmaları karşılaştırılmış, karşılaştırma sonucunda *C. albicans* sıklığının %37'den %35'e düştüğü ve non-albicans Candida sıklığının %63'ten %65'e yükseldiği görülmüştür. Aynı çalışmada Avustralya'da 2001-2004 ile 2014-2015 yıllarında yapılan süveyans çalışmaları karşılaştırılmış, karşılaştırma sonucunda ABD verilerine benzer olarak *C. albicans* sıklığının %47'den %44'e düştüğü ve non-albicans Candida sıklığının %53'ten %56'ya yükseldiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada yapılan süveyans çalışmalarının değerlendirmesinde Danimarka'da 2004-2009 yıllarında *C. albicans* sıklığının %58, non-albicans Candida sıklığının %42 olduğu, Brezilya'da 2007-2010 yıllarında *C. albicans* sıklığının %34, non-albicans Candida sıklığının %56 olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada non-albicans Candidalardan en sık izole edilenler ABD'de ve Avrupa ülkelerinin çoğunluğunda *C. parapsilosis* ardından *C. glabrata*, Brezilya'da

16 hastaneden toplanan verilere göre *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* olduğu saptanmıştır. Asya’da 7 ülke 13 hastaneden toplanan verilere göre izole edilen Candida türlerinin %36’sı *C. albicans* %31’i *C. tropicalis*’tir. Hindistan ve Pakistan’da da *C. albicans*’ ı *C. tropicalis* takip etmektedir (69).

Pfaller ve ark’nın 2004-2008 yılları arasını kapsayan *Prospective Antifungal Therapy*’nin verilerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında kandidemili hastalardan %42,1 oranında *C. albicans* izole edildiği, izolatların %57,9’unu oluşturan non-albicans Candidalardan en sık görülen türün *C. glabrata* olduğu saptanmıştır (70).

Pediyatrik hasta gruplarında ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalara bakıldığında *C. parapsilosis* en sık izole edilen non-albicans Candida türü olarak tespit edilmiştir (71-73).

Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında Erdem ve ark’nın yaptığı çalışmada nazokomiyal Candida enfeksiyonlarında izole edilen etkenlerin %54,4’ünün *C. albicans*, %14’ünün *C. glabrata* ve %11,4’ünün *C. tropicalis* olduğu görülmüştür (74). Çiçek ve ark’nın 2009-2012 yılları arasını kapsayan epidemiyolojik çalışmasında idrardan izole edilen suşların %53’ü *C. albicans* olup, bunu sırasıyla *C. tropicalis* (%17) ve *C. parapsilosis* (%7) takip etmektedir. Kandan izole edilen suşlar sırasıyla *C. albicans* %46 oranında, *C. parapsilosis* (%26) ve *C. tropicalis*’tir (%13) (73).

Bizim hastanemizde Karakoç ve ark’nın 2007 yılında yaptıkları çalışmalarında kan kültürü izolatlarının %34,1’inin *C. albicans* %65,9’unun non-albicans türleri olduğu ve *C. tropicalis*’in en sık izole edilen non-albicans türü olduğu saptanmıştır (75). Yine bizim hastanemizde Coşkun ve ark’nın 2012-2015 yılları arasını kapsayan çalışmasında kandidemili hastalardan elde edilen izolatların %66,2’sinin *C. albicans* %33,8’inin non-albicans türlerden oluştuğu saptanmıştır. Non-albicans türlerden *C. parapsilosis* %20,2 oranla en sık izole edilen türdür (76). Bu çalışmadan 3 yıl sonra yaptığımız çalışmamızda ise kan dışı örnekler de dâhil edilmiş olup izolatların %32’si *C. albicans* iken %68’i non-albicans türlerden oluşmaktadır. Bizim çalışmamızda non-albicans türlerden ve tüm Candida türlerinden en sık izole edilen tür %42 oranla *C. parapsilosis*’tir.

Flukonazol geniş spektrumlu olması, toksisitesinin diğer antifungal ajanların birçoğundan az olması ve hem oral hem de parenteral formülasyonlarının bulunması gibi nedenlerle oldukça yaygın kullanılan azol grubu antifungal ajandır. Ampirik veya profilaktik olarak invaziv kandidiaziste sık kullanılmaktadır (77). Dünyada ve ülkemizde giderek artan flukonazol direnci *Candida* türlerinin direnç kazanmasına sebep olabileceği birden fazla mekanizmayla açıklanmıştır. En sık saptanan mekanizma, MDR/ CDR genleri ile kodlanan atılım pompalarının haddinden fazla ekspersyonu ve hedef enzim olan ERG11'i kodlayan genin nokta mutasyonudur (78). Antifungal tedaviye dirençli olguların izlemi ve tedavinin doğru yönetimi için gerekli olduğundan, hem CLSI hem de EUCAST maya mantarlarının MİK'nun belirlenmesi için standardize edilmiş fenotipik yöntemler geliştirmişlerdir (11, 79). Çalışmamızda bu yöntemlerden sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile hasta örneklerinden elde edilen 90 izolatın flukonazol için MİK değerleri 0,06-128 arasında bulunmuştur.

