

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

VORİKONAZOL, AMFOTERİSİN B VE
KASPOFUNGİNİN TEK BAŞINA VE KOMBİNASYONDA
CANDIDA KRUSEI İZOLATLARINA KARŞI İN VİTRO
FARMAKODİNAMİK ETKİNLİĞİ

Dr. Yasemin ÖZ

Mikoloji Bilim Dalı
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2010

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

VORİKONAZOL, AMFOTERİSİN B VE
KASPOFUNGİNİN TEK BAŞINA VE KOMBİNASYONDA
CANDIDA KRUSEI İZOLATLARINA KARŞI İN VİTRO
FARMAKODİNAMİK ETKİNLİĞİ

Dr. Yasemin ÖZ

Mikoloji Bilim Dalı
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nuri KİRAZ

ESKİŞEHİR
2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Yasemin ÖZ'e ait "Vorikonazol, Amfoterisin B ve Kaspofunginin Tek Başına ve Kombinasyonda *Candida krusei* İzolatlarına Karşı İn Vitro Farmakodinamik Etkinliği" adlı çalışma jürimiz tarafından Mikoloji Bilim Dalı'nda Yan Dal Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 20.04.2010

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nuri Kiraz
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji AD.

Üye: Prof. Dr. Şinasi Taner Yıldırım
Gülhane Askeri Tıp Fakültesi

Üye: Mehmet Ali Saraçlı
Gülhane Askeri Tıp Fakültesi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun.....Tarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir Kılıç
Dekan

TEŞEKKÜR

iv

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mikoloji Bilim Dalındaki uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Nuri Kiraz'a, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Filiz Akőit'e, Prof. Dr. Yurdanur Akgün'e, Prof. Dr. Tercan Us'a, Prof. Dr. Gül Durmaz'a, Doç. Dr. Nihal Dođan'a, Doç Dr. Abdurrahman Kiremitçi'ye, Yrd. Doç. Dr. Nilgün Kaőifođlu'na, yardım ve destekleri için tüm Mikrobiyoloji araştırma görevlileri ve personeline teőekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Öz, Y. Vorikonazol, amfoterisin B ve kaspofunginin tek başına ve kombinasyonda *Candida krusei* izolatlarına karşı in vitro farmakodinamik etkinliği. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Yan Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. Son yıllarda *C.glabrata* ve *C.krusei* gibi non-*albicans* *Candida* enfeksiyonlarının sıklığında artış bildirilmektedir. *C.krusei* flukonazole doğal dirençli olduğundan invaziv enfeksiyonları önemli bir sorundur ve alternatif tedavi seçenekleri gerektirebilir. Amfoterisin B (AMB) ve vorikonazol (VOR) aynı hedefe farklı mekanizmalarla, kaspofungin (CAS) tamamen farklı bir hedef üzerinden etki göstermektedir. Bu çalışmada 30 klinik *C.krusei* izolatına karşı VOR, AMB ve CAS'in tek başına ve kombinasyonlarında in vitro farmakodinamik özellikleri ve ilaç etkileşimleri araştırılmıştır. Antifungallerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) CLSI referans yöntemle tespit edildi. İlaç etkileşimlerini değerlendirmek için *time-kill*, postantifungal etki (PAFE), Etest ve disk difüzyon (DD) yöntemleri kullanıldı. *Time-kill* ve PAFE deneyleri eşzamanlı, antifungal MİK değerlerinin 1/4, 1 ve 4 katlarıyla uygulandı. *Time-kill* çalışmalarında, VOR doz ilişkisiz fungustatik etki, AMB ve CAS doz ilişkili fungusidal etki gösterdi. AMB ve CAS konsantrasyonla bağlantılı uzun PAFE sergiledi ancak VOR ölçülebilir PAFE göstermedi. En uzun PAFE CAS ile görüldü ve VOR ya da AMB ile kombinasyonu tek başına sağladığı etkiye belirgin bir üstünlük oluşturmadı. *Time-kill* kombinasyon testlerinde en sık etkileşme şekli indifference ve en nadir etkileşme şekli antagonizmaydı. Sinerjik etkileşme VOR-CAS kombinasyonu için 1/4x MİK'de ve AMB-CAS kombinasyonu için 4x MİK daha sık gözlemlendi. Etest ve *time-kill* kombinasyon testleri arasında VOR-CAS kombinasyonu için %67 ve AMB-CAS kombinasyonu için %50 uyum saptandı. Sonuç olarak, CAS'in VOR ya da AMB ile kombinasyonu *C.krusei* enfeksiyonları için ümit verici görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Candida*, *time-kill*, PAFE, farmakodinamik, kaspofungin

Destekleyen kurumlar: TÜBİTAK, proje no 109S015

ABSTRACT

Oz, Y. In Vitro pharmacodynamic activities of voriconazole, amphotericin B and caspofungin alone and in combination against clinical isolates of *Candida krusei*. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Medical Speciality Thesis in Division of Mycology, Eskisehir, 2010. Recently, the incidence of non *albicans Candida* spp. infections, such as *C.glabrata* and *C.krusei* are rising. Because of *C.krusei* is intrinsically resistant to fluconazole, invasive infections are important problems and it can be required the alternative treatment choices. Amphotericin B (AMB) and voriconazole (VOR) demonstrate effect with different mechanisms to same target, caspofungin (CAS) demonstrates effect entirely upon a different target against fungi. In this study, we evaluated drug interactions and pharmacodynamic activities of VOR, AMB and CAS alone and in combination against 30 clinical *C.krusei* isolates. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using CLSI reference method. *Time-kill*, postantifungal effect (PAFE), Etest and disk diffusion (DD) methods were used to evaluate drug interactions. We simultaneously performed *time-kill* and PAFE experiments with RPMI 1640 medium and used 1/4, 1 and 4 times the MIC of all antifungals. VOR exhibited dose independent fungistatic effect, AMB and CAS showed dose dependent fungicidal effect. AMB and CAS displayed prolonged concentration depended PAFE, but VOR displayed no measurable PAFE. CAS showed the longest PAFE and combination with neither VOR nor AMB were superiority on PAFE singly. The most common interaction was indifference, the most rare interaction was antagonism by *time-kill* methods. Synergistic interaction was frequently observed for 1/4x MIC of VOR-CAS and 4x MIC of AMB-CAS combinations. Agreement between Etest and *time-kill* combination testing were 67% for VOR-CAS and 50% for AMB-CAS combination. As a result, combination of CAS with VOR or AMB seems promising for *C.krusei* infections.

Key Words: *Candida*, *time-kill*, PAFE, pharmacodynamic, caspofungin

Supported by TUBİTAK, project no 109S015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Candida</i> 'ların Genel Özellikleri	3
2.1.1. <i>Candida</i> Hücresinin Biyolojik Yapısı	3
2.1.2. <i>Candida</i> 'ların Mikolojik Özellikleri	4
2.1.3. Tıbbi Önemi Olan <i>Candida</i> Türleri	4
2.1.4. Patojenite	6
2.1.5. Epidemiyoloji ve bulaşma	9
2.2. Klinik <i>Candida</i> Enfeksiyonları	9
2.2.1. Yüzeysel <i>Candida</i> Enfeksiyonları	9
2.2.2. Dissemine kandidiyazis ve Kandidemi	10
2.2.3. Derin Yerleşimli <i>Candida</i> Enfeksiyonları	11
2.3. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tanısı	13
2.3.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması	13
2.3.2. Mikroskopik İnceleme	13
2.3.3. Kültür	13
2.3.4. Serolojik Yöntemler	14
2.3.5. Fungal Metabolitlerin Saptanması	16
2.3.6. Spesifik Nükleik Asitlerin Saptanması	16
2.4. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	17
2.4.1. Polyenler	17
2.4.2. Azoller	19
2.4.3. Ekinokandinler	20
2.4.4. Antifungal Kombinasyonlar	21

2.4.5. Farmakodinamik Özellikler	23
2.4.6. Antifungal İlaçlara Direnç	24
2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri	25
2.5.1. Buyyon Dilüsyon Testleri	26
2.5.2. Epsilometer test (Etest)	26
2.5.3. Disk Difüzyon Testi	27
2.5.4. <i>Time-kill</i> testi	27
2.6. İn vitro Antimikrobiyal İlişkilerin Saptanması	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. İzolatlar	29
3.1.1. İzolatların Tanımlanması	29
3.2. Besiyerleri	30
3.3. Antifungal Maddeler	31
3.4. Antifungal Duyarlılıkların Saptanması	31
3.4.1. Buyyon Mikrodilüsyon Testi (BMD)	32
3.4.2. Disk Difüzyon Testi	34
3.4.3. Etest	34
3.4.4. <i>Time-kill</i> Testi	35
3.4.5. Post Antifungal Etki (PAFE)	35
3.5. Antifungal Kombinasyon Testleri	36
3.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Kombinasyon	36
3.5.2. Etest Yöntemi ile Kombinasyon	37
3.5.3. <i>Time-kill</i> ve PAFE Yöntemleri ile Kombinasyon	38
4. BULGULAR	39
4.1. Antifungal Duyarlılık Sonuçları	39
4.2. Kombinasyon Test Sonuçları	41
4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları	41
4.2.2. Etest Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları	43
4.2.3. <i>Time-Kill</i> Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları	45
4.2.4. PAFE Çalışmalarının Sonuçları	57
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMB	Amfoterisin B
ATCC	American Type Culture Collection
BG	1,3-β-D-glukan
BMD	Buyyon Mikrodilüsyon Testi
CAS	Kasporfungin
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DA	D- arabinitol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EUCAST	European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing
Etest	Epsilometer test
FDA	Food and Drug Administration
FİKİ	Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi
FLU	Flukonazol
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KOH	Potasyum hidroksit
LA	L-arabinitol
MFK	Minimum fungusidal konsantrasyon
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonik asit
MSS	Merkezi sinir sistemi
NK	Natural killer hücre
PAFE	Postantifungal etki
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Patates dekstrozu agar
R	Dirençli
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Duyarlı
SAP	Salgısal aspartil proteinaz
SDA	Sabouraud dekstrozu agar
SDD	Doza bağlı duyarlı
XTT	Tetrazolium tuzu
VOR	Vorikonazol

ŞEKİLLER

	Sayfa
3.1. Birinci Etest kombinasyon yöntemi	37
3.2 İkinci Etest kombinasyon yöntemi	37
4.1. Disk difüzyon ve Etest duyarlılık yöntemleri	41
4.2. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyonlar	43
4.3. İkinci Etest kombinasyon yöntemi	45
4.4. VOR ve CAS'in tek başına ve kombinasyonda <i>time-kill</i> grafikleri	47
4.5. AMB ve CAS'in tek başına ve kombinasyonda <i>time-kill</i> grafikleri	51
4.6. VOR ve CAS'in tek başına ve kombinasyonda PAFE grafikleri	57
4.7. AMB ve CAS'nin tek başına ve kombinasyonda PAFE grafikleri	62

TABLOLAR

	Sayfa
3.1. CAS için dilüsyon şeması	32
3.2. VOR ve AMB için dilüsyon şeması	33
4.1. SMD, Etest ve disk difüzyon yöntemleri duyarlılık sonuçları	40
4.2. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyon sonuçları	42
4.3. Birinci Etest kombinasyon yöntemi sonuçları	44
4.4. <i>Time-kill</i> testleri ile farklı MİK'lerde zamana göre duyarlılık kategorileri	56
4.5. <i>Time-kill</i> testleri ile farklı MİK'lerde zamana göre duyarlılık kategorilerinin toplu sonuçları	57
4.6. Antifungallerin tek başına ve kombinasyonda farklı MİK konsantrasyonları için PAFE süreleri	66
4.7. Farklı MİK konsantrasyonları için genel PAFE sonuçları	67
4.8. Etest ve <i>time-kill</i> ile elde edilen duyarlılık kategorilerinin karşılaştırması	68

1. GİRİŞ

Candida'ların tarihçesi Hipokrat ve Galen'e kadar dayanmakla birlikte, ilk kez 1839'da Langenbeck tarafından bir hastanın ağzındaki lezyondan yapılan kazıntı örneğinde mantarın gözlemlenmesi ile keşfedilmiştir. Pamukçuğun etkeni olarak mantarın tarifini 1842'de Gruby yapmış, 1843'de Robin pamukçuk etkeni mantarın sistemik enfeksiyona neden olduğunu gözlemiş ve bu mantarı ilk kez *Oidium albicans* olarak adlandırmıştır. 1890'da Zopf tarafından önerilen *Monilia albicans* ismi ile birlikte yıllar içinde, aynı mantar için 100'ü aşkın isim kullanılmıştır ve 1923 yılında Berkhout *Candida albicans* ismini kullanmıştır. 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıma girmesi ile *Candida* enfeksiyonlarının en önemli dönemi başlamıştır (1, 2).

Candida türleri, *Deuteromycota (Fungi imperfecti)* içinde, *Cryptococcaceae* ailesinde yer alan maya mantarlarıdır. Bu cins içinde 200'den fazla tür bulunmaktadır. *Candida* türleri normal flora üyesi olarak ciltte, solunum ve sindirim sisteminde, kadın genital sisteminde yaygın olarak bulunabilirler. Normal flora üyesi iken immün sistemin herhangi bir nedenle baskılandığı durumlarda dokulara invaze olarak hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bunun için en önemli predispozan faktörler; i) kemoterapi, başta kemik iliği olmak üzere organ transplantasyonu ve bunlara eşlik eden derin immünosüpresyon; ii) hastanede uzun süre yatış; iii) damar içi kateterizasyon; iv) geniş spektrumlu antimikrobik ilaçların uzun süre kullanımı; v) artmış profilaktik antifungal ilaç kullanımı olarak özetlenebilir (3).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının en sık etkeni *C.albicans*'dır, ancak birçok merkezden *C.glabrata* ve *C.krusei* gibi non-*albicans Candida* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonların sıklığında artış bildirilmektedir. Bunun en önemli nedeni olarak antifungal ajanların yaygın kullanımı, özellikle profilaktik flukonazol (FLU) kullanımı suçlanmaktadır. *C.krusei* intrinsik olarak FLU'e dirençli olduğundan bu profilaksiden etkilenmez. Dolayısıyla antifungal profilaksi duyarlı suşların elimine olarak dirençli türlerin baskın hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle hastanede yatmakta olan ve çeşitli nedenlerle immün sistemi baskılanmış hastalar için *C. krusei* gibi daha dirençli türler ile oluşan enfeksiyonlar önemli bir sorun haline gelmekte ve tedavide alternatif antifungallerin kullanımını gerektirmektedir.

İnvaziv fungal enfeksiyonların klinik öneminin artışı ile birlikte, daha geniş spektrumlu ve daha düşük toksisiteli yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik çabalar hız kazanmıştır. Mantarlar bakteri ve viruslardan farklı olarak ökaryotik mikroorganizmalardır ve hücre yapısı ve organelleri açısından memeli hücrelerine benzerlik göstermektedir. Bu nedenle ilaç araştırmaları memeli hücrelerine zarar vermeden mantar hücrelerini selektif olarak etkileyebilecek hedeflere yönelik olmalıdır (4). En önemli iki hedef, fungal hücre duvarı ve hücre membranıdır ve mevcut sistemik antifungal ilaçların büyük bir kısmı bu iki hedefe yöneliktir. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış polyenler, pirimidinler, azoller ve ekinokandinler gibi farklı kimyasal sınıflarda birkaç antifungal ajan bulunmaktadır (5). Bununla birlikte yüksek toksik etkileri, düşük tolere edilebilirlikleri ya da dar etki spektrumları nedeniyle tedavide sıklıkla sorunlar yaşanmaktadır. Bu sorunlar, invaziv fungal enfeksiyonların kontrolünde kombinasyon tedavilerinin etkinliklerinin araştırılması çabalarını ortaya çıkarmıştır (5). Dirençli enfeksiyonların tedavisinde ilaç kombinasyonlarının kullanımını değerlendiren birkaç rapor bulunmaktadır. Fakat klinik izolatlar üzerinde kombinasyonların etkinliğini değerlendiren yayınlar nadirdir. Antifungal etkileşimleri değerlendiren böyle testler, kombinasyon tedavilerinin seçiminde yardımcı olabilir (6).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Candida*'ların Genel Özellikleri

Candida türleri yaygın görülen mayalar olup, bitkilerde, memeli sindirim kanalında ve insan mukoza ve derisinde bulunur. İnsan gastrointestinal kanalın her yerinde bulunabilirler ve en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır.

2.1.1. *Candida* Hücresinin Biyolojik Yapısı

Mantarlar basitçe, fotosentez yapmayan, plazma membranı ve en dışta hücre duvarı bulunan ökaryotik hücrelerdir. Membranla çevrili bir çekirdek ve içinde bir çekirdekçik ile lineer kromozomlar bulunur. Stoplazmada mitokondri, Golgi aygıtı, vakuoller, birkaç çeşit vezikül ve 80S ribozomlar gibi organeller ile hücre iskeleti bileşenleri yer almaktadır. Bu bileşenler, membran hareketinde rol oynayan mikrotübüller, sitoplazmik akışkanlıktan sorumlu aktin ve aktinle birlikte organellerin hareketini sağlayan miyozindir (7).

Hücre membranı, bulundurduğu ozmoenzimler sayesinde moleküllerin transferini sağlar. Duvar sentezinde rolü olan kitin sentetaz ve sinyal iletiminde rolü olan enzimler membranda bulunur. *Candida* hücre membranı ayrıca, fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin, fosfatidil inositol gibi fosfolipitleri de içerir. Hücre membranı büyük miktarda sterol içerir, membran lipitlerinin %22'sini steroller oluşturur. Sterollerin % 95'i ergosterol formundadır ve birçok antifungal ajan ergosterolün farklı sentez basamakları üzerinden etki etmektedir (7).