Kaya ve ark'nın yaptığı çalışmada kandidemili hasta izolatlarının flukonazol için MİK değerleri 0,125-256 arasında, *C. albicans* izolatlarının ortalama MİK değeri 3,36 ve non-*albicans* *Candida* izolatlarının ortalama MİK değeri 3,71 olarak saptanmıştır (80). Karabıçak ve ark'nın Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı'na gelen 140 izolatın dahil edildiği çalışmada *Candida* izolatlarının flukonazol için MİK aralığı <0,015-64 olarak saptanmış; 18 *C. albicans* izolatından 3'ü, 31 *C. parapsilosis* izolatından 1'i ve 21 *C. glabrata* izolatından 1'i flukonazol dirençli olarak tespit edilmiştir (81). Temiz ve ark'nın çalışmasında *C. albicans* izolatlarında % 4, *C. glabrata* izolatlarında % 5 ve *C. tropicalis* izolatlarında % 5 oranında flukonazole direnç saptanmış olup *C. parapsilosis* suşlarında flukonazol direnci saptanmamıştır. Tüm *Candida* suşlarında flukonazol direnci % 5,7; *C. albicans* suşlarında % 4, *C. albicans* dışı suşlarda % 10 oranında saptanmıştır (82). Bizim çalışmamızda da flukonazol direnci non-*albicans* *Candida* izolatlarında *C. albicans* izolatlarından daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Çalışmamızda *C. albicans* suşlarının %7,1'i flukonazol dirençli olup non- *albicans* *Candida* türlerinin ise %34,5'inde flukonazol direnci tespit edilmiştir. Tüm *Candida* izolatlarının %25,3'ü flukonazol dirençlidir.

Tüm dünyada antifungallerin duyarlılık ve direnç oranlarının takip edildiği, CLSI M27-S4 klinik direnç sınır değerleri kullanıldığı SENTRY antimikrobiyal

sürveyans programında flukonazole direnç oranları; *C. glabrata* için %8,8, *C. parapsilosis* için %2,1, *C. tropicalis* için %1,3 ve *C. albicans* için %0,4 olarak bildirilmiştir (83). Bizim çalışmamızda bu oran *C. albicans* için %7,1, *C. parapsilosis* için %42'dir. Çalışmamızdaki *C. albicans* ve *C. parapsilosis* türlerinde flukonazol direnci SENTRY çalışması verilerinden oldukça yüksek bulunmuş olup bu durum kandidemi sıklığının yıllar içinde artış göstermesi ve flukonazol ampirik kullanımının yaygın olarak artması, her coğrafi bölgede her hastanenin kandidemi yönetiminin farklı olması, buna bağlı direnç profilinin değişmesi, çalışmaya dahil edilen suş sayısının sınırlı olması gibi sebeplerle açıklanabilmektedir (37, 84, 85).

Bizim hastanemizde Karakoç ve ark'nın 2007 yılında yaptığı çalışmada 88 Candida izolatının sadece 1'i flukonazol dirençli olup izolatın *C. albicans* türü olduğu saptanmıştır (75). Yine hastanemizde 2012-2015 yılları arası izole edilen suşların dâhil edildiği bir çalışmada Candida izolatlarının flukonazol direnç oranı %2,7 olarak saptanmıştır (76). 2018-2020 arasını kapsayan bizim çalışmamızda ise bu oran %25,3'e yükselmiş olup bu farkın nazokomiyal Candida enfeksiyonlarında gözlenen artış ve bu enfeksiyonlarda flukonazole daha dirençli olan non-albicans Candida türlerinin daha sık etken olarak izole edilmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Dirençli Candida türlerinin klinikte etken olarak görülmeye başlamasıyla birlikte antifungal ajanların tek başına kullanımının tedavide yetersizliği antifungal ajanların bir arada kullanılarak antifungal etkinliği artırma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Örneğin, Öz'ün 2005 yılındaki çalışmasında amfoterisin B'nin flukonazol ve vorikonazol ile kombinasyonunun *C. albicans* suşlarına karşı etkinliği araştırılmış, kombinasyonlarda minimal sinerjiye karşı çoğunlukla additif etkileşim saptanmıştır (86). Dağ'ın 2007'deki çalışmasında kaspofunginin diğer antifungal ajanlarla kombinasyonunun *C. glabrata* izolatlarına karşı etkinliğini araştırmış, kaspofunginin amfoterisin B ve vorikonazol ile kombinasyonlarının umut verici olduğu kanısına varılmıştır (87).

Geçtiğimiz yıllarda kapsamlı çalışmalar artık yeni antimikrobiyal geliştirmenin yanı sıra var olan ajanlarda yeni antimikrobiyal aktiviteler bulmaya odaklanmıştır. Örneğin, 2012 yılında Menezes ve arkadaşları kan kolesterol düzeyini düşürücü simvastatin ve flukonazolün Candida suşlarına karşı sinerjistik etkilerini araştırmış

(88), 2017 yılında Ribeiro ve arkadaşları bir diğer kolesterol düzeyi düşürücü olan atorvastatin ile flukonazol kombinasyonunun *Cryptococcus* türlerine karşı etkinliğini araştırmıştır (89). Her iki çalışmada da test edilen statin grubu ilaçların mantar tedavilerinde değerli olabileceği kanısına varılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'de fungusidal aktiviteye sahip olduğu bulunan, bir antiaritmik ilaç olan amiodaronun Gamarra ve ark'nın çalışmasında *Candida* türlerine karşı flukonazol ile sinerjistik etkileri araştırılmış ve genetik mekanizmalarıyla ortaya konmuştur (90). 2017 yılında yapılan bir çalışmada (91) NSAİ ilaç grubundan bir analjezik ve antienflamatuar olan licofelonun flukonazol dirençli *C. albicans* suşlarına karşı flukonazol ile sinerjistik etkinliği tespit edilmiştir. Li ve ark'nın çalışmasında ise kortikosteroid grubundan budesonidin flukonazol dirençli *C. albicans* suşlarına karşı flukonazolün antifungal etkisini hem in vitro hem de in vivo olarak güçlendirdiğini ayrıca flukonazol ve budesonid kombinasyonunun çeşitli mekanizmalarla *Candida albicans*'in direncini önleyebileceği ortaya konmuştur (92).

Li ve arkadaşları 37 flukonazol dirençli *Candida* izolatı üzerinde klorakinin flukonazolle kombinasyonunun etkisi araştırılmış ve 9 *C. albicans* izolatından 6'sında, 12 *C. tropicalis* izolatında ve *C. krusei* ATCC 6258 izolatında bu kombinasyonun sinerjistik etkisi saptanmıştır (93). Wenrui ve arkadaşlarının çalışmasında *Candida* izolatlarının üzerinde bir selektif serotonin reuptake inhibitörü olan fluoksetin ile azollerin kombinasyonunun etkisi in vitro ve in vivo araştırılmış, kombinasyonun sinerjistik etkisi *C. albicans* izolatlarında gözlemlenirken aynı etki non-albicans *Candida* izolatlarında bulunmamıştır (94). Liu ve arkadaşları dirençli *C. albicans* suşları üzerine flukonazol ve kalsiyum kanal blokörlerinin birlikte etkilerini ve birbiriyle etkileşimlerini araştırmışlardır. Tek başına kalsiyum kanal blokörlerinin antifungal etkisinin olmadığını ancak iki ilaç beraber kullanıldığında sinerjistik etkinliği gözlemlemişlerdir (95). Marchetti ve ark'nın çalışmasında da siklosporin ve flukonazol kombinasyonunun *C. albicans* izolatlarına karşı güçlü antifungal etkinliği saptanmıştır.(96)

Kaya'nın çalışmasında flukonazole dirençli dört *C. albicans*, iki *C. glabrata*, iki *C. tropicalis* ve duyarlı dört *C. albicans* ve *C. krusei*, *C. parapsilosis* standart suşlarıyla birlikte toplam 14 suшта, flukonazolün doksisiklin, siprofloksasin ve levofloksasin ile kombinasyonlarının in vitro etkinliği, dama tahtası mikrodilüsyon

yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada doksisisiklinin, flukonazol duyarlı *Candida* suşlarında dirençlilere göre daha düşük MİK değerleri elde edilmiş, siprofloksasin ve levofloksasinin *Candidalar* üzerinde antifungal etkisi saptanmamıştır. Levofloksasin ile kombinasyonlarda iki suшта sinerji saptanmış, flukonazol/ siprofloksasin kombinasyonlarında ise saptanmamıştır. Buna karşılık beş suшта siprofloksasin ile dört suшта ise levofloksasin ile antagonizma görülmüştür. Flukonazol/doksisisiklin kombinasyonu FİK indeks sonuçlarına göre; duyarlı bir suшта antagonizma elde edilmiş, diğer izolatlarda ilaç etkileşimi saptanmamıştır (80).