Hücre duvarı, hücreye şeklini veren, osmotik basınca karşı hücreyi koruyan ve moleküllerin transferinde rolü olan sert bir yapıdır. *Candida* hücre duvarı, antijenik belirteçleri, memeli hücrelerinde bulunmayan anahtar biomolekülleri bulundurur ve konak hücrelere tutunmayı sağlar. Hücre duvarının en temel bileşenleri olan karbonhidratlar, mannan ya da mannoproteinler, glukanlar (β -1,3 ve β -1,6 bağlı) ve kitinden oluşmaktadır (8, 9). Glukanlar ve kitin duvarın yapısal iskeletini oluşturur ve glukanlar duvar ağırlığının %47-60'ını oluşturmaktadır. Kitin N-asetilglukozamin'in bir polimeridir ve maya hücre duvarlarının yalnızca %2-4 kadarını oluşturan önemli bir yapısal bileşendir (9). Mannoproteinler ise yapısal polimerler içindeki hücre duvarının şekilsiz kısmının esas elemanıdır ve hücre duvar karbonhidratlarının %40'ını oluşturur. *Candida* hücre duvarındaki ana antijenik yapı

olan mannanın yapısal farklılığına göre A ve B olarak iki serotipe ayrılır. Hücre duvarının diğer bileşenleri proteinler (% 5-15), lipidler (% 2-5) ve inorganik fosfattır (7, 9, 10).

2.1.2. *Candida*'ların Mikolojik Özellikleri

Candida'lar tek hücreli, ökaryotik, tomurcuklanarak veya ikiye bölünerek çoğalan, 3-4 µm büyüklükte yuvarlak veya oval görünümlü (blastospor) mayalardır. Blastosporlar ana hücreden ayrılmadan uzayarak 5-10 µm uzunluğunda yalancı hif (pseudohypha), bazen de gerçek hif oluşturabilirler (11, 12). *Candida albicans*, besince fakir bir ortamda iyi yedek besin depolayan, gerçek ya da yalancı bir hifin ucunda veya arasında bulunan, tek hücreli, kalın duvarlı, geniş oval yapılı klamidospore ve serumda 37 °C'de bekletildiğinde, 1.5-2 saatte çimlenme borusu (germ tüp) oluşturmaktadır. Bu özellikler *C.albicans*'ın hızlı ön idantifikasyonu için önemlidir (1, 11, 13). Ancak *C.dublinskiensis*'in de germ tüp ve klamidospor oluşturabildiği unutulmamalıdır. Bunun yanında *C.glabrata* ve *C.famata*, gerçek ya da yalancı hif oluşturmamaları ile diğer türlerden ayrılabilirler (11).

Gram boyama ile tüm *Candida* türleri Gram olumlu boyanır. Maya elemanlarının örnekler içinde aranmasında gram boyama, kalkoflor beyazı ve KOH gibi yöntemler kullanılmaktadır (14, 15). *Candida* türlerinin çoğu yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Sabouraud dekstrozu agar (SDA) gibi mikolojik besiyerlerinde 37 °C'de 1-3 günde beyaz ya da krem renkli, yumuşak kıvamlı, genellikle S koloni morfolojisinde ve tipik maya kokulu koloniler oluştururlar (13, 14).

C.krusei dışındaki *Candida* türlerinin üreaz enzimi yoktur. *Candida* türleri oksijen varlığında spesifik karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Bazıları fermentatiftir. Bu özellik *Candida*'ların maya formundaki diğer mantarlardan ayırımında önemlidir (14).

2.1.3. Tıbbi Önemi Olan *Candida* Türleri

Normal florada bulunan *Candida*'lar, herhangi bir nedenle savunma sistemi bozulmuş hastalarda dokuları istila ederek yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara neden olabilirler. *C. albicans* hemen hemen tüm *Candida* enfeksiyonlarından en sık soyutlanan türdür (14). Bunun nedeni normal florada yüksek sıklıkta bulunması ve

bazı virulans faktörlerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (16,17). *C. albicans* A ve B serotipleri sağlıklı bireylerde eşit dağılım göstermekteyken, immüdüştün bireylerde B serotipin daha sık görüldüğü bildirilmektedir (14, 18).

Candida enfeksiyonlarından ikinci en sık izole edilen *C.glabrata*, normal gastrointestinal ve genital floranın bir üyesidir. En sık üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur ancak, derin doku tutulumu ve fungemiye de neden olabilmektedir. İzolatlarının büyük çoğunluğu FLU'e doza bağımlı duyarlıdır (13, 14). *C.tropicalis*, *C.albicans* kadar virulan olduğu bilinen, invazyon yeteneği yüksek bir *Candida* türüdür (13). Hatta lösemi ve lenfomalı hastalarda *C.albicans*'tan daha virulan davrandığı bildirilmektedir (14).

Tıbbi önemi olan diğer *Candida* türleri; *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir (14). Ancak bu liste, ender görülen yeni türlerin önem kazanması ile daha da büyüme eğilimindedir.

C.krusei

Candida genusunun 1839'daki ilk keşfinden yaklaşık 75 yıl sonra, Castellani, *C.krusei*'nin insanlarda enfeksiyona neden olabildiğini öne sürmüştür. Başlangıçta virulansı düşük bir kommensal olarak tanımlanmakta iken, son 20-30 yıl içinde dikkat çeken bir fungal patojen haline gelmiştir. Maya ve pseudohif olmak üzere iki temel morfolojik forma sahiptir ve besiyerinde üretildiğinde her iki formu birlikte bulunur. En yüksek üreme ısısı 43-45°C'dir. Diğer *Candida* türleri üremek için ilave vitamine ihtiyaç duyarken, *C.krusei* vitaminsiz besiyerinde üreyebilir (19). SDA'da mat, pürüzlü, kuru görümlü, beyazımsı ve yayılan koloniler oluşturur (20).

İnvaziv kandidozlarda *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'in ardından beşinci sırada *C.krusei* yer almakta ve *Candida* nedenli invaziv enfeksiyonların %90'dan fazlası bu beş tür tarafından oluşturulmaktadır (21). Bununla birlikte, hematolojik malign hastalığı bulunan hastalardaki kandidemilerin en sık iki etkeninin *C.glabrata* ve *C.krusei* olduğu bildirilmektedir (22).

Candida'lar, enfeksiyonların patogeneğinde rol oynayan adezyon, fosfolipaz ve proteinaz üretimi, hif oluşumu gibi çeşitli virulans faktörlerine sahiptir. *C.krusei*'nin, enfekte dokuda hem maya hem de hif formunda ürediği ancak

C.albicans ve *C.tropicalis*'ten daha az invazyon yaptığı, ağız epitel hücrelerine daha az afinite gösterdiği ve çok daha düşük oranlarda adezyon yaptığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (19, 23). Ayrıca *C.krusei* diğer *Candida*'lara oranla konak savunma mekanizmalarından daha fazla etkilenmektedir. Ancak cansız yüzeylere adezyon yeteneği ve hidrofobisitesi daha yüksek ve daha belirgin biofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğundan, implant ya da kateter gibi yüzeylerde kolonize olma oranının daha yüksek olabileceği bildirilmektedir (23). *C.krusei*, *C.albicans* ve diğer *Candida* türleri ile karşılaştırıldığında daha az virulan olduğundan, enfeksiyon oluşturabilmesi konağın savunma sisteminin kısmi ya da tam yetersizliğine bağlıdır. Bu da hematolojik malign hastalıklı ve bu nedenle savunma sistemi bozulmuş hastalarda *C.krusei*'nin daha sık enfeksiyon oluşturmasının nedenlerinden biri olabilir (19).

En sık klinik formu, özellikle hematolojik maligniteli, immüdüşkün hastalarda görülen fungemidir. Bunun yanında, genitoüriner sistem enfeksiyonları, artrit, sinüzit, pnömoni, endoftalmit, endokardit gibi pek çok sistemde enfeksiyon oluşturabildiğini gösteren yayınlar mevcuttur (24-32). *C.krusei* izolatları ketokonazole duyarlı gibi görünürler ancak FLU'e dirençlidirler. Bu, doğal (intrinsic) azol direncidir ve hem azalmış enzim duyarlılığı hem de azalmış ilaç birikimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (33). Bu nedenle FLU tedavisi ya da profilaksisinden etkilenmezler. İmmüdüşkün hastalar arasında profilaktik FLU kullanımının yaygınlaşması *C.albicans* ve *C.tropicalis* gibi duyarlı suşların neden olduğu enfeksiyonları belirgin oranda azaltırken, *C.krusei* gibi dirençli türlerin oluşturduğu enfeksiyonların sıklığında artışa neden olmaktadır. Bu yüzden, profilaktik FLU kullanımının yaygın olduğu hematolojik malign hastalıklı hastalar arasında *C.krusei* enfeksiyonlarının daha sık görüldüğü düşünülmektedir.

2.1.4. Patojenite

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının genellikle immüdüşkün hastalarda görülmesi nedeniyle, bu enfeksiyonların oluşmasında virulans faktörlerinin katkısının düşük olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte enfeksiyonlar sırasında birtakım sekretuar enzimler de saptanmıştır. Bu nedenle invaziv *Candida* enfeksiyonları hem konak savunmasındaki yetersizlik hem de mikroorganizmanın virulans faktörlerinin bir sonucudur.

***Candida* Virulans Faktörleri**

Candida'ların sahip olduğu bazı özellikler konağın savunma sistemini yenerek hastalık oluşturmaya çalışır. Mikroorganizmanın kolonizasyon ve ardından invazyon yapabilmesi için, konağı tanınması ve adezyonu şarttır. Dış hücre duvarı tabakası mannopteinler, β -1,3 ve β -1,6 bağlı glukan ve kitin içermekte ve bu tabaka *Candida*'ların konak yüzeyine yapışması ve ardından kolonizasyonunda önemli rol oynamaktadır (16). *Candida* hücrelerinin virulansı, konak hücrelerine tutunma eğilimi ile doğru orantılıdır ve adezyon major virulans faktörü olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte, *C.krusei*'nin ağız epitel hücrelerine diğer sık görülen *Candida* türlerine oranla çok daha düşük oranda adezyon gösterdiği bildirilmektedir (23). Adezyonu takiben slime faktörün oluşumu önemli bir virulans faktörüdür. Yapay yüzeylere adezyon ve tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşumu, antifungal ilaçlara sıklıkla direnç göstermesi ve biyofilm oluşturan hücrelerin artmış patojenliği nedeniyle son yıllarda önemli bir sorun haline gelmiştir (34). Hastaların bir kısmında sistemik kandidoz damar içi kateterlerin kontaminasyonu ile başlamakta ve biyofilm tabaka, içindeki mayaların antifungal ilaçlara direncinde önemli rol oynamaktadır. *Candida*'lar, adezyonda rol alan, genellikle polisakkarit ya da glukoprotein yapıda adezinlere ve hücre ilişkili ya da serumda bulunan ligandlara sahiptir. Bu adezinler, Als (agglutinin-like sequence) protein ailesi, Hwp1p, Eap1p, Csh1p ve diğer daha az bilinen hücre yüzey reseptörlerinden oluşmaktadır (34).

Fenotipik değişiklik, invazyon sırasında değişen çevre şartlarına mantarın uyumunun sağlanmasında önemli bir faktördür. Bazı *C.albicans* hücre topluluklarında, hücre yüzey özellikleri, koloni görünümü, biyokimyasal özellikleri ve metabolizması, daha virulan ve enfeksiyonlarda daha etkili forma değişiklik gösterebilmektedir (35). Ortamın ısısı, pH'ı, CO₂ konsantrasyonu gibi çevresel koşullardaki değişiklikler, *Candida*'larda tek hücreli, ovoid maya hücreleri (blastospor) ile hif ya da pseudohiflerin oluşturduğu filamantöz yapılar arasında morfolojik değişikliklere neden olabilir. Mantarın bu özelliği enfeksiyonların patogeneğinde önem kazanmaktadır. Çevreye yayılma ve yeni konağa ulaşmada maya hücreleri sorumlu iken, doku hasarı ve invazyon için hifler gereklidir ve biyofilm oluşumunda her iki form da yer almaktadır (16, 36).

Önemli diğer virulans faktörleri, proteazlar (salgısal aspartil proteinaz=SAPs), lipazlar ve fosfolipazlar gibi hidrolitik enzimlerin sentezi ve

salınmasıdır. Bu enzimlerin fungal beslenmedeki önemli rolleri yanı sıra, lezyon alanındaki çoğu konak proteinlerinin (albümin, hemoglobin, keratin, salgısal IgA) yıkılması ile doku hasarı, invazyon, konak savunmasından kaçış gibi mekanizmalarla *Candida* patogenezinin güçlü katkıları bulunmaktadır. İn vitro koşullarda *C.albicans*, *C.dublinskiensis*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'te aktif olarak proteinaz üretimi saptanmıştır (16, 34, 37).

***Candida* Enfeksiyonlarına Konak Yanıtı**

Candida enfeksiyonlarına konak yanıtı, doğal bağışıklık ve hücre aracılı kazanılmış bağışıklık ile fungal virulans arasındaki ilişkinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Mantarın mukozal yüzeyde uzun süre kommensal olarak kalması ya da patojenliğe dönüşümü, doğal ve kazanılmış bağışıklığın bütünü ile ilişkilidir. Mikroorganizmaya ilk yanıt, cilt ve mukoz membranların oluşturduğu fiziksel bariyerler ile oluşur. *Candida* enfeksiyonlarına doğal bağışıklıkta nötrofiller, monositler ve doku makrofajları, doğal öldürücü (NK) hücreler ile opsonin (spesifik antikorlar ve kompleman komponentleri), kollektin, defensin, mannoz bağlayan protein gibi moleküller görev almaktadır. *Candida*'lar deri veya mukoza engelini aştıklarında, kandidemi ve sistemik kandidoza karşı savunmada rol oynayan en önemli hücre tipi nötrofillerdir ve bunların sayı ve fonksiyonlarındaki bozukluk konağın *Candida* enfeksiyonlarına duyarlılığını arttırmaktadır. Bununla birlikte makrofajlar dissemine kandidozda büyük role sahiptirler. Opsoninler nötrofil fagositozu için çok gerekli olmasalar da, fungusun hücre içi öldürülmesinde önemli rol oynamaktadırlar. NK hücreleri fungusa karşı direkt öldürücü etki gösteremezler, ancak fungus ile NK hücreleri arasında onların fonksiyonlarını etkileyen bir etkileşim meydana gelebilir ve bu etkileşim fagositik hücre fonksiyonlarını uyaran sitokinlerin salınımını başlatabilmektedir (38-40).

Fungal enfeksiyonlara karşı özgül (kazanılmış) savunmada etkili mekanizma hücre aracılı immünitedir, ancak antikor yanıtının belli tipleri de koruyucu role sahiptir. Genellikle Th1 (T hepler 1) aracılı immünite enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında, Th2 ise enfeksiyona duyarlılıkta etkilidir. Th1 ve Th2 hücrelerin etkinlikleri, enfeksiyon bölgesindeki fungusidal fagositleri etkinleştirir ya da etkinliklerini durdururlar. Fagositlerin etkinlikleri Th1 tipi sitoksinler tarafından artırılır; Th2 tipi sitokinler ise fagositik fonksiyonları bozar (38-41).

C.krusei diğer *Candida* türleri ile karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir patojendir ve kommensallikten patojenliğe dönüşmesinde en önemli etken konağın savunma sistemindeki kısmi ya da tam yetersizlikle ilişkilidir. Bu yüzden, *C.krusei* enfeksiyonlarının sıklığının genellikle immün yetmezlikli hastalarda gözlenmesi şaşırtıcı değildir (23).

2.1.5. Epidemiyoloji ve Bulaşma

Candida türleri toprakta, suda, yiyeceklerde, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunabilirler. Sağlıklı insanlarda cilt ve mukoz membranlarda kommensal olarak bulunurlar ve herhangi bir nedenle konak savunma sistemi bozulduğunda patojenite kazanabilirler. Bu nedenle enfeksiyonların çoğunlukla endojen floradan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sistemik *Candida* enfeksiyonları için en sık giriş yolu gastrointestinal sistemdir. Nadiren vajinal kandidozlu anneden bebeğine vertikal bulaşma, yatan hastalar arasında ya da sağlık çalışanlarından nozokomiyal geçiş gibi insandan insana bulaşma da söz konusu olabilir. Yatan hastalarda kolonizasyonun, sağlıklı kişilere göre daha fazla olduğu saptanmıştır (14, 42).

Nozokomiyal kan akımı enfeksiyonu etkenleri arasında *Candida*'lar Amerika'da 4., Avrupa'da ise 6. sırada yer almakta ve yoğun bakım hastaları arasında daha sık görülmektedir. *C.albicans* en sık görülen tür olmakla birlikte, non-*albicans* türlerin sıklığında artış bildirilmektedir. Bu artıştan ikinci jenerasyon azol antifungallerin yaygın kullanımı sorumlu tutulmakta ve bununla uyumlu olarak FLU'e daha az duyarlı (*C.glabrata*) ya da doğal dirençli (*C.krusei*) izolatlarda belirgin artış bildirilmektedir (43).

2.2. Klinik Candida Enfeksiyonları

2.2.1. Yüzeysel Candida Enfeksiyonları

Yüzeysel *Candida* enfeksiyonları hem immüdüşkün hem de immünkompetan bireyleri etkileyebilmektedir. Pamukçuk olarak bilinen oral *Candida* enfeksiyonları oldukça yaygındır. Dil ve diğer ağız içi yüzeylerde krem gibi beyaz yamalarla karakterize, oral kandidozun spesifik bir formudur, ağrılıdır ve kaldırıldığında kanayabilir. Sıklıkla süt emen bebeklerde, kanserli, AIDS'li hastalarda, inhale steroid kullananlarda görülür (1). Bu klasik lezyonlara ilave olarak; akut atrofik kandidoz, kronik atrofik kandidoz, anguler cheilit ve lökoplaki'yi içeren diğer formlar da

görülebilmektedir. Tanı lezyonun klinik görünümü, lezyondan alınan örneklerin mikroskopik incelenmesi ve kültürü ile yapılabilir (1, 44).