Aminoglikozidler, bir glikozid antibiyotik sınıfıdır. Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlarda, geniş antibakteriyel spektrumları, küratif etkileri ve diğer avantajları nedeniyle klinikte sıklıkla kullanılmaktadır. Shrestha ve ark'nın yaptıkları çalışmalarda kanamisininden türetilen sentetik aminoglikozid analogları ve tobramisininin antifungal aktiviteye sahip olduğu veya antifungaller ile sinerji oluşturduğu bildirilmiştir (97, 98). Geleneksel bir aminoglikozid antibiyotik olan gentamisinin *Fusarium spp.*'ye karşı zayıf bir antifungal etkisi saptanmıştır (99). Fakat gentamisinin anti-*Candida* aktivitesine veya *Candida* türlerine karşı azollerle kombine etkilerine dair yeterli sayıda veri bulunmamaktadır.

Lu ve ark'nın 2017 yaptıkları çalışmalarında 4 *C. albicans*, 3 *C. krusei*, 2 *C. glabrata* izolatına karşı gentamisinin azollerle kombinasyonlarının etkinliği dama tahtası yöntemiyle araştırılmıştır. Bu izolatların gentamisin için MİK değerleri > 512 µg/ml olarak değerlendirilmiştir. 7'si flukonazole dirençli 9 *Candida* izolatına tek başına antifungal etkinlik sağlayamayan gentamisin azollerle kombine edilerek kullanıldığında 2 *C. albicans* izolatında sinerjistik etki tespit edilmiştir. Her iki izolatın tek başına flukonazol için MİK değerleri > 512 µg/ml iken kombinasyonda 64 µg/ml'ye düşmüştür. Bu iki izolatın FİK değerleri 0,5 ve 0,25781 olarak saptanmıştır. Sinerji azol dirençli *C. albicans* izolatlarında görülmüş olup azol duyarlı *C. albicans* izolatları ve azol dirençli non-*albicans* *Candida* izolatlarında additif etki saptanmıştır. Bu çalışmada gentamisinin *Candidalar*daki efluks pompasını doza bağlı olarak baskıladığı ve dirençli *C. albicans*'ın hücre dışı fosfolipaz faaliyetlerini flukonazolla birlikte önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (100). Shrestha ve ark'nın 2015 yılındaki çalışmasında da aminoglikozid grubu tobramisin analoglarının fungal hücre

membranı hedefleyerek ve hücre apoptozunu başlatarak antifungal etkinlik sağladığı kanısına varılmıştır (98).

Genç'in 2019 yılında yaptığı çalışmada 33 adet *C. albicans* izolatının 14'nünde flukonazole direnç tespit edilmiş, flukonazol dirençli *C. albicans* suşlarında gentamisin etkisi araştırılmış ve herhangi bir etki gözlenmemiştir. Gentamisin ve flukonazol birlikte kullanıldığında 14 izolatın iki tanesinde sinerjik etki, 11 tanesinde additif etki görülmüştür. Bu ilaç kombinasyonunun, *C. albicans* izolatları üzerinde antagonistik etkisi saptanmamıştır (101).

Bizim çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen flukonazol duyarlı ve dirençli, *C. albicans* ve non-*albicans* türlerinin flukonazol duyarlılıkları ve bu duyarlılığa gentamisinin etkisi araştırıldı. Çalışmamızda izole edilen 90 *Candida* suşuna ve *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart suşlarına gentamisinin tek başına antifungal etkinliği saptanmadı. Gentamisinin flukonazol ile kombinasyonunun 90 suştan 20'sinde ve 1 standart suşta sinerjistik etkisi tespit edildi, geri kalan suşlardaki etkileşim additif etki olarak değerlendirildi. Sinerjizma tespit edilen 21 izolatın 5'i flukonazol dirençli *C. parapsilosis*, 1'i doza bağımlı duyarlı *C. glabrata* izolatıdır. Geri kalan flukonazol duyarlı izolatların 4'ü *C. albicans*, 3'ü *C. tropicalis*, 1'i de *C. lusitaniae*'dir. Flukonazol dirençli izolatlardan 25 nolu suşun flukonazol için MİK değeri 8 µg/ml iken kombinasyonda 1 µg/ml'ye kadar düşerek suş gentamisin kombine flukonazole duyarlı olarak yorumlandı. 60 nolu suşun da flukonazol için MİK değeri 16 µg/ml iken kombinasyonda 1 µg/ml'e kadar düşerek suş gentamisin kombine flukonazole doza bağımlı duyarlı olarak değerlendirildi. Sinerjizma tespit edilen diğer 3 flukonazol dirençli izolatın MİK değerleri kombinasyon ile 3 katı kadar azaldı.

Bizim çalışmamız aynı antifungal ve antimikrobiyal ajanlarla yapılan benzer çalışmalara göre çok daha fazla sayıda izolatla çalışılmış olup ilaç kombinasyonumuzun etkinliği yalnızca flukonazol dirençli *Candida* türlerinde değil oldukça geniş direnç profiline sahip çok sayıda *Candida* türü üzerinde denenmiştir. Lu ve ark'nın (100) ve Genç'in (101) çalışmalarında olduğu gibi bizim çalışmamızda da *Candida* izolatlarında gentamisinin etkisi araştırılmış ve antifungal etki gözlenmemiştir. Yine bu çalışmalara benzer şekilde flukonazol/gentamisin kombinasyonun izolatlar

üzerinde sinerjistik ve additif etkileri tespit edilmiş olup antagonizmaya rastlanmamıştır. Lu ve ark'nın (100) çalışmasında sinerji yalnızca azol dirençli *C. albicans* izolatlarında görülmüş olup bizim çalışmamızda ise hem azol dirençli non-*albicans* türlerinde hem azol duyarlı non-*albicans* türlerinde hem de azol duyarlı *C. albicans* izolatlarında tespit edilmiştir.

Çalışmamızda sinerjizma tespit edilen *Candida* türlerinin ve flukonazol direnç profilinin farklılığı, suşların kombinasyonla flukonazol MİK değerlerinde görülen 3 kat düşüş flukonazol/gentamisin kombinasyonun ve denenecek yeni antifungal/antimikrobiyal kombinasyonların klinikte özellikle kandidemi yönetiminde yer alabilmesi için klinik çalışmalara ışık tutmaktadır. Antifungal ajanlarla yeni ilaç kombinasyonlarının etkinliği fazla sayıda örnekle hem in vitro hem in vivo çalışmalarla desteklenmeli ve kombinasyonlardaki ajanların sinerji mekanizmalarının aydınlatılmalıdır.

6.SONUÇ

Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşları tiplendirilerek flukonazol duyarlılıklar mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı. Flukonazole dirençli ve duyarlı olan toplam 90 izolat ve 3 standart suşta flukonazol ve gentamisin hem tek başlarına hem de kombinasyonlardaki etkileri in vitro olarak araştırıldı. Sonuçlar FİK indeksi ile değerlendirildi.

Suşların %77,8'i kandan, %6,6'sı plevral mayiden, %4,4'er oranla yara kültürü ve vitreus sıvısından, %3,3'ü BOS'tan, %1,1 oranla trakeal aspirat, apse materyali ve idrardan izole edildi. İzole edilen suşların tür düzeyinde dağılımı incelendiğinde, *C. parapsilosis* (%42) en sık izole edilen tür olarak tespit edildi. *C. parapsilosis*'ten sonra *C. albicans* (%32) ve *C. tropicalis*'in (%10) en sık izole edilen türlerdi.

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına göre, tüm suşların flukonazol için ortalama MİK değerleri 8,58 µg/ml iken *C. albicans* izolatlarının ortalama MİK değeri 1,88 µg/ml bulundu. Non-albicans *Candida* izolatlarının MİK değerleri, *C. albicans* izolatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Tüm izolatların %25,3'ünde flukonazol direnci saptandı. Dirençli izolatların 16'sı *C. parapsilosis*, 2'si *C. albicans*, 2'si *C. firmetaria*, 1'i intrinsek dirençli *C. krusei* idi. 5 izolat flukonazole doza bağımlı duyarlı bulundu ve bu suşların 4'ü *C. glabrata*, 1'i *C. tropicalis* idi. Flukonazol direnci non-albicans *Candida* türlerinde *C. albicans* izolatlarına göre anlamlı yüksek bulundu. Gentamisinin tek başına *Candida*lar üzerinde etkisi incelendiğinde, tüm izolatların MİK değeri >512 olarak saptandı, tek başına etkin olmadığı görüldü. Flukonazol ve gentamisin kombinasyonlarında FİK indeks analizi sonucuna göre, 90 suştan 20'inde sinerjistik etki tespit edildi, geri kalan 70 suştaki etkileşim additif etki olarak değerlendirildi ve antagonizma görülmedi. Sinerjizma tespit edilen 20 izolatın 5'i flukonazol dirençli *C. parapsilosis*, 1'i doza bağımlı duyarlı *C. glabrata* izolatıdır. Geri kalan flukonazol duyarlı izolatların 6'sı *C. parapsilosis*, 4'ü *C. albicans*, 3'ü *C. tropicalis*, 1'i de *C. lusitanae*'dir. *C. parapsilosis* ATCC 22019

standart suşunda da sinerjistik etki tespit edilirken diğer standart suşlarda additif etkileşim saptandı. Sinerjizma tespit edilen izolatların MİK değerleri kombinasyon ile 3 katı kadar azaldı.

Flukonazol dirençli Candidalarda MİK değerlerinin kombinasyonla azalması flukonazol direnç mekanizmalarına kombinasyonun etkisinin daha fazla izolat sayısı ve moleküler çalışmalarla araştırılması uygun olacaktır.

Fırsatçı patojen olan Candida enfeksiyonları sıklığı artan ve mortal seyirli, özellikle immünsüprese hastalarda bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte görülen yönetimi zor enfeksiyonlardır. Hastanelerin özellikle yoğun bakım servislerinde bu komplike enfeksiyonların tedavisinde gentamisin ve flukonazol farklı etkenlere yönelik sıklıkla bir arada kullanılan antimikrobiyal ajanlardır.