Candida özofajiti, genellikle hematopoetik veya lenfatik sistem kanseri tedavisi, antibiyotik, steroid ya da omeprazol kullanımı ve ilerlemiş HIV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yutma güçlüğü, ağrılı yutma ve retrosternal ağrı gibi diğer özofajitlerden ayırt edilemeyen semptomlar görülür. Tanı endoskopide pamukçuk benzeri beyaz yamaların görülmesi ve biyopsi ile yapılabilir (1, 44).

Vulvovajinal kandidoz diğer bir mukozal *Candida* enfeksiyonudur ve vajinitlerin en sık nedeni *Candida*'lardır. Tüm kadınların yaklaşık %75'i hayatlarında bir kez *Candida* vajiniti atağı geçirirler ve bunların %85-90'ında *C.albicans* etkindir (44, 45). Bu yaygın enfeksiyon en sık kontrolsüz diyabet, antibiyotik tedavisi, gebelik, hormon replasman tedavisi, immünsüpressif tedavi durumlarında görülür. Semptomatik vajinal kandidoz kaşıntı, yanma hissi, kesilmiş süt benzeri akıntı gibi yakınmalar, vajinal ve/veya vulvar eritem ve ödem gibi bulgular vardır (1, 45).

Cilt, tırnak ve mukoz membranlarda *Candida*'lar tarafından oluşturulmuş kronik ve/veya tekrarlayan enfeksiyonlar kronik mukokutanöz kandidoz olarak anılmaktadır. Bu kliniğe sahip hastaların ortak özelliği, *Candida*'lara karşı etkili hücre aracılı immün yanıt geliştirebilme yeteneklerindeki yetersizliktir (44). Hastaların çoğu süt çocuğu ya da çocukluk yaş grubundadır. T lenfosit fonksiyon bozukluğu yanında, B lenfosit, granülosit veya kompleman fonksiyon bozukluğu da görülebilir. Bazı örneklerde multipl endokrin anomaliler, tekrarlayan viral ve bakteriyel pulmoner veya sinüs enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (1).

Candida türleri cilt ve tırnakları tutan yüzeyel enfeksiyonlara neden olabilirler. Mikroorganizma sıcak ve nemli vücut bölgelerini tercih eder. HIV ile enfekte hastalarda yüzeyel *Candida* enfeksiyonları sıklıkla diğer yüzeyel mikozlarla birlikte görülmektedir. Süt çocuklarında görülen diaper döküntüsünün en sık nedenlerinden biri *Candida*'lardır. Diaper döküntüsünde lezyonlar gluteal, inguinal ve perineal alanlarda daha belirgindir.

2.2.2. Dissemine Kandidoz ve Kandidemi

Kandidemi, en az bir kan kültüründen *Candida* türlerinin izolasyonu olarak tanımlanmaktadır. Buna enfeksiyon ya da sepsis bulguları eşlik edebilir ya da

etmeyebilir. Akut dissemine kandidoz, hematojen olarak tek ya da multipl organa *Candida*'ların yayılmasıdır. Kronik dissemine kandidoz ise hematolojik malignensili hastalarda görülen ve hepatosplenik kandidoz olarak da bilinen yaygın bir enfeksiyon şekli olarak tanımlanmaktadır (46). Kandidemi, toplum kaynaklı bir enfeksiyon olarak sık görülmez, sıklıkla nozokomiyal bir komplikasyon olarak ortaya çıkar. Amerika'da tüm nozokomiyal kan akımı enfeksiyonlarının etkenleri arasında *Candida*'lar 4., yoğun bakım hastaları arasında ise 3. sırada yer almakta ve nötropenik hastalar arasında anlamlı oranda daha yüksek sıklıkla görülmektedirler. En sık izole edilen tür *C.albicans* olduğu halde, non-*albicans Candida* türlerinin sıklığında da artış bildirilmektedir. Ayrıca, en yüksek mortalite oranları da *Candida* nedenli kan akımı enfeksiyonlarında ve *Candida* türleri arasında da *C.krusei* nedenli kan akımı enfeksiyonlarında tespit edilmiştir (47).

Kandidemi gelişimi açısından risk taşıyan hasta grubu onkoloji ve transplant hastaları, yanık, cerrahi ve diyabet hastaları ile düşük doğum ağırlıklı yeni doğanlardır. Onkoloji hasta grubunda ise en yüksek risk akut lösemi hastalarında gözlenmiştir. Bu hastalarda santral venöz kateterler, parenteral beslenme, geniş spektrumlu antibakteriyel kullanımı, yoğun kemoterapi ve immünoşüpresif rejimler ilave risk faktörleridir (1, 46, 47).

Dissemine kandidozda en sık tutulan organlar böbrek, beyin, miyokard ve gözdür. Kandidemi ya da dissemine kandidozu düşündürecek spesifik semptom ya da bulgular yoktur. Şiddetli enfeksiyon bulguları bulunan hastalarda antibakteriyel tedaviye cevapsız ateş varlığı önemli bir kanıt olabilir. Tanı genellikle zordur, kan kültürü pozitiflik oranı yaklaşık %40 ve bulgular nonspesifik olduğundan antemortem tanı oranı düşüktür (1, 46).

2.2.3. Derin Yerleşimli *Candida* Enfeksiyonları

Derin yerleşimli *Candida* enfeksiyonları direkt inokülasyon ya da hematojen yayılma ile oluşabilirler. En sık alt üriner sistem enfeksiyonları görülür. Hastanede yatan ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan en sık izole edilen etkenler arasında yer almaktadır. *Candida* türleri alt üriner sistemde kolonize olabilir ve alt ya da üst üriner sistemde enfeksiyona neden olabilir. Semptomlar bakteriyel enfeksiyonlardakilerle aynıdır. Üriner kateter varlığı, diyabet, geniş spektrumlu

antibiyotiklerin ya da immünoşüpressif ajanların kullanımı en önemli risk faktörleridir.

Candida ile oluşan merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonu nadirdir, sıklıkla prematüre doğanlarda ve MSS cerrahisi geçirmiş hastalarda görülür. Genellikle dissemine kandidozun bir komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Diğer risk faktörleri lomber ponsiyon, ventrikülo-peritoneal şant ve nadiren bakteriyel menenjitin komplikasyonudur. En sık görülen şekli menenjittir, mikotik anevrizma ve beyin apseleri de görülebilir. Semptom ve bulgular, klasik menenjit tablosuna göre daha silik ve kronik seyreder, mortalitesi yüksektir (1, 48).

Diğer nadir bir tutulum *Candida* nedeni pnömonidir, iki şekilde görülür; enfekte sekresyonların aspirasyonu ile endobronşiyal yerleşim sonucu gelişen lokal veya diffüz bronkopnömoni ve hematogen kaynaklı, yaygın, ince nodüllü infiltratlarıdır. Diğer formları daha nadirdir. Fungal endokarditlerin en sık etkeni *Candida*'lardır, perikard, miyokard ve endokarda enfeksiyon oluşturabilirler. Kalp cerrahisi, protez kalp kapakları, santral venöz kateterler intravenöz ilaç kullanımı, bakteriyel endokardit ve kalp kapağı yapısal bozuklukları önemli risk faktörleri arasında sayılabilir (1).

Candida nedeni peritonit sıklıkla iki hasta grubunu etkilemektedir; kronik peritoneal diyaliz hastaları ile karaciğer ya da pankreas transplant hastaları ve pankreatit ya da gastrointestinal perforasyon nedeni cerrahi müdahale geçirmiş hastalardır. Peritoneal diyaliz hastalarındaki fungal peritonitlerin yaklaşık %75'inde etken *Candida*'lardır.

C.albicans endojen oftalmitlerin en sık nedenlerindedir. Ayrıca ekzojen oftalmit, keratit gibi enfeksiyonlara da neden olabilir. Genellikle sistemik bir hastalık varlığında (diyabet, immünoşüpresyon) ortaya çıkar. Kandidemi, cerrahi, lokal steroid ya da antibakteriyel ajan kullanımı, göz anomalileri ve intravenöz kateterler enfeksiyona zemin hazırlayan risk faktörleridir (49). Kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları oldukça nadir görülen enfeksiyonlardır ve genellikle kandideminin geç komplikasyonu olarak ortaya çıkarlar. Vertebra ve intervertebral diskler, el bileği, femur, proksimal humerus, skapula ve kaburgaların kostakondral birleşim yerlerini tutabilir. Tanı ve tedavi güçtür (1).

Hepatosplenik kandidoz (kronik dissemine kandidoz), akut lösemi tedavisi gören hastalarda ya da uzun süre nötropenik kalan kemik iliği transplant alıcılarında

görülen dissemine *Candida* enfeksiyonudur. Hastalarda çoklu karaciğer ve dalak apseleri mevcut olup morbidite ve mortalitesi yüksektir (50).

2.3. *Candida* Enfeksiyonlarının Tanısı

Candida enfeksiyonlarının tanısında ilk adım bu etkenden şüphelenmektir. Laboratuvar tanıda standart yaklaşım;

- Klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesi,
- Kan, vücut sıvıları, dokular ve diğer örneklerden kültür ile etkenin izolasyonu,
- Etkenin tür seviyesinde tanımlanması,
- Dokudaki *Candida* türü ile morfolojik benzerliğin kanıtlanmasına dayanmaktadır

2.3.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması

Candida enfeksiyonu şüphesi varlığında örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması esnasında özel işlemlere gerek yoktur. Örnekler alındıktan sonra en geç iki saat içinde laboratuvara ulaştırılmalı, sıvı örnekler mümkün olan en kısa sürede işleme alınmalı, doku ve sürüntü örneklerinin kurumasına izin verilmemelidir. Kısa sürede işleme alınamayacak steril örnekler 37 °C'de, normal flora ile kontamine olma olasılığı yüksek olan örnekler ise +4 °C'de saklanmalıdır (14, 51).

2.3.2. Mikroskopik İnceleme

Candida enfeksiyonlarının tanısında, ilk adım mikroskopik incelemedir ve örneklerin Gram, metilen mavisi veya kalkoflor beyazı ile boyanarak incelenmesinde tomurcuklanan maya hücreleri, hif ya da yalancı hiflerin görülmesi tanıda değerlidir. Cilt, tırnak gibi keratinize ya da epitelial doku örnekleri %10-30 KOH ile muamele edilerek incelenmelidir. Beyin omurilik sıvısı, idrar, bronkoalveoler lavaj gibi sıvı örneklerde maya hücreleri yoğun olmayacağından, santrifüj işleminden sonra Gram boyanarak incelenmesi ayrıca balgam örneklerinde müsini parçalamak amacı ile örneğin homojenize edilmesi duyarlılığı arttırmaktadır (2, 51).

2.3.3. Kültür

Etkenin izolasyonu için tüm örneklerin kültür incelemesi yapılmalıdır. Bu, gerektiğinde antifungal duyarlılık testlerinin yapılabilmesi ve epidemiyolojik

çalışmalar için önemlidir (13). Yüzeysel enfeksiyonların mikroskopik incelemesinde mikroorganizmanın görülmesinin ardından kültür pozitifliği tanıyı kesinleştirir (1). İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında da kültür önemli rol oynar. Pozitif bir kan kültürü sistemik bir enfeksiyonu ya da kontamine intravenöz girişimlere bağlı geçici bir kandidemiye yansıtabilir. Ancak solunum veya sindirim sisteminden elde edilen pozitif bir kültür kolonizasyon da olabileceğinden, balgam ya da gaita örneğinden izolasyon tek başına tanı için yeterli değildir. Bu nedenle steril bölge örnekleri (biyopsi ya da bronkoskopik örnekler) elde edilmeli ve sonuçlar klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir (2, 13, 51).

Candida'lar, genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanılan besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. SDA, içerdiği yüksek şeker konsantrasyonu nedeniyle, bakterilerin üremelerini baskıarken, *Candida*'lar ve diğer mantarların üremesini kolaylaştırmaktadır. Mantar enfeksiyonu açısından şüpheli örnekler SDA besiyerine inoküle edilerek oda ısısı (22-26 °C) ve 37 °C'de inkübe edilirler. Maya kolonileri 24-48 saatte belirgin hale gelir. Dissemine kandidoz ve kandidemi düşünüldüğünde mutlaka kan kültürü yapılmalıdır. Ancak bu durumda kan kültürü pozitifliği çok düşük olduğundan birkaç kez tekrarlanmalıdır. Pozitiflik oranını ve üreme hızını arttırmak için lizis santrifügasyon teknikleri ve sürekli monitorizasyon yapan otomatize sistemler geliştirilmiştir. İnvaziv fungal enfeksiyon tanısında klinik örneklerin mikroskopik incelenmesi ve kültürü hala altın standart yöntemler olmakla birlikte, bunların duyarlılık ve özgüllüğü genellikle yetersizdir ancak fungal yükün yükseldiği, enfeksiyonun ileri evrelerinde pozitifleşmektedirler (52).

2.3.4. Serolojik Yöntemler

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının erken tanısı, nonspesifik klinik semptom ve bulgular nedeniyle oldukça zordur. Ayrıca sıklıkla negatif sonuçlanan ya da geç pozitifleşen kan kültürü gibi geleneksel yöntemler hastalığın tanısında çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle *Candida* enfeksiyonlarının hızlı tanısına yönelik birkaç serolojik test geliştirilmiştir. Kültür dışı tanı testleri içinde en ilgi çeken konak yanıtını ölçen testlerdir. Çünkü uygulaması kolaydır ve örnek eldesi için invaziv işlemler gerekmez. Ancak bu yöntemler invaziv kandidozda nadiren kullanılırlar. Çünkü enfekte olmayan hastalarda kolonizasyona bağlı yanıtlar, immün düşkün hastalarda yetersiz antikor yanıtı gibi nedenlerle antikor tarama testlerinin

performansı kötüdür (53, 54). Ancak moleküler tekniklerle geliştirilen rekombinant antijenlerin bu sorunları çözebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (54).

Mannan, *Candida* hücre duvarında bulunan üç önemli polisakkarit bileşeninden (beta glukan, kitin, mannan) biridir, enfeksiyon sırasında dolaşıma geçer ve serolojik yanıtı oluşturan en önemli *Candida* antijenidir (55). Kanda mannan antijenlerini tespit etmek üzere iki ticari test geliştirilmiştir; Pastorex *Candida* latex aglutinasyon test (Bio-Rad) ve Platelia *Candida* antijen test (double-sandwich enzyme immunoassay) (Bio-Rad). Bu iki testin özgüllükleri benzer olmakla birlikte (%100 ve %98), ikincisi daha duyarlı bulunmuştur (%28 ve %40). Mannan antijeni kandan hızla uzaklaştırıldığı için, özellikle tek serum örneği ile testin duyarlılığı azalmaktadır (56). Bu nedenle testin duyarlılığını arttırmak için hastalardan sık kan örneği alınması gerekmektedir. Yüksek riskli hastalarda antikor testleri ile birlikte yapıldığında duyarlılık ve özgüllüğün tek başına yapıldığından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (57, 58). Ancak *Candida* mannan antijenin serumda yarı ömrünün kısa olması, enfeksiyon olmaksızın kolonizasyon durumlarında da pozitif reaksiyon vermesi ve enfeksiyonun ancak geç evrelerinde saptanabilmesi gibi dezavantajları nedeni ile testin yararı sınırlıdır. Antijen tespiti invaziv mikozlu hastaların tanısı ve takibinde önemli bir araç olmakla birlikte sonuçlar konak risk faktörleri, klinik semptom ve bulguları ve radyolojik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir.

1,3- β -D-glukanlar (BG) “at nalı yengeci” koagülasyon kaskadının faktör G’si (serin proteaz zimojen) ile reaksiyona giren bir fungal hücre duvarı bileşenidir ve bu reaksiyondan yola çıkılarak BG antijenemi testi geliştirilmiştir (59). BG panfungal (zigomiçetler ve kriptokok hariç) bir testtir ve türler arasında ayırım yapamamaktadır. Aspergillozis, fusariyozis, kandidoz ve trikosporoz gibi invaziv fungal enfeksiyonların tanısında kullanılabildiği ve enfeksiyonu klinik tanıdan ortalama 10 gün önce yüksek bir duyarlılık (%97) ve özgüllükle (%93) saptadığı bildirilmektedir (60). BG saptanmasında FDA tarafından onaylanmış, Avrupa ve Amerika’da kullanılmakta olan ticari bir test bulunmaktadır (Fungitell Assay). BG antijenemi testinde, özellikle gram pozitif bakterilere bağlı, yüksek yalancı pozitiflik, buna bağlı düşük özgüllük oranları bildirilmektedir (61). Bunun yanında, fungal kolonizasyonun BG konsantrasyonunu 20 pg/ml’den daha fazla arttırmadığı ve CAS

ya da itrakonazol ile antifungal profilaksinin test performansını etkilemediği gösterilmiştir (60, 62).

2.3.5. Fungal Metabolitlerin Saptanması

Enfekte konağın vücut sıvılarında bulunabilen mikrobiyal metabolitlerin saptanması enfeksiyon hastalıklarının tanısında bir başka yaklaşım olabilir. D-arabinitol (DA) *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis* tarafından kültürde büyük miktarlarda üretilirken, *C.glabrata*, *C.krusei*, *Cryptococcus neoformans*'da gösterilememiştir (63). DA ve L-arabinitol (LA) normal insan serumunda endojen olarak bulunmakla birlikte, serum DA konsantrasyonu ve DA/kreatin oranı ve idrar DA/LA oranı invaziv *Candida* enfeksiyonlarında, enfekte olmayan ya da kolonize bireylerdekinden daha yüksek bulunmuştur. Ancak bunu duyarlı bir şekilde saptayacak herhangi bir ticari sistem bulunmamaktadır (64).

2.3.6. Spesifik Nükleik Asitlerin Saptanması

Fungal enfeksiyonların artan sıklığı ve tanısındaki yetersizlik, dikkatleri invaziv fungal enfeksiyonların moleküler yöntemler kullanılarak hızlı ve etkili tanısına çevirmiştir. Panfungal ve fungus özgül PCR (Polymerase Chain Reaction) testleri invaziv fungal enfeksiyonların tanısında değerlendirilmiş ve ümit verici sonuçlar alınmış olmakla birlikte, henüz standardize edilememiştir ve ticari olarak geliştirilmiş bir moleküler tanı sistemi bulunmamaktadır (65, 66). DNA tespitine dayalı yöntemlerin rutin laboratuvara adaptasyonu öncesinde fungal DNA eldesi için en uygun ekstraksiyon yöntemi, uygun DNA hedefi ve uygun moleküler yöntem belirlenmiş olmalıdır.

Fungal DNA elde edilmesinde altı farklı yöntemin değerlendirildiği bir çalışmada *C.albicans* için hücre duvarının enzimatik lizisi, *A.fumigatus* için ise mekanik ajitasyon en iyi sonucu vermiş ve tüm mantar türleri için uygun tek bir ekstraksiyon yöntemi bulunmadığı sonucuna varılmıştır (67). Son zamanlara Whatman FTA mikrokart teknolojisi ile fungal kültürlerden (hem küf hem de maya) DNA ekstraksiyonunun daha etkili, daha pratik ve daha kısa sürede yapılabildiği bildirilmekle birlikte, klinik örneklerden fungal DNA elde edilmesinde kullanıldığına dair bir çalışmaya ulaşamamıştır (68).

Hedef olarak genellikle DNA tercih edilir, çünkü RNA ile karşılaştırıldığında nispeten daha stabildir ve ekstraksiyonu daha kolaydır. Son yıllarda ribozomal DNA gen bölgesi (18S geni, 5.8S geni, 28S geni ve internal transcribed spacer 1 ve 2 bölgeleri) ümit veren bir hedef olarak görülmektedir (69). Fungal enfeksiyonların taranmasında tüm fungal türler arasında büyük oranda korunmuş sekanslar kullanılabilirken, değişken sekanslar tür tanımlaması için önerilmektedir. İnvaziv kandidoz tanısında iki antijen saptama yöntemi ile moleküler yöntemler karşılaştırıldığında, özgüllükler her üç test için de oldukça yüksek ($\geq 97\%$) olduğu halde, *Candida* PCR her iki antijen testinden daha duyarlı (95%) bulunmuştur (70).

Genellikle yüksek performans bildiren yayınlara rağmen, invaziv fungal enfeksiyonların tanısında moleküler yöntemler klinik kullanıma girememiştir. Ayrıca bu enfeksiyonların erken tanısında kültür yöntemleri üzerine tatmin edici bir üstünlüğü de gözlenmemiştir. Moleküler tanı yöntemleri kolonize ve enfekte bireyleri ayıramadığı gibi, yanlış pozitif sonuçlar invaziv kandidoz için 31% ve invaziv aspergilloz için $8-38\%$ olarak bildirilmektedir (63).

Mantar enfeksiyonlarının moleküler tanısındaki kısıtlamaların yanında, klinik mantar izolatlarının tanımlanmasına yönelik, DNA dizi analizine dayalı birkaç ticari sistem bulunmaktadır; MicroSEQ D2 LSU rDNA Fungal Identification Kit (Applied Biosystem), LCD-Array Kit Fungi 2.1 (Chipron), Myco/Seq (Carpegen).

2.4. *Candida* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Özellikle dissemine *Candida* enfeksiyonlarının tedavisi güçtür. Çünkü bu enfeksiyonlarda tedavi alternatifleri sınırlıdır ve mevcut antifungallerin birçoğu önemli yan etkilere sahiptir. Antifungal ilaçların hedefi genellikle fungal hücre membran sterolu ya da hücre duvarıdır. Şimdilerde klinik kullanımda olan sistemik etkili antifungal ilaçlar 3 ana grupta yer almaktadır; polyenler, azoller ve ekinokandinler (71).

2.4.1. Polyenler

Bu grupta amfoterisin B (AMB) ve nistatin yer almaktadır. AMB ve lipit formülasyonları sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nistatin ise topikal bir antifungaldir ve sistemik kullanım için geliştirilmiş bir lipit formülasyonu araştırma aşamasında kalmıştır (72).

AMB hidrofilik bir polihidroksil zinciri ve lipofilik bir polyen hidrokarbon zincirine sahip amfoterik bir bileşiktir. Suda iyi çözünmez. Ticari olarak bulunan parenteral formülasyonu AMB deoksikolattır (73). Şiddetli sistemik enfeksiyonlarda en etkili antifungal ilaç olmasına rağmen terapötik aralığının dar olması klinik kullanımını sınırlamaktadır (13, 71, 73). Bu nedenle AMB lipit kompleks, AMB koloidal dispersiyon ve lipozomal AMB gibi lipit formülasyonları geliştirilmiştir ve bunların böbrekteki konsantrasyonları nefrotoksik AMB deoksikolattan daha düşüktür (13, 73, 74).

AMB ve diğer polyenler fungusidal etkilidir ve primer olarak fungal hücre membranının esas sterolu olan ergosterole bağlanarak etki gösterirler (13, 71-73). Memeli hücreindeki temel sterol olan kolesterole düşük afinitesi, ilacın seçici toksik etkisini belirlemektedir (75). Bu bağlanma sonucunda mantar hücresinin membran geçirgenliği artar ve bunu hücre içi potasyum, magnezyum, şekerler ve metabolitlerin kaybı takip eder. Sonuçta hücre canlılığını kaybeder. AMB'nin ilave bir etki mekanizması da oksidatif mekanizmalarla direkt membran harabiyetine neden olmasıdır (72).

AMB geniş bir etki spektrumuna sahiptir; *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., zigomiçetesler ve endemik dimorfik patojenlere (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve *Penicillium marneffeii*) etkilidir. Bununla birlikte, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp., *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans*, *Trichosporon* spp. ve bazı dematiyesöz (esmer) mantarların AMB'ye dirençli olduğu bildirilmektedir (72, 76). Ayrıca *C.guilliermondii*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.lusitaniae* ve *C.rugosa*'nın bazı izolatları arasında AMB'ye azalmış duyarlılık bildirilmiştir (72).

AMB, çeşitli organlara geniş olarak yayılır ve en yüksek konsantrasyona karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerlerde ulaşır (72-74). Beyin omurilik sıvısına geçişi az olmakla birlikte, MSS fungal enfeksiyonlarında etkili bulunmuştur (72).

Lipit AMB formülasyonları kolay tolere edilebilirlikleri ve enfeksiyon alanına daha fazla yayılmaları nedeniyle in vivo yüksek etkinliğe sahiptirler. Bunlar esas olarak renal fonksiyonu bozuk ya da AMB deoksikolatu tolere edemeyen hastalarda endikedir. En önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Lipit formülasyonların, başta nefrotoksisite olmak üzere yan etkileri önemli oranda azalmıştır (72, 73).

AMB infüzyon sırasında ya da sonrasında ortaya çıkabilen ciddi yan etkilere sahiptir. İnfüzyon sırasında ortaya çıkan akut reaksiyonlar interlökin ve prostaglandinlerin salınmasına bağlı ateş, titreme, miyalji, hipo/hipertansiyon, taşikardi ve bronkospazmdir. Daha geç ortaya çıkan reaksiyonlar hastanın duyarlılığı ve altta yatan hastalığı ile ilgili olarak, sıklıkla nefrotoksisite ve anemidir. Lipit formülasyonların avantajı bu nefrotoksik yan etkiyi anlamlı oranda azaltmasıdır (72).

2.4.2. Azoller

Azol grubu antifungaller kimyasal yapılarına göre iki gruba ayrılırlar; imidazoller (azol halkasında iki nitrojen bulunur; ketokonazol, mikonazol, klotrimazol ve ekonazol) ve triazoller (azol halkasında üç nitrojen bulunur). İmidazoller içinde sadece ketokonazol sistemik etkiye sahiptir. FLU, itrakonazol, vorikonazol (VOR) ve posakonazolü içeren triazollerin hepsi sistemik etkiye sahiptir, ayrıca bu grupta yer alan ravukonazol, isavukonazol ve albakonazol henüz araştırma aşamasındadır (71, 72, 74).

Azol grubu, en yaygın kullanılan antifungal ajanlardır ve fungal sitokrom P-450 bağımlı enzim 14- α -demetilazı inhibe ederek etki gösterirler. Bu enzim lanosterolün ergosterole dönüşümünü sağladığından, inhibisyonuyla fungal hücre membranı sentezi bozulur. Böylece fungal üreme engellenir (fungustatik) ya da fungal hücre ölümü (fungusidal) gerçekleşir. Genellikle azoller, *Candida* spp. ve *Cryptococcus neoformans* gibi mayalara fungustatik etki göstermekteyken, itrakonazol, VOR, posakonazol ve ravukonazolün *Aspergillus* türlerine karşı fungusidal etkili olduğu bildirilmektedir (72).

VOR yeni bir triazol antifungaldır ve oldukça geniş bir etki spektrumuna sahiptir; *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp. gibi maya mantarlarına; *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ve dematiyesöz etkenler gibi filamantöz mantarlara; ve endemik dimorfik patojenlere etkili olduğu bildirilmektedir (72, 76). Ayrıca doğal FLU direncine sahip olduğu bilinen *C.krusei* ve FLU'e azalmış duyarlılığından söz edilen *C.glabrata*'ya karşı da etkilidir. VOR *Zygomycetes*'e etkisiz, bunun yanında *Aspergillus terreus* ve *Pseudallescheria boydii* gibi AMB'ye dirençli mantarlara karşı etkilidir (72).

VOR'ün hem oral hem de parenteral formları mevcuttur ve oral biyoyararlanımı oldukça yüksektir (>%90) (72, 76). MSS ve diğer tüm dokulara

penetrasyonu iyidir. Maya mantarlarına fungustatik, *Aspergillus* türlerine fungusidal etkilidir. VOR tedavisi için primer endikasyon invaziv aspergillozdur ve invaziv aspergilloz tedavisinde AMB'den daha etkili bulunmuştur (77).

VOR genellikle iyi tolere edilir, en sık yan etkisi geçici görme bozukluğudur ve hastaların yaklaşık %30'unda görülür (78). Nadiren tedavinin kesilmesini gerektirir. Bunun dışında cilt reaksiyonları, anormal karaciğer fonksiyon testleri, halüsinasyonlar ya da konfüzyon gibi yan etkiler de gözlenebilir (72, 76). Hepatik P-450 sistemi ile metabolize olan diğer ilaçlarla etkileşimi sıktır (72).

2.4.3. Ekinokandinler

Ekinokandinler farklı bir yoldan etki gösteren yeni bir antifungal grubudur. Bilinen diğer antifungallardan farklı bir mekanizmayla, fungal hücre duvarının önemli bir yapı taşı olan 1,3- β -glukan sentezini inhibe ederek etki gösteren yarı-sentetik lipopeptidlerdir (79, 80). BG sentezinin inhibisyonu hem fungustatik hem de fungusidal etkiyi ortaya çıkarabilir; hücre duvar sentezinin engellenmesi fungal üremeyi azaltarak fungustatik etki gösterirken, duvar bütünlüğünde ortaya çıkan değişiklikler hücre içi osmotik basınca mekanik direncin yetersizliğine neden olarak fungal hücre ölümüne yol açmaktadır (79). *Candida* türlerine karşı fungusidal, *Aspergillus* türlerine karşı ise fungustatik etki sergilemektedirler. Memeli hücrelerinde BG bulunmadığından, mantarlar için oldukça seçici bir toksik etkiye sahiptir (80). Çeşitli mantar enfeksiyonlarının önlenmesi veya tedavisi için kabul görmüş olan üç ekinokandin, anidulafungin, kaspofungin (CAS) ve mikafungindir (71-73, 80).

Ekinokandinler glukan sentezi üzerinden etki gösterdikleri için, etki spektrumları duvar yapısında BG bulunan mantarlarla sınırlıdır. Bu nedenle *Candida* ve *Aspergillus* türlerine etkili, dematiyesöz ve endemik dimorfik mantarlara değişken aktiviteye sahiptirler. *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp. ve diğer hiyalen küfler ile *Zygomycetes* sınıfı mantarlara etkisizdirler (71-73).

CAS mukozal ve sistemik kandidoz tedavisinde geleneksel AMB kadar etkilidir (71). Oral biyoyararlanımı kötüdür, bu nedenle parenteral formları mevcuttur (73, 76). Bütün büyük organlara yayılır, doku penetrasyonu oldukça iyi olduğu halde beyin omurilik sıvısına geçişi düşüktür (71, 72). CAS uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğundan günde tek doz kullanımı önerilmektedir (71).

Ekinokandinler, fungal hücre duvarına özgül bir etkiye sahip olduklarından toksik etkileri nadirdir ve iyi tolere edilirler. Şimdiye kadar ciddi bir yan etki bildirilmemiştir. Tedavi sırasında ateş, bulantı, kusma, döküntü ve infüzyona bağlı yan etkiler görülebilmektedir.

2.4.4. Antifungal Kombinasyonlar

Mortalitesi yüksek fırsatçı fungal enfeksiyonların sıklığındaki artış, tedavide farklı hedeflere etkili yeni antifungallerin geliştirilmesine ve bunların kombinasyonlarının araştırılmasına yönelik çalışmaları teşvik etmiştir. Özellikle tedavisi daha güç olan küf enfeksiyonlarında antifungal ajanların tek başlarına agresif kullanımlarının yanı sıra, bunların kombine kullanımları da yoğun ilgi odağı haline gelmiştir. Kombinasyon tedavisindeki gerçek amaç, monoterapi ile elde edilenden daha iyi bir klinik sonuç sağlayabilmektir (72). Özetle, daha etkili ve geniş bir spektrum sağlamak, tek ilaç tedavisi ile sağlanandan daha güçlü bir etki oluşturmak, güvenilirliği arttırmak, ilacın tolere edilmesini kolaylaştırmak ve dirençli mikroorganizmaların sayısını azaltmaktır (5, 81). Bununla birlikte, antifungal kombinasyon tedavisi ile fungal öldürme ve klinik etkinliğin azalabileceği, ilaç etkileşimleri ve toksisite potansiyelinin artabileceği ve ilaç maliyetlerinin ciddi boyutlara ulaşabileceği de unutulmamalıdır. Bu nedenle, kombine antifungal tedavi hakkındaki veriler dikkatle değerlendirilmeli, günümüz koşullarında standart bir yaklaşım olarak görülmemelidir (82).

Kombinasyonda, ilaçlar tek başına kullanıldığında elde edilenden belirgin oranda daha iyi sonuçlar alındığında sinerjik etkileşimden, aksine tek başına kullanıldıklarında elde edilene göre daha düşük aktivite saptandığında antagonizmadan söz edilebilir. Etkili bir kombinasyon tedavisi oluşumunda birkaç mekanizma düşünülmektedir. i) Aynı biyokimyasal yolun farklı evrelerinin inhibisyonu. Bir azol ile terbinafinin kombinasyonu buna örnek gösterilebilir. Her iki ajan da sterol sentezinde farklı noktalara etki göstermektedir. ii) Kombinasyondaki iki ajandan biri hücre duvarı ya da membranının geçirgenliğini arttırarak, diğerinin hücre içine girişini kolaylaştırabilir. Bu etkiye klasik bir örnek AMB ve flusitozindir, AMB hücre membran harabiyeti yaparak hücre içinde etki gösteren flusitozinin girişini kolaylaştırmaktadır. iii) Bir ajanın hücre dışına transportunun diğeri tarafından engellenmesi. Birçok mantarda bulunan eflux (geri atım) pompası,

antifungalın toksik etkisinden korunmak için, etkili bir şekilde antifungal hücre dışına pompalamaktadır. Reserpin gibi ajanlarla bu pompaların inhibisyonunun azol antifungallerin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. iv) Farklı hedeflerin eş zamanlı inhibisyonu. CAS gibi bir ajanla hücre duvarı sentezinin inhibisyonunun, AMB ya da azoller ile hücre membran harabiyeti ile birleştirilmesi bu tip kombinasyon için örnek gösterilebilir (72, 82, 83).

Benzer şekilde antifungal antagonizma için de farklı mekanizmalar söz konusudur: i) Aynı hedefe etkili iki ilacın yarışmalı olarak birbirinin etkisini azaltması (azoller ve AMB). ii) ilaçlardan birinin diğerinin hedef bölgesinde değişikliğe neden olması. Azol antifungaller ergosterol sentezini inhibe ederek AMB'nin daha az bağlanabildiği metil sterol birikimine neden olabilirler. iii) bir ajanın diğerinin hedef bölgesini bloke etmesi. İtrakonazol gibi lipofilik ajanlar fungal hücre yüzeyine tutunabilir ve AMB'nin membran sterollerine bağlanmasını engelleyebilir (83).

Antimikrobiyal kombinasyonlar sıklıkla septisemik ya da ciddi hastalığı bulunan hastalarda ampirik olarak geniş spektrumlu etkiyi sağlamak için tercih edilirler. Daha az sıklıkla da, antimikrobiallerin önerilen dozlarına dirençli bir patojen saptandığında ve tek ilaçla tedaviye cevap alınmadığında gündeme gelmektedir. İlaçların kombine edilerek tedavide kullanılması tedavi süresini kısaltabilir ve direnç gelişimini önleyebilir (5).

Klinik olarak antifungal kombinasyon tedavisinin yararı kanıtlanmış tek fungal enfeksiyon kriptokok menenjitidir; AMB'ye flusitozinin eklenmesi ile daha yüksek iyileşme oranları ve daha hızlı beyin omurilik sıvısı sterilizasyonu sağlanmaktadır. Ayrıca diğer bazı fungal enfeksiyonlarda da antifungal kombinasyonlar ile başarılı sonuçlar alındığına dair yayınlar bulunmaktadır (84, 85, 86). İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında genellikle tek bir antifungal ajanla yeterli sonuç alınabilmektedir. Ancak menenjit, endokardit, hepatosplenik enfeksiyon, tekrarlayıcı ya da dirençli *Candida* enfeksiyonları gibi bazı özel durumlarda kombinasyon tedavileri gerekli olabilir.