Çalışmamızda gentamisin/flukonazol kombinasyonu ile sinerjizma tespit edilen izolatların flukonazol için MİK değerlerinin in vitro olarak 3 katına kadar azalmasına neden olmuştur. Çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuçlardan yola çıkılarak bakteriyel ve fungal komplike enfeksiyonlarda flukonazol dirençli suşlara ve/veya yüksek flukonazol MİK değeri olan suşlara karşı gentamisinle kombine kullanılmasının tedavide başarı oranlarının artması yönünde bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamız, kullandığımız antimikrobiyal kombinasyonuna alternatif olarak farklı ilaç kombinasyonlarının da kullanılabileceği çalışmalara ışık tutmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bulguların yapılacak daha kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi, etkili ilaç kombinasyonlarının bulunmasına ve tedavide kullanımına katkı sağlayacağını düşündürmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. 2014;9(7):e101510.
2. Pfaller M, Diekema D, Jones R, Sader HS, Fluit A, Hollis R, et al. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 2001;39(9):3254-3259.
3. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, Ergin Ç, Polat SH, Melchers W, et al. *Candida* ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci ve Konağın Genetik Yatkınlığında Güncel Durum. 2015.
4. Gary W. Procop DLC, Geraldine S. Hall WMJ, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gail L. Woods. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı: Hipokrat Kitabevi; 2017.
5. Arendrup M, Dzajic E, Jensen R, Johansen HK, Kjaldgaard P, Knudsen JD, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. 2013;19(8):e343-e353.
6. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattévin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. Emerging infectious diseases. 2014;20(7):1149.
7. Sanglard D, Coste ATJAa, chemotherapy. Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. 2016;60(1):229-238.
8. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RNJDm, disease i. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). 2011;69(1):45-50.

9. Pfaller MA, Tenover JC. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. 2012;125(1):S3-S13.
10. Wayne P, Archer G, Archer G, Archer G. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2008;3:6-12.
11. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, Microbiology EAJC, Infection. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). 2012;18(7):E246-E247.
12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sciences; 2015.
13. Tümbay E, Tümbay E. Candida türleri. 1999;1:1081-1086.
14. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi: Nobel Tıp; 2017.
15. Segal E. Candida species and Blastoschizomyces capitatus. Medical mycology, microbiology and microbial infections. 1998;4:423-460.
16. Çerikçioğlu N. Mantarlarda Virülans Faktörleri. ANKEM DERGİ. 2012;26:261-269.
17. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clinical microbiology reviews. 2000;13(1):122-143.
18. Hube B, Naglik J. Candida albicans proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 2001;147(8):1997-2005.
19. Yang Y-L. Virulence factors of Candida species. Journal of Microbiology Immunology and Infection. 2003;36(4):223-228.
20. Rühel R, Ritter B, Schaffrinski M. Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. Zentralblatt für Bakteriologie. 1990;273(3):391-403.
21. Kaynak Onurdağ F. Candida Türlerinin Biyofilm Oluşturan ve Planktonik Formlarının Antifungal Ajanlara Karşı in Vitro Duyarlılıklarının Araştırılmasında İki Farklı Yöntemin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2010;44:619-631.

22. Aslan H. Üriner Candida İzolatlarının Biyofili İm Yapabilme Özelliğinin Üriner Kateter Kullanımı ile İlişkinin Araştırılması ve Biyofili İm Varlığında Antifungal Duyarlılık Durumunun Değişimi. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50:256-265.
23. Nieto M, Tellería O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2015;81(1):34-40.
24. Karakoç ZÇ. İnvazif Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi.* 2019;32(2):118-123.
25. das Neves Miranda L, Rodrigues EC, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, et al. Candida parapsilosis candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ open.* 2012;2(4):e000992.
26. Dotis J, Prasad PA, Zaoutis T, Roilides E. Epidemiology, risk factors and outcome of Candida parapsilosis bloodstream infection in children. *The Pediatric infectious disease journal.* 2012;31(6):557.
27. Blyth CC, Chen SC, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics.* 2009;123(5):1360-1368.
28. Bakir M, Cerikcioglu N, Barton R, Yagci A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *Apmis.* 2006;114(9):601-610.
29. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G. Kan kültürlerinde saptanan Candida türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM DERGİ.* 2013;27:25-30.
30. Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen Candida türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *ANKEM Dergi.* 2010;24:202-208.
31. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 6 ed: Citeseer; 2018.
32. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An introduction to the medically important Candida species. *Candida and Candidiasis, Second Edition: American Society of Microbiology;* 2012. p. 11-25.