C.krusei doğal FLU direnci nedeniyle çoklu ilaç direnci bilinen bir fungal patojendir ve hem flusitozin hem de AMB duyarlılığının azaldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır. FLU ya da AMB almakta olan hastalar arasında *C.krusei* nedenli salgınlar bildirilmiş ve yüksek doz AMB ile daha iyi klinik yanıt sağlandığı

gösterilmiştir (87). Bu durumda *C.krusei* izolatlarının hem AMB'ye hem de CAS ve VOR gibi daha yeni antifungallere ve antifungal kombinasyonlara yanıtının değerlendirilmesi önem kazanmaktadır.

Şimdilerde antifungal kombinasyon tedavileri oldukça ilgi çekici bir konudur, ancak onların yararlı olduğunu gösteren veriler sınırlıdır. Bu nedenle antifungal kombinasyonların yararını değerlendiren klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.4.5. Farmakodinamik Özellikler

Antifungal farmakokinetik-farmakodinamik özellikler invaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde ilaç seçiminde önemli rol oynamaktadır (88). Farmakokinetik çalışmalar emilim, dağılım, metabolizma ve atılma gibi ilaç ile konak arasındaki ilişkileri kapsamaktadır. Antimikrobiyal farmakodinamik çalışmaları ise ilaç farmakokinetikleri, in vitro duyarlılık ve tedavi etkinliği arasındaki bağlantıyı anlamayı sağlamaktadır. Farmakokinetik-farmakodinamik araştırmaları en uygun antifungal doz rejimlerinin saptanmasında ve in vitro duyarlılık sınır değerlerin belirlenmesinde değerlidir (89). Antifungal farmakodinamik özellikler klinisyenin en etkili ilacı seçebilmesine imkan sağlar, özel bir patojen ve enfeksiyon bölgesi için tedavide en etkili ve güvenli doz ve intervalin belirlenmesinde rehber oluşturur. İlaç endüstrisi için farmakokinetik-farmakodinamik çalışmalar, geliştirilen bileşiğin muhtemel başarısı için bir öngörü sağlar ve klinik çalışmalarda doz rejimlerinin tasarlanmasında rehberlik edebilir (89).

Antifungallerin farmakodinamik ilişkileri *time-kill* (zamana bağlı öldürme = ölüm zamanı), kolorimetrik hücre canlılık testleri gibi in vitro testlerden elde edilmekte ve farmakokinetik ölçümleri de içeren hayvan enfeksiyon modelleri ve insan enfeksiyonlarından saptanmaktadır. İlk adımda, antifungallerin klinik izolatlarla karşı konsantrasyon-etki özelliklerinin belirlenmesi için in vitro çalışmalar yapılmaktadır. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ya da MİK'in biraz üzerindeki konsantrasyon seviyelerinde en büyük etkiyi sergileyen dik bir konsantrasyon-yanıt eğrisine sahip ilaçlar için genellikle konsantrasyondan bağımsız (concentration-independent) aktiviteden söz edilmektedir. Tersine, MİK üzerindeki konsantrasyonlarda antifungal aktivitede artış gösteren, nispeten daha geniş bir

konsantrasyon-yanıt eğrisine sahip antifungaller için genel olarak konsantrasyon ilişkili (concentration-dependent) farmakodinamik aktiviteden söz edilmektedir (88).

Bazı ilaçlar için, başlangıçtaki bir ilaç maruziyetinin ardından uzamış bir üreme inhibisyon periyodu bulunmaktadır, bu periyod “postantifungal etki (PAFE)” olarak isimlendirilir (89). PAFE klinik olarak antifungal ajanların doz rejimlerinin düzenlenmesi ile ilişkilidir. Uzun bir PAFE’ye sahip olan ilaçlar daha az sıklıkla verilebilmekteyken, PAFE’si kısa antifungallerin daha sık aralıklarla verilmesi gerekebilmektedir (90).

Triazoller, polyenler, flusitozin ve ekinokandinlerin *Candida* türlerine karşı farmakodinamik aktivitelerini belirlemede birçok in vitro, hayvan ve klinik çalışmaların yardımı olmuştur. Tek bir antifungalın farmakodinamik özelliklerini belirlemek için kullanılmış olan ilkeler, kombinasyon tedavileri ile ilgili daha karmaşık ilişkileri değerlendirmek için de kullanılmaya başlanmıştır (89).

Mevcut triazol antifungallerin tümü ile *Candida* spp. için in vivo ve in vitro farmakodinamik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, triazollerin 1-2x MİK konsantrasyonlarında *Candida* üremesini en fazla inhibe ettiğini ve ilacın uzaklaştırılmasından hemen sonra tekrar üreyebildiğini göstermiştir. Ancak in vivo konsantrasyon ilişkili uzamış PAFE gözlenmiştir (88, 89). Yakın zamanda geliştirilmiş bir triazol olan VOR ile ilgili farmakodinamik veriler sınırlıdır (91).

Çeşitli maya ve küf mantarları ile yapılan *time-kill* çalışmalarında, AMB’nin 2-10 kat MİK seviyelerinde konsantrasyon ilişkili fungusidal etki gösterdiği ve ilacın uzaklaştırılmasına rağmen kalıcı ve uzamış PAFE sergilediği gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda da birkaç *Candida* türüne karşı AMB ve lipit preparatlarının konsantrasyon artışı ile fungusidal etki hızı ve genişliğinin arttığı ve maksimum etkinin 4-10x MİK konsantrasyonlarında gözlemlendiği bildirilmiştir (88, 89, 91). Benzer şekilde ekinokandinler de doz ilişkili fungusidal etki ve uzamış PAFE göstermektedir ve in vivo çalışmalarla bu veriler doğrulanmıştır (89).

2.4.6. Antifungal İlaçlara Direnç

Son yıllarda yaygın antifungal ilaç kullanımı ile birlikte antifungal direnç sorunu da gündeme gelmeye başlamıştır. AMB direncinin genellikle membran sterollerindeki değişikliklerle ve sıklıkla da ergosterolde azalmayla ilişkili olduğu; sonuçta AMB’nin membrana bağlanmasında azalma meydana geldiği

bildirilmektedir (33). Azol direncinde ise birçok mekanizmadan bahsedilmektedir; i) azollerin hücre içine alınmasının azalması ya da ilaç pompa sistemleri ile dışarı atılmasında artma sonucu hücre içi ilaç konsantrasyonunun azalması, ii) 14- α -demetilaz enzim sentezinin artması sonucu ilacın yetersiz kalması ya da bu enzimde yapısal değişiklik sonucu ilaç bağlanmasının bozulması, iii) ergosterol sentez basamaklarında meydana gelen değişikliklerle, 14- α -demetilaz öncesinde biyosentez yolunun değiştirilmesi sayılabilir. Ekinokandinler klinik kullanıma yeni girdiklerinden direnç durumları ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamakla birlikte, glukon sentetaz enzimine azalmış aktiviteden söz edilmektedir (33, 78, 79).

2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son 20 yıl içinde konak faktörlerinde, enfeksiyon nedeni olan mantar spektrumunda ve kullanılan antifungallerde dikkat çekici değişiklikler meydana gelmiştir; i) belirgin immünsüpresyonu olan hasta sayısındaki artış ile birlikte bu hastaları etkileyen invaziv fungal enfeksiyonların sıklığı ve mortalitesinde artış, ii) yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi, iii) antifungal direncin ortaya çıkması. Bu nedenle iyi bir klinik sonuç elde etmek için standart in vitro antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır (92).

Şu anda mevcut olan referans yöntemler, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; eskiden NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards) tarafından maya (CLSI M27-A2) (93) ve küfler (CLSI M38-A) (94) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, mayalar için geliştirilen disk difüzyon yöntemi (CLSI M44-A) (95) ile European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir (EUCAST E.Dis 7.1) (96). Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin uygulaması oldukça zahmetlidir ve sonuçlar uzun sürede (genellikle 48 saat) alınabilir. Ayrıca bazı *Candida* türleri ve azoller için MİK sonuçlarının okunması sıkıntılıdır. Bu nedenle antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar daha hızlı ve/veya pratik yöntem arayışlarına ve bu alandaki çalışmalara odaklanmıştır. Ticari olarak geliştirilen epsilometer test (Etest) (AB BioDisk) ve Sensititre Yeast One (TREK Diagnostic Systems) gibi sistemler ile genelde iyi düzeyde uyum oranları elde edildiği bildirilmektedir (97). Tetrazolyum tuzunun (XTT) indirgenmesi esasına dayanan ve bir kolorimetrik metabolik test olan XTT

testi ise henüz araştırma aşamasındadır. Flow sitometre ve ergosterol miktarının tayini, antifungal ilaçlara duyarlılığın belirlenmesi için araştırılan diğer yöntemlerdir, saatler içerisinde ve referans yöntemler ile genellikle iyi düzeyde korelasyon gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, özel donanım gerektirmesi nedeniyle, yaygın kullanımı olası gözükmemektedir (92).

2.5.1. Buyyon Dilüsyon Testleri

Mayalar için uygun şekilde tasarlanmış ve standardize edilmiş ilk antifungal duyarlılık yöntemi CLSI tarafından geliştirilen bir buyyon makrodilüsyon (sıvı makrodilüsyon) testidir. Ancak çok sayıda izolatın test edilmesi için pratik olmadığından, sonradan geliştirilen mikrodilüsyon formatı daha çok kabul görmüştür. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin EUCAST tarafından, sonuçların mikropalak okuyucu ile 24 saat sonra değerlendirilmesine dayalı bir modifikasyonu geliştirilmiştir (98).

CLSI bu yöntemlerde, besiyeri olarak MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] ile tamponlanmış RPMI 1640 buyyon, spektrofotometrik olarak hazırlanmış $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/ml son konsantrasyonunda maya süspansiyonu ve 35 °C'de 48 saatlik inkübasyon süresi önermektedir (93). Sonuçlar görsel olarak değerlendirilir; 48 saatte AMB için üremenin tamamen inhibe edildiği ilk kuyucuk, azol antifungaller için ise üremede %80'lik (makrodilüsyon) ya da en azından %50'lik (mikrodilüsyon) azalmanın gözlemlendiği ilk kuyucuk, ekinokandinler için de 24 saatte en azından %50'lik azalmanın gözlemlendiği ilk kuyucuk MİK değeri olarak tanımlanmaktadır (99).

2.5.2. Epsilometer Test (Etest)

Azalan dilüsyonlarda antifungal ajanın emdirildiği plastik bir şeritin, test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı agar plağı yüzeyine yerleştirilmesi ve antifungalın besiyerine diffüze olmasına dayalı bir testtir. Agar yüzeyinde üreme inhibisyon zonu ile antifungal şeritin kesiştiği noktada MİK saptanabilir. Hem küf hem de mayalar için kullanışlı bir yöntemdir. Güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek ve referans mikrodilüsyon testleri ile uyumlu bulunmuştur (92, 98). AMB, FLU, itrakonazol, flusitozin, VOR, posakonazol ve CAS için Etest şeritleri ticari olarak bulunmaktadır. En önemli avantajı uygulama kolaylığı ve Etest için kullanılan

besiyerinden etkilenmemesidir. Sıklıkla kullanılan besiyeri %2 glukoz içeren RPMI 1640 agardır (92).

2.5.3. Disk Difüzyon Testi

FLU ve VOR gibi antifungal ajanlar için oldukça kullanışlı ve basit bir yöntemdir ve CLSI tarafından *Candida* türlerinin bazı antifungallere duyarlılığını değerlendirmek için standardize edilmiştir (95). FLU, VOR ve CAS için duyarlılık sınır değerleri de belirlenmiştir (99). Yöntem bakteriler için yaygın olarak kullanılan Kirby-Bauer disk difüzyon testine benzer ve test besiyeri olarak glukoz ve metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar (GM-MHA) önerilmektedir (92, 99, 100). Test için, 0.5 McFarland bulanıklıkta maya süspansiyonu ve 35 °C’de 24 saatlik bir inkübasyon süresi önerilmektedir. Sonuçlar görsel olarak, üremede %80’lik inhibisyonun olduğu noktada değerlendirilir (99). Testin üstünlüğü, kolay yapılması, ucuz olması ve nispeten daha kısa sürede sonuç alınabilmesidir.

2.5.4. Time-kill Testi

Time-kill testleri fungusidal aktivitenin hızı ve genişliği, farmakodinamik özellikleri (konsantrasyon ve etki arasındaki ilişki, PAFE), kombinasyon çalışmalarında ilaçlar arasındaki sinerji ve antagonizma hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (101). Bu yöntemde standart maya süspansiyonu antifungalın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır ve belirli zaman aralıklarında besiyerine pasaj yapılır. Her zaman aralığı için canlı kalan hücreler sayılabilir ve test edilen her ilaç konsantrasyonu için, ilacın zaman içinde izolat üzerine etkisini gösteren öldürme-zaman eğrisi ve PAFE eğrisi elde edilebilir.

Bu yöntemde $1-5 \times 10^5$ CFU/ml yoğunlukta maya süspansiyonu, test besiyeri olarak RPMI 1640 medium, çalkalamalı inkübatör ve başlangıç inokülümüne göre $\geq 99.9\%$ ya da 3- \log_{10} ’luk bir azalma kriteri test parametreleri olarak kullanılmaktadır (92). Çeşitli antifungal ajanlarla mayalara karşı çalışılmıştır ve *Candida* spp. için standardizasyonun mümkün olduğu düşünülmektedir. Ancak *Aspergillus* spp. gibi filamantöz mantarlar için homojen olmayan bir üreme özelliği gösterdikleri ve koloni değerlendirmesi zor olduğu için sınırlı sayıda çalışma mevcuttur ve daha fazla çalışmaya gereksinim vardır (92).

2.6. İn vitro Antimikrobiyal İlişkilerin Saptanması

İnvaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde antifungal kombinasyonların kullanımına yönelik in vivo ve in vitro çalışmalara yoğun ilgiye rağmen, antifungal ilaç ilişkilerini değerlendirmek için standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan *checkerboard* (dama tahtası) yöntemidir ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksin (FİKİ) değerlendirilmesine dayanır (92, 100). FİKİ, ilacın kombinasyondaki MİK değerinin tek başına test edildiğinde saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilen her bir ilacın FİK'lerinin toplamıdır ($FİKİ = FİK A + FİK B$). Ancak bu yöntemde kombinasyonların farmakodinamik özellikleri hakkında bilgi edinilemez. Test besiyeri, inokülüm ve inkübasyon süresi gibi özellikler standart mikrodilüsyon testi ile aynıdır. Mikroplakta X eksenini boyunca A ilacının iki katlık konsantrasyonlarından her biri ve Y eksenini boyunca da B ilacının iki katlık konsantrasyonlarından her biri olacak şekilde düzenlenir. Dolayısıyla, *checkerboard* içinde her bir ilacın bütün konsantrasyonları kombine edilmiş olacaktır. FİKİ 0.6'dan daha düşükse sinerji, 1'den daha büyükse antagonizma ve 0.6-0.9 arasındaki değerler etkisiz (*indifferent*) olarak değerlendirilmektedir (100). Sinerji pozitif bir ilişkidir ve ilaçlar ayrı ayrı test edildiklerinde elde edilen etkilerinin toplamından daha fazla bir etkinlik oluştururlar. Antagonizma negatif bir ilişkidir ve ilaçlar ayrı ayrı test edildiklerinde elde edilen etkilerinin toplamından belirgin şekilde daha düşük etkinlik elde edilmektedir. Etkisizlik ise, iki ilacın kombinasyonunda oluşturdukları etkinin ayrı ayrı etkileri toplamından farksız olduğu durumdur.

Time-kill testi zor ve zahmetli bir yöntem olduğundan bu amaç için daha az sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak fungal öldürmenin hızı ve derecesi üzerine kombinasyonun etkisini ölçme avantajına sahiptir ve antimikrobiyal etkileşimin zaman içindeki dinamik davranışını ortaya koyarak kombinasyonla ilgili farmakodinamik veriler sağlar (92). Etest yöntemi de birkaç çalışmada ilaç etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla kullanılmış ve genellikle pratik ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olarak bildirilmiştir (99, 102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 İzolatlar

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji laboratuvarında, klinik örneklerden izole edilmiş 30 *Candida krusei* izolatu çalışmaya alındı. İzolatların servislere dağılımı şöyledi; Hematoloji ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi 9, Yoğun Bakım 7, diğeri dahili bölümlerden 9 ve pediatrik hastalardan 5 izolat. Bu izolatların 14'ü idrar, 10'u balgam, 2'si kan, 2'si yumuşak doku, 1'i plevral sıvı ve 1'i gaita örneğinden izole edilmişti.

Çalışmada kalite kontrol izolatu olarak *Candida parapsilosis* American Type Culture Collection (ATCC) 22019 referans suşu kullanıldı.

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 31 Temmuz 2009 tarih ve 346 sayılı onayı ile yürütülmüştür.

3.1.1. İzolatların Tanımlanması

Klinik örneklerde üreyen maya şüpheli koloniler Gram boyama ile doğrulandıktan sonra SDA besiyerine tek koloni pasajı yapıldı. 37 °C'de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen saf izolatlara sıra ile aşağıdaki tanımlama aşamaları uygulandı.

Germ tüp testi için deney tüplerine 0,5 ml insan serumu dağıtıldı ve 1-5 maya kolonisi bu tüplerde süspanse edildi. 37 °C'de 2 saatlik inkübasyonun ardından bu süspansiyondan bir damla alınarak lam-lamel arasında, ışık mikroskopunun 100X ve 400X büyütmelerinde incelendi. Maya hücrelerinde, başlangıcında daralma olmaksızın ana hücrenin 3-4 katı uzunluğundaki hif benzeri uzantıların varlığı germ tüp olarak değerlendirildi ve bu izolatlar *C.albicans* olarak tanımlandı (3).

Mayaların morfolojik özelliklerinin değerlendirilebilmesi için %1 Tween 80 içeren mısır unlu agar hazırlandı. Bu amaçla taze, saf maya kültürlerinden mısır unlu Tween 80 agar yüzeyine iğne öze ile 45°'lik açı ile yaklaşılarak birbirine paralel çizgi ekimler yapıldı. Agar yüzeyine ekim çizgilerini kapatacak şekilde steril lamel yerleştirildi. Oda ısısında 24-48 saatlik inkübasyonun ardından maya morfolojileri 100X ve 400X'lik büyütmelerde, hif, pseudohif, blastospor, artrospor ve klamidospore varlığı açısından incelendi. Hiflerin kenarlarında, arasında ya da uçlarında gelişmiş,

kalın duvarlı, yuvarlak oluşumlar klamidospor olarak değerlendirildi ve bu izolatlar *C.albicans* olarak tanımlandı (3).

İzole edilen tüm maya kolonilerinin CHROMagar *Candida* (BD Diagnostic, Sparks, MD) kromojenik hazır besiyerine de ekimi yapıldı. Burada yeşil renkli koloniler *C.albicans*, mavi renkli koloniler *C.tropicalis*, pembe, parlak küçük koloniler *C.glabrata* ve kuru-tozlu görünümlü, yayılan pembe renkli koloniler de *C.krusei* olarak tanımlandı.

Bu yöntemlerle tanımlaması yapılamayan maya izolatları, biyokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için API 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) maya tanımlama sistemine alındı. Bu sistem mayaların, glukoz, gliserol, arabinoz, ksiloz, adonitol, galaktoz, inositol, sorbitol, laktoz, maltoz, trehaloz gibi 19 substratı asimile etme yeteneğini değerlendirmeye dayanmaktadır. Üreticinin önerilerine göre hazırlanan maya süspansiyonu, bu sistemdeki 20 kuyucuğa inoküle edildi. 30 °C'de nemli ortamda, 48 saat inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonlar, herhangi bir karbonhidrat içermeyen ilk kuyucuktaki üreme ile karşılaştırılarak (+/-) şeklinde değerlendirildi.

Serumda germ tüp üretimi ve mısır unlu agarda klamidospor oluşumu gözlenmeyen, CHROMagar *Candida* besiyerinde kuru, yayılan, pembe renkli koloniler oluşturan ve API 20C AUX sistemi ile *C.krusei* olarak tanımlanan izolatlar çalışmaya alındı.

3.2. Besiyerleri

Çalışmada suşların saf pasajı için SDA, mikrodilüsyon, *time-kill* ve PAFE testleri için sıvı besiyeri olarak MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 buyyon ve patates dekstroz agar (PDA), Etest için de MOPS'lu RPMI 1640 agar ve disk difüzyon testleri için glukozlu metilen mavili Mueller Hinton agar kullanıldı.

SDA besiyeri; üretici önerilerine göre toz halindeki 47 g SDA (Merck, Darmstadt, Germany) 1000 ml distile suda çözdürülüp 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55 °C'ye soğutulup petri kaplarına dağıtıldı.

PDA besiyeri; üretici önerilerine göre toz halindeki 39 g PDA (Merck, Darmstadt, Germany) 1000 ml distile suda çözdürüldü ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55 °C'ye soğutulup petri kaplarına dağıtıldı.

RPMI 1640 buyyon (93); 10.4 g toz RPMI 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 900 ml distile suda çözüldü ve son konsantrasyon 0.165 mol/l olacak şekilde 34.53 g MOPS tamponu ilave edildi. 1mol/l sodyum hidroksit kullanılarak 25 °C’de pH 7.0’ye ayarlandı. Besiyeri filtrasyon yöntemi ile sterilize edilerek 100 ml’lik steril kapaklı şişelere dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklandı.

RPMI 1640 agar; aynı miktarlardaki RPMI 1640 ve MOPS ile 20 g glukoz 500 ml distile suda çözdürülüp su banyosunda 60 °C’de bekletildi. Aynı bir balonda 15 g agar 500 ml distile suda hazırlandı ve 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi. Her iki sıvı eşit ısıya ulaştığında RPMI 1640 besiyeri filtrasyonla sterilize edildi ve agarla birleştirilerek petri kaplarına dağıtıldı.

Mueller-Hinton Agar besiyeri; toz halindeki 38 g Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 1000 ml distile suda çözdürüldü. 20 mL distile suda 0,1 g metilen mavisi hafifçe çalkalanarak ve ısıtılarak eritildi. Agar süspansiyonun her litresine bu solüsyonun 100 µL’si ve 20 g glukoz eklendikten sonra 121 °C’de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55 °C’ye soğutulup petri kaplarına dağıtıldı.

3.3. Antifungal Maddeler

CAS (Merck Research Laboratories, Rahway, USA), VOR (Pfizer, New York, NY), AMB (Sigma, St Louis, MO, USA) toz etken maddeleri üretici firmalarından sağlandı ve CAS, VOR, AMB Etest şeritleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) proje kapsamında ilgili firmadan satın alındı. CAS 1600 µg/ml olacak şekilde steril distile suda, VOR ve AMB 1600 µg/ml olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüdürülerek stok solüsyonlar hazırlandı. Stok solüsyonlar 1 ml’lik tüplere dağıtılarak kullanılıncaya kadar -70 °C’de saklandı (93).

3.4. Antifungal Duyarlılıkların Saptanması

Bütün izolatlar için sıvı mikrodilüsyon (BMD), *time-kill*, PAFE, Etest ve disk difüzyon testlerinden oluşan antifungal duyarlılık testleri uygulandı.

Antifungallerin duyarlılık sınır değerleri VOR disk difüzyon testi için ≥ 17 mm ise duyarlı (S), 14-16 mm ise doza bağlı duyarlı (SDD) ve ≤ 13 mm ise dirençli (R); buna karşılık gelen MİK değerleri sırasıyla ≤ 1 µg/ml ise S, 2 µg/ml ise SDD ve

≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ ise R olarak değerlendirildi (95, 103). CAS için MİK değerleri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ ise S ve > 2 $\mu\text{g/ml}$ ise “duyarlı değil” şeklinde (103) ve disk difüzyon testi için ≥ 11 mm ise S ve ≤ 10 mm ise “duyarlı değil” olarak değerlendirilmiştir (99, 103, 104). AMB için standardize edilmiş bir duyarlılık sınır değeri aralığı bulunmamakla birlikte yayınlarda sık kullanılan değerler dikkate alınmış; ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ ise S ve ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ ise R olarak değerlendirilmiştir (97, 105). AMB disk difüzyon testi için zon çapı ≤ 10 mm ise dirençli kabul edilmiştir (106).

3.4.1. Buyyon Mikrodilüsyon Testi (BMD)

BMD testlerinin tüm aşamaları CLSI M27-A2 kılavuzuyla önerilen referans yönteme göre uygulandı (93). Önceden hazırlanmış antifungal stok süspansiyonları kullanılarak CAS için 0.0625-64 $\mu\text{g/ml}$, VOR ve AMB için 0.0313-16 $\mu\text{g/ml}$ arasındaki iki katlık ilaç konsantrasyonlarını içeren tüpler hazırlandı. Her antifungal için ayrı bir spora ikişer sıra test tüpü yerleştirildi. CAS için, RPMI 1640 buyyon kullanılarak stok solüsyondan dilüsyonlar yapıldı ve ikinci tüplerde 1/5’lik dilüsyonlar yapılarak son konsantrasyonların iki katı elde edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. CAS için dilüsyon şeması

Adım	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Kaynak	Hacim (ml)	+ Besiyeri (ml)	Ara konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Son konsantrasyon 1:5 ($\mu\text{g/ml}$)	Log_2
1	1600	Stok	2	3	640 $\mu\text{g/ml}$	128	6
2	640	1. adım	1,0	1,0	320	64	5
3	640	1. adım	1,0	3,0	160	32	4
4	160	3. adım	1,0	1,0	80	16	3
5	160	3. adım	0,5	1,5	40	8	2
6	160	3. adım	0,5	3,5	20	4	1
7	20	6. adım	1,0	1,0	10	2	0
8	20	6. adım	0,5	1,5	5	1	-1
9	20	6. adım	0,5	3,5	2,5	0,5	-2
10	2,5	9. adım	1,0	1,0	1,25	0,25	-3
11	2,5	9. adım	0,5	1,5	0,625	0,125	-4

AMB ve VOR için, ilk tüplerde DMSO, ikinci tüplerde ise RPMI 1640 buyyon ile stok solüsyondan dilüsyonlar yapılarak son test konsantrasyonlarının iki katı elde edildi (Tablo 3.2). Üreme kontrol kuyucukları için ilaç içermeyen bir tüp çalışmaya eklendi.

Test öncesi tüm izolatların SDA besiyerine 24 saatlik taze pasajları yapıldı. Yaklaşık 1 mm çaplı 3-5 koloni alınarak 5 ml steril %0.85 NaCl içinde standart maya süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar yaklaşık 15 saniye vortekslendikten sonra spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı. Bu işlemle stok maya süspansiyonunun her mililitresinde $1-5 \times 10^6$ hücre sağlandı. Stok maya süspansiyonu RPMI 1640 buyyon ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilti. Sonuçta $1-5 \times 10^3$ hücre/ml'lik son konsantrasyona ulaşıldı.

Tablo 3.2. VOR ve AMB için dilüsyon şeması

Adım	Konsantrasyon µg/ml	Kaynak	Hacim + Çözücü (ml + ml)		Ara konsantrasyon (µg/ml)	Son konsantrasyon 1:50 (µg/ml)	Log ₂
1	1,600	Stok			1,600 µg/ml	32	4
2	1,600	Stok	0,5	0,5	800	16	3
3	1,600	Stok	0,5	1,5	400	8	2
4	1,600	Stok	0,5	3,5	200	4	1
5	200	4. adım	0,5	0,5	100	2	0
6	200	4. adım	0,5	1,5	50	1	-1
7	200	4. adım	0,5	3,5	25	0,5	-2
8	25	7. adım	0,5	0,5	12,5	0,25	-3
9	25	7. adım	0,5	1,5	6,25	0,125	-4
10	25	7. adım	0,5	3,5	3,13	0,0625	-5

BMD testi için steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanıldı. Mikropalaklar antifungal isimleri ve dilüsyonları, suş numaraları ile etiketlendi. Steril plastik pipet uçları ve tek kanallı otomatik pipetler kullanılarak, her bir sütuna bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. İlk sütuna, üreme kontrol kuyucuğu olarak, ilaç içermeyen besiyeri dağıtıldı. Ardından her bir sıraya bir suş

gelecek şekilde mikroorganizmalar 100' er µl eklendi. Bu işlem sonucunda hem ilaç hem de maya süspansiyonları 1/2 oranında seyreltilerek çalışma son konsantrasyonuna ulaşıldı. Mikroplakların üzeri steril parafilm ile kapatıldı ve 35 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kırksekiz saatlik inkübasyonun ardından duyarlılık sonuçları görsel olarak değerlendirildi. AMB için MİK değeri görülebilir üremenin tam olarak engellendiği kuyucuk, VOR ve CAS için ise üreme kontrol kuyucuğuna göre üremede belirgin azalmanın (\geq %50) olduğu ilk kuyucuk MİK değeri olarak kabul edildi (99).

MİK sonuçları değerlendirildikten sonra, bütün izolatlar ve antifungaller için mikroplakların gözle görünür üremenin olmadığı kuyucuklarından 100 µl alınarak SDA plaklarına yayıldı. Plaklar 48 saat sonra değerlendirilerek <2 koloni üreme olan konsantrasyon, minimal fungusidal konsantrasyon (MFK) olarak kabul edildi (99).

3.4.2. Disk Difüzyon Testi

İlaç içeren diskler için Whatman no 1 kağıtları kullanıldı. Diskler 6,3 mm çapında hazırlandı ve cam bir kap içerisinde kuru sıcak hava ile pastör fırınında steril edildi. CAS için 200 µg/ml, VOR için 40 µg/ml ve AMB için 400 µg/ml konsantrasyonlarında antifungal içeren solüsyonlar hazırlandı. Her bir diske 25 µl antifungal süspansiyon emdirilerek kurumaya bırakıldı. Bu şekilde, disklerde antifungallerin son konsantrasyonu 5 µg CAS, 1 µg VOR ve 10 µg AMB şeklindeydi (99, 107). Kombinasyon diskleri ise 400 µg/ml CAS ile 80 µg/ml VOR ya da 800 µg/ml AMB eşit miktarlarda kombine edilerek hazırlanan solüsyondan her bir diske 25 µl emdirilerek hazırlandı.

Disk difüzyon testi için tüm aşamalar CLSI M44-A rehberinde belirtildiği şekilde yapıldı (95). %2 Glukoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi içeren Mueller Hinton agar plakları önceden hazırlandı. Standart 0.5 McFarland bulanıklıktaki maya süspansiyonları steril pamuklu eküvyonlar kullanılarak hücreler tek sıra dağılacak şekilde agar besiyeri yüzeyine yayıldı. Antifungal diskler, merkezden merkeze uzaklığı 24 mm'den daha yakın olmayacak şekilde agar yüzeyine yerleştirildi. Onbeş dakika içinde plaklar ters olarak etüve yerleştirildi ve 35 °C'de 20-24 saat inkübasyona bırakıldı. Değerlendirme görsel olarak yapıldı; CAS ve VOR için disk çevresinde üremenin belirgin olarak (%80) azaldığı zonun çapı, AMB için üremenin tamamen engellendiği zonun çapı milimetrik olarak ölçüldü (99, 107).

3.4.3. Etest

Etest yöntemi üreticinin önerilerine göre uygulandı. SDA'daki 24 saatlik taze maya kültüründen 3-5 koloni alınarak 5 ml %0.85 NaCl içinde 0.5 McFarland bulanıklık oluşturacak şekilde maya süspansiyonu hazırlandı ve RPMI 1640 agar içeren 150 mm çaplı plaklara hücreler tek sıra dağılacak şekilde yayıldı. Plaklar kurumaları için yaklaşık 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra her üç antifungal şeriti (CAS, VOR, AMB) tek plakta olacak şekilde yerleştirildi. Tüm plaklar 35 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Etest MİK değerleri CAS ve VOR için, farkedilebilen %80'lik üreme inhibisyon elipsi ile Etest şeridinin kesiştiği noktada değerlendirildi. AMB için MİK değeri üremenin tamamen inhibe edildiği ilk tamamen temiz elips ile şeridin kesiştiği nokta olarak kabul edildi (97).

3.4.4. Time-kill Testi

Test öncesi bütün izolatların PDA'ya pasajları yapıldı ve 24-48 saatlik kültürlerinden 3-5 koloni alınarak 9 ml steril distile suda standart 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspansiyonları hazırlandı. Referans BMD yöntemi ile önceden saptanmış olan MİK değerleri dikkate alınarak, her ilaç için 1/4x MİK, 1x MİK ve 4x MİK olacak şekilde ilaç konsantrasyonlarını içeren 9 ml, MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 buyyon tüpleri hazırlandı. Çalışmada kontrol amaçlı ilaç içermeyen sıvı besiyerinin bulunduğu bir de kontrol tüpü yer aldı. Toplamda bir antifungal ve bir izolat için 4 tüp kullanıldı. Standart maya süspansiyonundan 1'er mililitre bu tüplere eklendi. Bu şekilde tüplerdeki maya konsantrasyonu 1/10 oranında seyreltiği için $1-5 \times 10^5$ CFU/ml oldu. Tüpler 120 rpm orbital karıştırıcılı inkübatörde 35 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 0., 2., 4., 8., 24. ve 48. saatlerinde her bir tüpten 100 µl örnek alınarak steril distile su ile 1/10'luk seri dilüsyonları yapıldı ve koloni sayımı için her birinden 30 µl PDA plaklarına inoküle edildi. Koloni sayısı 1,000 CFU/ml'den daha az olduğunda, sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonlar için direkt tüplerden 30 µl alınarak, dilüsyon yapılmaksızın PDA'ya yayıldı. PDA plakları 35°C'lik etüve alındı ve koloni sayımları 48 saat sonra yapıldı. (101, 102). Koloni sayısı için 50 CFU/ml alt sınır olarak kabul edildi. Koloni sayısında başlangıca göre $\geq 99.9\%$ ($3-\log_{10}$) azalma fungusidal aktivite ve $< 99\%$ azalma fungostatik aktivite olarak tanımlandı (108).

3.4.5. Post Antifungal Etki (PAFE)

PAFE çalışmaları *time-kill* çalışmaları ile paralel yürütüldü. Her bir ilaç için önceden belirlenen MİK değerlerine göre, 1/4x MİK, 1x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarında aynı şekilde hazırlanan tüplere ve ilaçsız kontrol tüpüne standart maya süspansiyonundan 1'er mililitre eklendi. Orbital karıştırıcılı inkübatörde 35°C'de 1 saatlik inkübasyonun ardından tüpler 1400Xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüp üzerindeki süpernatant kısım uzaklaştırılıp, 9 ml steril %0.85 NaCl eklenerek tekrar santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve son aşamada tüplere ılık RPMI 1640 buyyon eklenerek tekrar inkübatöre alındı. Böylece 3 yıkama işlemi ile antifungaller ortamdan uzaklaştırıldı. İnkübasyonun 0., 2., 6., 24. ve 48. saatlerinde her bir tüpten 100 µl örnek alındı, steril distile su ile 1/10'luk seri dilüsyonlar yapıldı ve koloni sayımı için her bir dilüsyondan 30 µl alınarak PDA plaklarına yayıldı. Koloni sayısı 1,000 CFU/ml'den daha az olduğunda, sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonlar için direkt tüplerden 30 µl alınarak, dilüsyon yapılmaksızın PDA plaklarına yayıldı. 35°C'de 48 saat inkübasyonun ardından koloniler sayıldı. Alt sınır 50 CFU/ml olarak kabul edildi. PAFE, test kültürlerinin yoğunluğunda $1\log_{10}$ 'luk artış olması için gereken süreden, kontrol kültürü yoğunluğunda $1\log_{10}$ 'luk artış olması için gereken süre çıkarılarak hesaplandı (90, 109, 110).

3.5. Antifungal Kombinasyon Testleri

CAS ile AMB (CAS+AMB) ve CAS ile VOR (CAS+VOR) kombinasyonları üç farklı disk difüzyon, iki farklı Etest, *time-kill* ve post antifungal etki yöntemleri ile değerlendirildi.

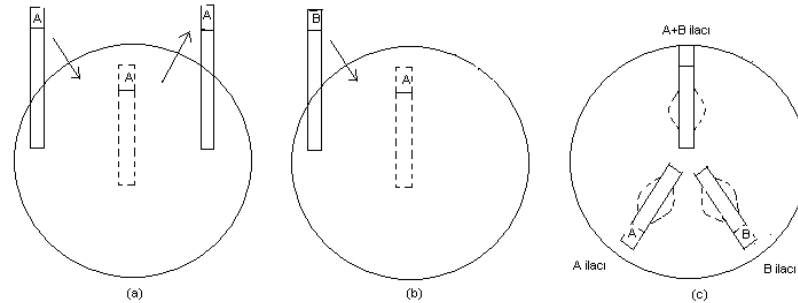
3.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Kombinasyon

Antifungal diskler, standart maya süspansiyonları ve inokülasyonu daha önce anlatıldığı şekilde yapıldı. Tek bir agar plağında (90 mm) üç farklı kombinasyon aynı anda çalışıldı. İlaç kombinasyonlarını değerlendirmek için, CAS içeren disk ile kombine etkisi çalışılacak diğer ilacı içeren disk karşılıklı yerleştirildi. Aralarındaki mesafe, ilaçların tek başlarına test edildiklerinde elde edilen inhibisyon zonlarının yarıçapları toplamı kadar olacak şekilde ayarlandı. Plağın alt kısmına da aralarında bu mesafenin yarısı kadar uzaklıkta olan iki disk yerleştirildi. En alt kısma da iki

ilacın kombinasyonunu içeren bir disk yerleştirildi. Plaklar 24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. İki ilacın inhibisyon zonlarının birleştiği alanda köprüleşme, genişleme ya da inhibisyon zonlarında kesilme olup olmadığına bakıldı. İki ilacın tek bir diskte kombine edildiği yöntemde ise, tek başlarına test edildiklerinde en etkili ilacın zon çapına göre azalma ya da artış olup olmadığına göre değerlendirme yapıldı (81, 95, 111).

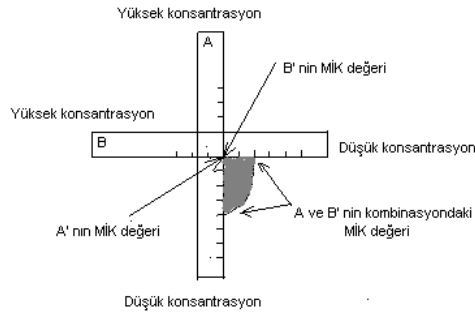
3.5.2. Etest Yöntemi ile Kombinasyon

Standart maya süspansiyonu hazırlandı ve RPMI 1640 agar plaklarına inokülasyonu yapıldı. İki farklı Etest kombinasyon yöntemi uygulandı. Birincisinde; CAS'e ait Etest şeriti agar üzerine yerleştirildi, 1 saat sonra bu şerit kaldırılıp onun izi üzerine denk gelecek şekilde kombine etkisi değerlendirilecek diğer Etest şeridi yerleştirildi (Şekil 3.1). 35 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra MİK değerleri okundu. Antifungal ilaçların tek başlarına saptanan MİK değerlerine göre kombinasyonda ≥ 3 dilüsyon azalma sinerji, ≥ 3 dilüsyon artış antagonizma ve < 2 dilüsyon azalması etkisiz olarak tanımlandı (102).



Şekil 3.1. Birinci Etest kombinasyon yöntemi

İkinci yöntemde Etest şeritleri agar üzerine çapraz bir pozisyonda, her bir antifungal tek başına test edildiğinde elde edilen MİK değerlerinde üst üste gelecek şekilde 90° lik açı ile yerleştirildi (Şekil 3.2). 48 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirildi. Kombinasyonda MİK değerlerinde değişiklik ya da iki Etest şeridi arasında kalan bölgede inhibisyon alanı genişlemesi varlığı araştırıldı.



Şekil 3.2. İkinci Etest kombinasyon yöntemi

3.5.3. *Time-kill* ve PAFE Yöntemleri ile Kombinasyon

Kombinasyon testlerinde de ilaçların 1/4x MİK, 1x MİK ve 4x MİK konsantrasyonları karşılaştırıldı. Tüm işlemler daha önce anlatıldığı şekilde uygulandı. Farklı olarak, tüplerde iki farklı ilaç aynı anda yer aldı. Sonuçlar, tek başına en aktif ilaca göre değerlendirildi. Tek başına en aktif ilaca göre kombinasyonda 24 saat sonra canlı hücre sayısındaki 100 kat ve üzeri ($\geq 2\log_{10}$) azalma sinerji, 100 kat ve üzeri ($\geq 2\log_{10}$) artış antagonizma ve 100 kattan daha az ($< 2\log_{10}$) bir değişiklik etkisizlik olarak tanımlandı (5, 102, 108,112)

4. BULGULAR

4.1. Antifungal Duyarlılık Sonuçları

İzolatların tüm duyarlılık sonuçları Tablo 4.1’de özetlenmiştir. BMD testi ile izolatların MİK değerleri VOR için 0.25-0.50 µg/ml arasında, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.50 µg/ml olarak gerçekleşti. Minimal fungusidal konsantrasyonlar ise 1.0-16.0 µg/ml arasında değişti. Buna göre çalışmaya alınan *C.krusei* izolatlarının tümü her üç yöntemle de VOR’e duyarlı olarak saptandı. BMD ve Etest yöntemleri arasındaki ±2 dilüsyon içinde gerçekleşen uyum oranı %100 ve her üç yöntem arasındaki kategorik uyum oranı da %100 olarak gerçekleşmiştir.

AMB için referans BMD testi ile elde edilen MİK sonuçları 1.0-2.0 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 1.0 µg/ml ve 2.0 µg/ml şeklindeydi. AMB için MFK değerleri ise genellikle MİK’e eşit ya da 2-4 kat daha fazlaydı ve 2.0-8.0 µg/ml arasında yer aldı. AMB için kabul edilmiş bir duyarlılık sınır değeri bulunmamakla birlikte, daha önceden yayınlanmış raporlara göre (97, 105), BMD ile izolatların %50’sinin MİK değeri 1 µg/ml (S) ve diğer %50’lik kısmının ise 2 µg/ml (R) olarak sonuçlandı. BMD testi ile Etest MİK’leri arasındaki ±2 dilüsyonluk uyum oranı %100 olarak tespit edildi.

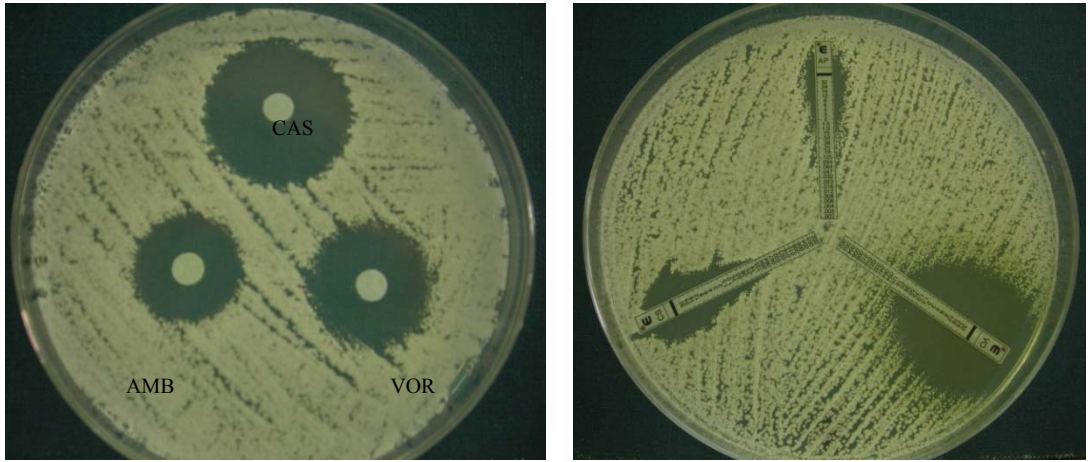
CAS için BMD MİK sonuçları 0.25-1.0 µg/ml arasında, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.5 µg/ml ve 1.0 µg/ml idi. CAS MFK değerleri de genellikle MİK değerlerine yakın olmakla birlikte 16 kat kadar yüksek sonuçlar da gözlemlendi. Her üç yöntemle de izolatların tümü CAS’e duyarlıydı. Etest yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları 30 izolatın 25’inde (uyum oranı %83.3) BMD ile elde edilen MİK sonuçlarının ±2 aralığında yer aldı. Oysa kategorik uyum üç yöntem için de %100 olarak gerçekleşti.

Genel olarak Etest yöntemi ile elde edilen MİK değerleri daha düşük olma eğilimindeydi ve en yüksek MİK değerleri AMB ile gözlemlendi. VOR ve CAS ile elde edilen MİK aralıkları birbirine benzer bulundu. En geniş disk difüzyon zonları CAS ile elde edildi (Şekil 4.1). Disk difüzyon testi hem 24 hem de 48 saatte değerlendirildi (Tablo 4.2). CAS ve VOR için her iki değerlendirme zamanı sonuçları arasında fark gözlenmedi. Ancak AMB için 30 izolatın 28’inde 48 saatte zon çaplarında 1-3 mm’lik azalma tespit edildi.

Tablo 4.1. BMD, Etest ve disk difüzyon yöntemleri ile duyarlılık sonuçları

İzolot No	VOR				AMB				CAS			
	MİK (µg/ml)	MFK (µg/ml)	Etest (µg/ml)	DD (mm)	MİK (µg/ml)	MFK (µg/ml)	Etest (µg/ml)	DD (mm)	MİK (µg/ml)	MFK (µg/ml)	Etest (µg/ml)	DD (mm)
1	0.5	4.0	0.25	22	2.0	2.0	1.5	18	0.5	1.0	0.125	26
2	0.25	8.0	0.125	28	1.0	8.0	1.0	21	1.0	2.0	0.19	27
3	0.5	8.0	0.25	21	2.0	4.0	2.0	20	0.25	1.0	0.25	28
4	0.5	2.0	0.125	24	1.0	2.0	1.0	23	0.5	1.0	0.38	30
5	0.25	4.0	0.19	30	1.0	8.0	1.0	24	0.5	1.0	0.25	27
6	0.5	4.0	0.25	18	1.0	2.0	1.0	19	0.5	1.0	0.094	26
7	0.5	8.0	0.19	24	2.0	2.0	1.5	20	0.5	0.5	0.25	29
8	0.25	16.0	0.19	25	2.0	2.0	2.0	20	0.25	2.0	0.047	28
9	0.5	4.0	0.38	22	2.0	2.0	1.5	21	0.5	8.0	0.125	28
10	0.5	4.0	0.19	18	1.0	2.0	1.0	20	1.0	2.0	0.19	28
11	0.5	1.0	0.19	26	1.0	4.0	1.0	18	0.5	1.0	0.19	26
12	0.5	8.0	0.19	24	1.0	2.0	2.0	19	0.5	1.0	0.25	29
13	0.5	16.0	0.19	25	2.0	2.0	1.5	19	0.5	1.0	0.25	26
14	0.5	16.0	0.19	22	2.0	2.0	1.5	20	0.5	8.0	0.38	27
15	0.5	4.0	0.19	25	1.0	4.0	0.5	19	1.0	2.0	0.38	27
16	0.5	8.0	0.19	20	2.0	8.0	1.5	20	1.0	1.0	0.125	26
17	0.25	4.0	0.125	25	1.0	2.0	2.0	20	1.0	1.0	0.50	26
18	0.5	8.0	0.25	23	2.0	8.0	1.5	20	0.25	0.5	0.094	27
19	0.25	8.0	0.125	21	1.0	2.0	1.5	18	0.25	0.5	0.25	25
20	0.25	4.0	0.094	23	1.0	2.0	0.75	20	0.25	2.0	0.25	27
21	0.25	4.0	0.19	20	1.0	4.0	1.0	19	0.25	1.0	0.25	27
22	0.25	8.0	0.38	20	2.0	2.0	2.0	21	0.25	1.0	0.38	30
23	0.5	16.0	0.25	24	2.0	4.0	2.0	18	0.25	1.0	0.25	26
24	0.5	8.0	0.25	21	2.0	2.0	2.0	22	0.25	1.0	0.19	28
25	0.5	2.0	0.125	22	2.0	2.0	1.5	21	1.0	1.0	0.25	30
26	0.5	8.0	0.19	20	2.0	2.0	1.0	18	0.5	1.0	0.38	29
27	0.5	4.0	0.38	22	1.0	2.0	2.0	22	0.5	1.0	0.25	30
28	0.5	8.0	0.19	24	1.0	2.0	1.0	20	1.0	1.0	0.25	29
29	0.25	4.0	0.50	27	1.0	2.0	0.50	24	0.5	2.0	0.19	25
30	0.25	8.0	0.25	24	2.0	2.0	1.5	20	1.0	1.0	0.50	30

MİK, BMD ile saptanan minimum inhibitör konsantrasyon sonuçları (µg/ml); MFK, minimum fungusidal konsantrasyon (µg/ml); Etest, Etest yöntemi ile elde edilen MİK değerleri (µg/ml); DD, disk difüzyon yöntemi ile 24 saatte elde edilen zon çapları (mm).



Şekil 4.1. Disk difüzyon ve Etest duyarlılık yöntemleri

4.2. Kombinasyon Test Sonuçları

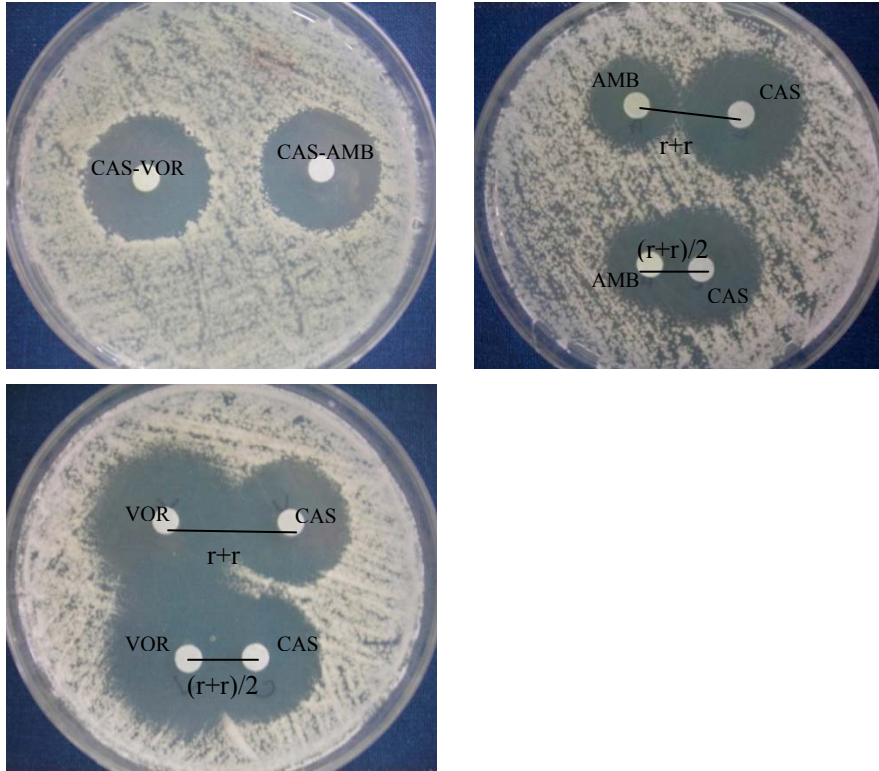
4.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları

Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyonları değerlendirmek için üç farklı yöntem kullanıldı. Öncelikle her bir antifungalın tüm izolatlar için tek başına zon çapı değerleri saptandı. Ardından ilaçların tek başına olduğu halde elde edilen zon çapı değerlerine göre kombinasyonlar çalışıldı. Sonuçlar Tablo 4.2’de sunulmuştur. İki ilacın aynı diskte birleştirildiği kombinasyon yönteminde, disklerin zon çaplarında tek başlarına olduğuna göre belirgin bir değişiklik saptanmadı; CAS-VOR kombinasyonu için izolatların 17’sinin zon çaplarında 1-6 mm azalma, 8’inde 1-3 mm artış saptandı ve 5 izolatın zon çaplarında değişiklik gözlenmedi.

CAS-AMB kombinasyonunda izolatların 10’unun zonlarında 1-5 mm azalma, 6’sının zonlarında 1-3 mm artış saptandı ve 14’ünün zon çapları değişmedi. Diğer iki disk difüzyonla kombinasyon yönteminde, diskler arasındaki mesafe önceden belirlenen zon yarıçapları toplamı ve yarıçapları toplamının yarısı olacak şekilde çalışıldı. Diskler arasındaki mesafe fark etmeksizin her iki yöntemle de antifungaller arasında herhangi bir etkileşme gözlenmedi (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyon sonuçları

İzolat No	Tek başına antifungallerin zon çapı (mm)						Kombinasyonda antifungallerin zon çapı (mm)			
	VOR		AMB		CAS		CAS-VOR		CAS-AMB	
	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa	24sa	48sa
1	22	22	18	17	26	26	26	26	26	26
2	28	28	21	19	27	27	25	25	27	27
3	21	20	20	18	28	28	28	28	28	28
4	24	24	23	20	30	30	28	28	30	30
5	30	30	24	21	27	27	27	27	27	27
6	18	18	19	16	26	26	25	25	26	26
7	24	24	20	18	29	29	30	30	27	27
8	25	25	20	18	28	28	26	26	26	26
9	22	22	21	19	28	28	26	26	28	28
10	18	18	20	17	28	28	22	22	29	29
11	26	26	18	17	26	26	25	25	26	26
12	24	24	19	17	29	29	28	28	30	30
13	25	25	19	17	26	26	28	28	28	28
14	22	22	20	18	27	27	26	26	27	27
15	25	25	19	17	27	27	30	30	27	27
16	20	20	20	20	26	26	26	26	26	26
17	25	25	20	19	26	26	27	27	25	25
18	23	23	20	18	27	27	26	26	26	26
19	21	21	18	16	25	25	26	26	25	25
20	23	23	20	18	27	27	30	30	30	30
21	20	20	19	16	27	27	28	28	29	29
22	20	20	21	19	30	30	30	30	30	30
23	24	24	18	17	26	26	26	26	24	24
24	21	21	22	21	28	28	25	25	29	29
25	22	22	21	20	30	30	27	27	25	25
26	20	20	18	18	29	29	24	24	24	24
27	22	22	22	21	30	30	28	28	25	25
28	24	24	20	19	29	29	28	28	24	24
29	27	27	24	20	25	25	30	30	25	25
30	24	24	20	19	30	30	25	25	26	26



Şekil 4.2. Disk difüzyon yöntemi ile antifungal kombinasyonlar

4.2.2. Etest Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları

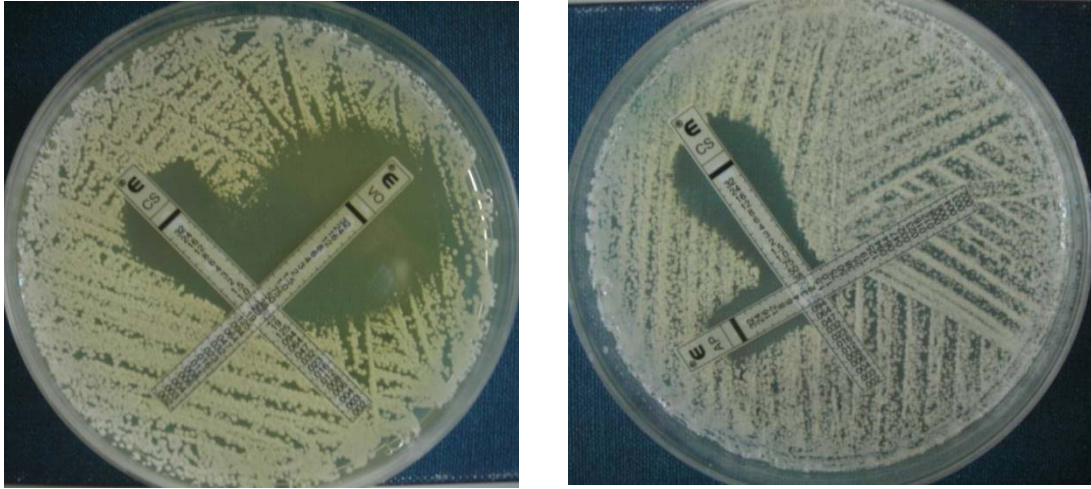
CAS-VOR ve CAS-AMB kombinasyonlarını değerlendirmek amacıyla iki farklı Etest yöntemi kullanıldı. Birinci yöntemde CAS Etest şeridi besiyeri yüzeyine yerleştirilip 1 saat bekletildikten sonra kaldırılıp yerine kombinasyonu yapılacak antifungalın şeridi yerleştirildi. Sonuçlar antifungal ilaçların tek başlarına saptanan MİK değerlerine göre kombinasyonda ≥ 3 dilüsyon azalma, ≥ 3 dilüsyon artış ya da < 2 dilüsyon azalma bulunup bulunmamasına göre değerlendirildi (Tablo 4.3). Bu yöntemle, tek başına test edildiklerinde elde edilen sonuçlara göre CAS-VOR kombinasyonunda genellikle daha düşük MİK değerleri gözlemlendi. Ancak sonuçlar ± 3 dilüsyon aralığında yer aldığından sinerjik etkileşme saptanmadı.

Aksine, CAS-AMB kombinasyonunda, kombinasyon MİK değerleri genellikle tek başına ilaçlardan elde edilen MİK'lerden daha yüksekti ve iki izolatta ≥ 3 dilüsyonluk artış tespit edildi. Böylece CAS-AMB'nin bu Etest yöntemiyle kombinasyonunda iki izolat için antagonizma kaydedildi. Sinerjik etkileşme tespit edilmedi.

Tablo 4.3. Birinci Etest kombinasyon yöntemi sonuçları

İzolat No	Tek başına MİK değerleri (µg/ml)			Kombinasyonların MİK değeri (µg/ml)			
	VOR	AMB	CAS	CAS-VOR		CAS-AMB	
				MİK	Sonuç*	MİK	Sonuç*
1	0.25	1.5	0.125	0.125	I	0.38	I
2	0.125	1.0	0.19	0.125	I	0.38	I
3	0.25	2.0	0.25	0.125	I	0.50	I
4	0.125	1.0	0.38	0.094	I	0.50	I
5	0.19	1.0	0.25	0.125	I	0.25	I
6	0.25	1.0	0.094	0.19	I	0.25	I
7	0.19	1.5	0.25	0.049	I	1.0	I
8	0.19	2.0	0.047	0.25	I	0.50	A
9	0.38	1.5	0.125	0.125	I	0.50	I
10	0.19	1.0	0.19	0.125	I	0.50	I
11	0.19	1.0	0.19	0.125	I	0.50	I
12	0.19	2.0	0.25	0.125	I	0.25	I
13	0.19	1.5	0.25	0.125	I	0.25	I
14	0.19	1.5	0.38	0.25	I	0.19	I
15	0.19	0.5	0.38	0.125	I	0.50	I
16	0.19	1.5	0.125	0.25	I	0.50	I
17	0.125	2.0	0.50	0.19	I	0.38	I
18	0.25	1.5	0.094	0.38	I	1.0	A
19	0.125	1.5	0.25	0.064	I	1.0	I
20	0.094	0.75	0.25	0.125	I	0.50	I
21	0.19	1.0	0.25	0.125	I	0.50	I
22	0.38	2.0	0.38	0.19	I	0.50	I
23	0.25	2.0	0.25	0.19	I	0.38	I
24	0.25	2.0	0.19	0.125	I	0.25	I
25	0.125	1.5	0.25	0.094	I	0.25	I
26	0.19	1.0	0.38	0.25	I	0.38	I
27	0.38	2.0	0.25	0.19	I	0.50	I
28	0.19	1.0	0.25	0.125	I	0.25	I
29	0.50	0.50	0.19	0.125	I	0.50	I
30	0.25	1.5	0.50	0.125	I	0.25	I

* I, etkisizlik (*Indifference*); A, antagonizma



Şekil 4.3. İkinci Etest kombinasyon yöntemi

Etestle antifungal kombinasyonun ikinci yönteminde, Etest şeritleri agar yüzeyine çapraz bir pozisyonda, her bir antifungal tek başına test edildiğinde elde edilen MİK değerlerinde kesişecek şekilde 90° lik bir açı ile yerleştirildi. Bu şekilde kesişme noktasının altında kalan bölgede inhibisyon alanında genişleme ya da antifungallerin MİK'lerinde değişiklik araştırıldı. Her iki kombinasyon için de inhibisyon alanında genişleme saptanmadı. Ayrıca önceden saptanan MİK değerlerinde de değişiklik gözlenmedi. Diğer Etest yöntemi ile antagonizma saptanan iki izolat için de bu yöntemde antifungal etkileşme gözlenmedi.

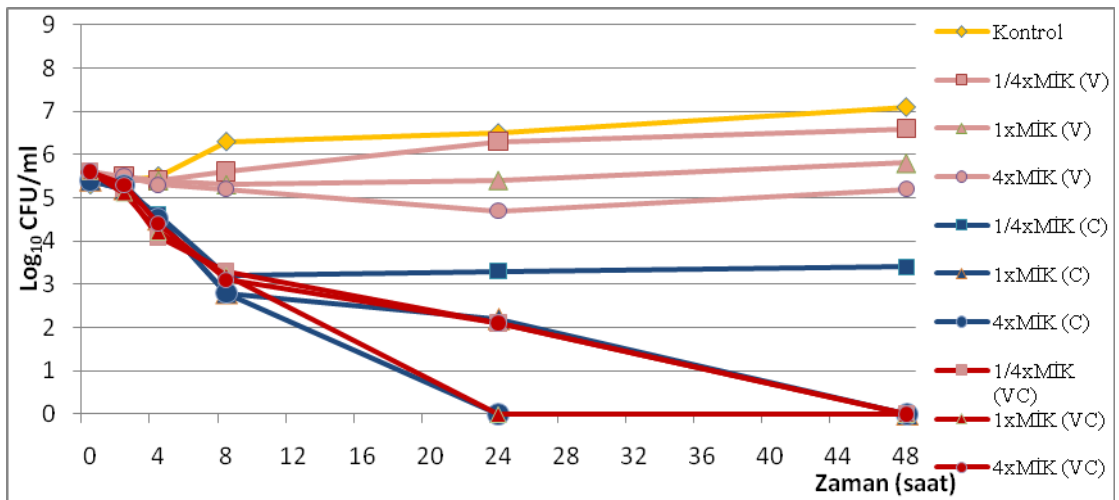
4.2.3. Time-Kill Yöntemi ile Kombinasyon Sonuçları

Bütün *C.krusei* izolatları için her üç ilaçla ve onların ikili kombinasyonları ile *time-kill* çalışmaları yapıldı. Koloni sayısında başlangıca göre $\geq 99.9\%$ ($3-\log_{10}$) azalma fungusidal aktivite ve $< 99\%$ azalma fungostatik aktivite olarak tanımlandı (108). Kombinasyon çalışmalarında ise sonuçlar tek başına en aktif ilaçla karşılaştırılarak değerlendirildi. Tek başına en aktif ilaca göre kombinasyonda 24 saat sonra canlı hücre sayısındaki 100 kat ve üzeri ($\geq 2\log_{10}$) azalma sinerji, 100 kat ve üzeri ($\geq 2\log_{10}$) artış antagonizma ve 100 ($< 2\log_{10}$) kattan daha az bir değişiklik etkisiz olarak değerlendirildi (5, 102, 108, 112). Çalışmaya alınan 30 *C.krusei* izolatu için elde edilen sonuçlara göre oluşturulan *time-kill* eğrileri Şekil 4.4 ve 4.5'de verilmiştir. Her grafik, bir izolata karşı iki ilacın tek başına ve kombinasyonlarında farklı MİK değerleri için oluşturdukları eğrileri içermektedir; Şekil 4.4 VOR-CAS

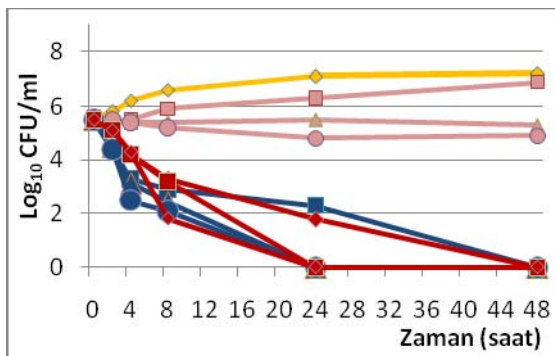
kombinasyonu, Şekil 4.5 AMB-CAS kombinasyonu için oluşturulan eğrileri göstermektedir. Buna göre, VOR üç farklı konsantrasyonda da bütün izolatlara karşı fungostatik aktivite sergiledi. İlaç konsantrasyonunun artması ile mikroorganizma koloni sayısında farkedilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

AMB tamamen doz ilişkili bir etki sergiledi. *C.krusei* izolatları üzerinde 1/4x MİK ve 1x MİK konsantrasyonlarında fungostatik bir etki gösterirken, 4x MİK konsantrasyonunda fungusidal aktivite gözlemlendi.

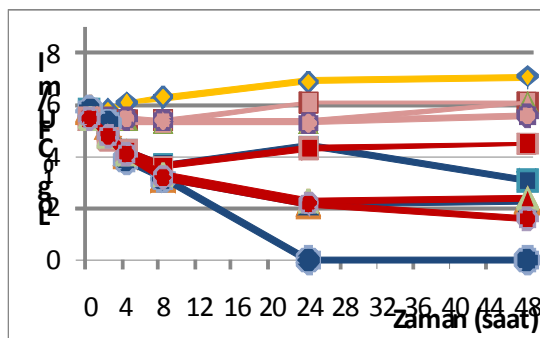
CAS ise ilk 8 saatte hızlı bir öldürme etkisi göstererek, 1/4x MİK konsantrasyonda fungostatik, 1x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarında ise genellikle fungusidal aktivite gösterdi. Bu etki ilacın solüsyondaki konsantrasyonu ile ilişkiliydi. İzolatların 21'inde 1/4x MİK konsantrasyonunda ilk 8 saatlik süre içinde gözlenen hızlı öldürme aktivitesi kalıcı olmadı ve 24-48 saatte koloni sayısında tekrar artış gözlemlendi, 7 izolatta fungusidal etki hızı düşerek devam ederken 2 izolatta hız sabit kaldı. 1xMİK konsantrasyonlarında ilk 4-8 saatlerde öldürme hızı en yüksekti, maksimum etki ise izolatların 1'inde 8 saatte, 15'inde 24 saatte ve 14'ünde 48 saatte oluştu. 4 izolatta ilk hızlı fungusidal aktivitenin ardından koloni sayısında artış saptandı. Öldürme hızının en yüksek olduğu konsantrasyon 4x MİK'di ve izolatların 17'sinde ilk 4 saatte koloni sayısında $\geq\%99$ bir azalma gözlemlendi.



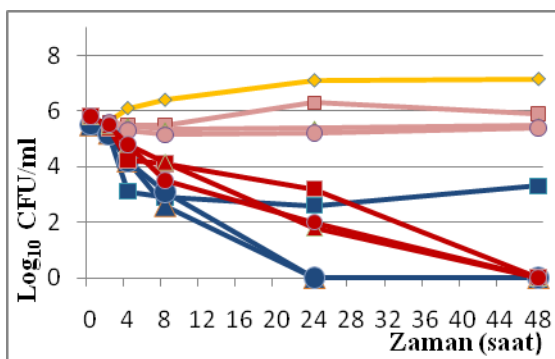
İzolot 1 (V, vorikonazol; C, kaspofungin; VC, vorikonazol-kaspofungin)



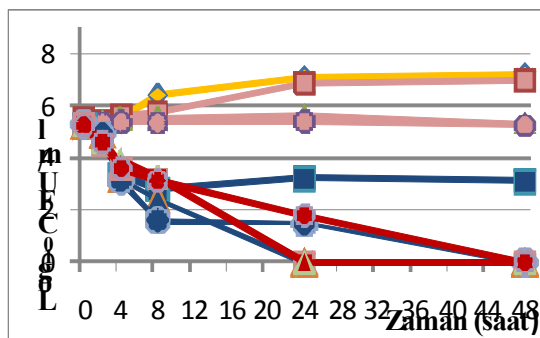
2



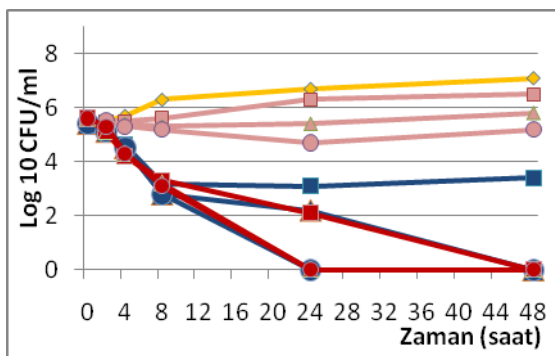
3



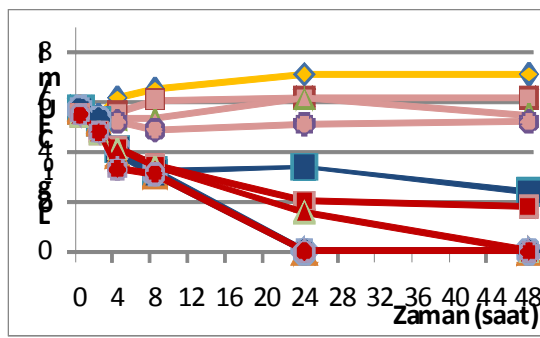
4



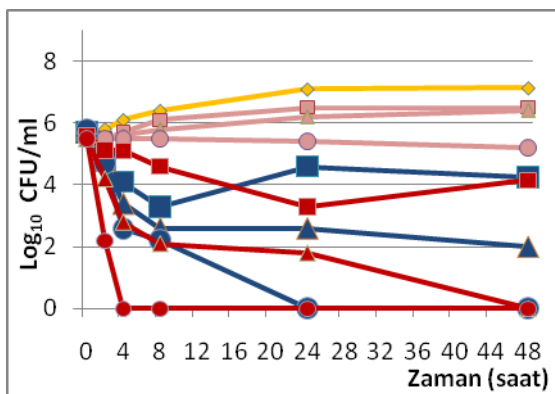
5



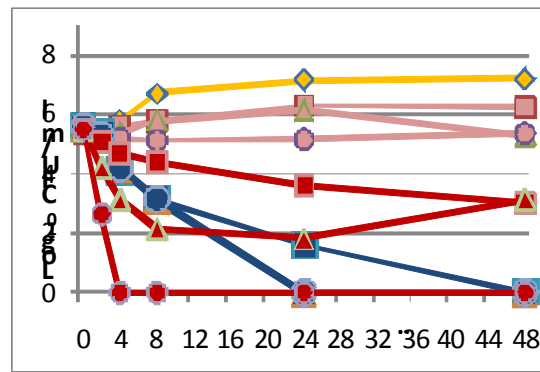
6