33. Segal EJ, Archer G, Archer G, Archer G, Archer G, Archer G. *Candida species and Blastoschizomyces capitatus*. 1998;4:423-460.
34. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(2):142-151.
35. Çuhadar T, Kalkancı A. Önem Kazanan Patojen: *Candida kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*). *Mikrobiyol Bul*. 2017;51(4):387-395.
36. Howell SA, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition: American Society of Microbiology; 2011. p. 1793-1821.
37. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(1):133-163.
38. Wu Y-M, Huang P-Y, Lu J-J, Shie S-S, Ye J-J, Wu T-S, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by *Candida parapsilosis* complex in a medical center in northern Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018;90(1):44-49.
39. Yapar N, Pullukcu H, Avkan-Oguz V, Sayin-Kutlu S, Ertugrul B, Sacar S, et al. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study. *Medical mycology*. 2011;49(1):26-31.
40. Tadeu L, Talarmin JP, Gastinne T, Bretonnière C, Miegerville M, Le Pape P, et al. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*. 2016;59(5):296-303.
41. Weiss E, Timsit J-F. Management of invasive candidiasis in nonneutropenic ICU patients. *Therapeutic advances in infectious disease*. 2014;2(5-6):105-115.
42. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal infection: diagnosis and management*: John Wiley & Sons; 2012.
43. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardiç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(3):478-488.
44. Ener B. *Candida* enfeksiyonlarında epidemiyoloji ve laboratuvar tanısı. *ANKEM DERGİ*. 2008;22:264-269.

45. ŞT Y. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1999;1:1129-1144.
46. Segal E, Elad D. Candidiasis. In: W M, R. H, editors. *Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections Medical Mycology*. London: Hodder Arnold; 2005. p. 579-623.
47. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology*. 2005;43(1):65-84.
48. Pincus D, Orena S, Chatellier S. Yeast identification—past, present, and future methods. *Medical mycology*. 2007;45(2):97-121.
49. Hilmioğlu-Polat S. Sık Görülen Sistemik Mikozlarda Serolojik Tanı.
50. Kalkancı A. Mikozların serolojik tanısında yenilikler. Konya: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 2005.
51. Wayne P. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—. NNCLS Document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
52. Pfaller M, Chaturvedi V, Diekema D, Ghannoum M, Holliday N, Killian S, et al. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(7):2155-2159.
53. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(4):643-658.
54. Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA; 2017.
55. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essentials of clinical mycology*: Springer; 2011.
56. Cohen J, Opal S, Powderly W. *Infectious Diseases*. Elsevier Limited; 2010. p. 1477-1489

57. Arikan S, Rex J, Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M. Antifungal agents. Manual of clinical microbiology, 9th ed ASM Press, Washington, DC. 2007:1949-1960.
58. Yeğenoğlu Y. Antifungal direnci gösteren mantarlar. Ankem Dergi. 2012;26(2):254-260.
59. Başustaoğlu AÇE. Klinik Mikrobiyoloji. Arikan S, Rex J, editors. Ankara: Atlas Kitabevi; 2009.
60. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, René P, Bourgault A-M, Lemieux C, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2008;19(1):55-62.
61. Yücesoy M. *Candida* Türlerinde Antifungal Direnç Mekanizmaları. Tuncer İ, Fındık D, Arslan U editörler. 2005;4:46-58.
62. Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, Dolejší E, Hrušková-Heidingsfeldová O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. European journal of biochemistry. 2001;268(9):2669-2677.
63. Santos ERd, Forno CFD, Hernandez MG, Kubiça TF, Venturini TP, Chassot F, et al. Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2014;56(6):477-482.
64. Özseven AG, Sesli Çetin E, Özseven L. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu. Mikrobiyol Bul. 2012;46(3):410-420.
65. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
66. Sabath L. Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1967;7:210-217.
67. Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined

by chequerboard and time-kill kinetic analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(3):573-576.

68. Döşler S, Peptidlerin GBAEK. Tek Başına ve Kombinasyon Halindeki Etkilerinin Araştırılması. *ANKEM Dergisi*. 2006;20:173-179.

69. Lamothe F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(suppl_1):i4-i13.

70. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74(4):323-331.

71. Kuzucu C, Durmaz R, Otlu B, Aktas E, Gulcan H, Cizmeci Z. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *The new microbiologica*. 2008;31(3):401.

72. Harrington R, Kindermann SL, Hou Q, Taylor RJ, Azie N, Horn DL. Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients. *Current Medical Research and Opinion*. 2017;33(10):1803-1812.

73. Çiçek B, Yılmaz H, Mutlu Yılmaz E, Esen Ş, Birinci A. *Candida* epidemiyolojisindeki değişikliklerin araştırılması. *Mikrobiyol Bül*. 2015;49(3):423-431.

74. Erdem F, Tuncer Erdem G, Oral B, Karakoç E, Demiröz AP, Tülek N. *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(4):637-648.

75. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH. Çeşitli *Candida* Türlerinin İki Farklı Triazole Duyarlılıklarının Mikrodilüsyon Yöntemi ile Araştırılması. *The Eurasian of Medicine*. 2007;39:173-177.

76. Coşkun MV, Ağan İ, Uyanık MH, Hancı H, Özden K. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Flukonazol E Test Duyarlılıklarının CLSI Referans Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırılması. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2017;21(2):400-406.

77. İris-Efe N, Ersöz-Arat M ŞF. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Klinik Dergisi*. 2008;2(21):61-64.
78. Cuenca-Estrella M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20:54-59.
79. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3 and Supplement S. 2008;3:6-12.
80. Kaya M. Hemokültürlerden izole edilen kandidaların flukonazol duyarlılıkları ve flukonazol ile siprofloksasin, levofloksasin ve doksisisiklin etkileşiminin araştırılması. 2010.
81. Karabıçak N, Alem N. *Candida* Türlerinin Triazol Antifungal Duyarlılık Profilleri: Antifungal Direncin Belirlenmesinde Yeni CLSI Türe Özgü Klinik Direnç Sınır Değerleri ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin Uygulanması. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(1):122-132.
82. Temiz H, Temiz S, Kaya Ş. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Okmeydanı Tıp Dergisi*. 2015;31(1):13-17.
83. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;69(1):45-50.
84. Diekema DJ, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2004;25(8):624-626.
85. Tortorano A, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler C, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004;23(4):317-322.

86. Öz Y. *Candida albicans* izolatlarında amfoterisin B ile flukonazol ve vorikonazol kombinasyonlarının in vitro etkinliği: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi 2005.

87. Dağ İ. Kaspofunginin *Candida glabrata*'nın klinik izolatlarına karşı vorikonazol, flukonazol, itrakonazol ve amfoterisin B ile kombinasyonlarının time-kill metodu, e-test metodu (iki farklı yöntemle) ve disk difüzyon yöntemleriyle in vitro etkilerinin değerlendirilmesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi 2007.

88. Menezes EA, Vasconcelos Júnior AAd, Silva CLF, Plutarco FX, Cunha MdCdSO, Cunha FA. In vitro synergism of simvastatin and fluconazole against *Candida* species. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2012;54(4):197-199.

89. de Queiroz Ribeiro N, Costa MC, Magalhães TFF, Carneiro HCS, Oliveira LV, Fontes ACL, et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. *International journal of antimicrobial agents*. 2017;49(6):695-702.

90. Gamarra S, Rocha EMF, Zhang Y-Q, Park S, Rao R, Perlin DS. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(5):1753-1761.

91. Liu X, Li T, Wang D, Yang Y, Sun W, Liu J, et al. Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with licofelone against resistant *Candida albicans*. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2101.

92. Li X, Yu C, Huang X, Sun S. Synergistic effects and mechanisms of budesonide in combination with fluconazole against resistant *Candida albicans*. *PloS one*. 2016;11(12):e0168936.

93. Li Y, Wan Z, Liu W, Li R. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *Candida* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1365-1369.

94. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(10):6179-6188.

95. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. PLoS One. 2016;11(3):e0150859.
96. Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, Bille J, Sanglard D. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2000;44(9):2373-2381.
97. Shrestha SK, Grilley M, Anderson T, Dhiman C, Oblad J, Chang C-WT, et al. In vitro antifungal synergy between amphiphilic aminoglycoside K20 and azoles against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Medical mycology. 2015;53(8):837-844.
98. Shrestha SK, Fosso MY, Green KD, Garneau-Tsodikova S. Amphiphilic tobramycin analogues as antibacterial and antifungal agents. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(8):4861-4869.
99. Kawakami H, Inuzuka H, Hori N, Takahashi N, Ishida K, Mochizuki K, et al. Inhibitory effects of antimicrobial agents against *Fusarium* species. Medical mycology. 2015;53(6):603-611.
100. Lu M, Yu C, Cui X, Shi J, Yuan L, Sun S. Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans*. International journal of antimicrobial agents. 2018;51(1):107-114.
101. Genç B. Flukonazole Dirençli *Candida* spp. İzolatlarında, Gentamisinin Flukonazolün Etkinliği Üzerine Etkisi. Edirne: Trakya; 2019.

8.EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Arş.Gör.Dr.Sümeysra Ebru UMUDUM
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Suşlarının Flukonazol Duyarlılıklarının Araştırılması ve Gentamisin'in Bu Duyarlılığa Etkisi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 03 Karar No: 29	Tarih: 22.04.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Doç.Dr.Zeynep KARAMAN ÖZLÜ
Üye

Doç.Dr.Ayşenur AKSOY
Üye

Doç.Dr.Yasemin ÇAYIR
Üye

Dr.Öğr.Üy.İbrahim KARABULUT
Üye

Dr.Öğr.Üy.Sinan YILMAZ
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye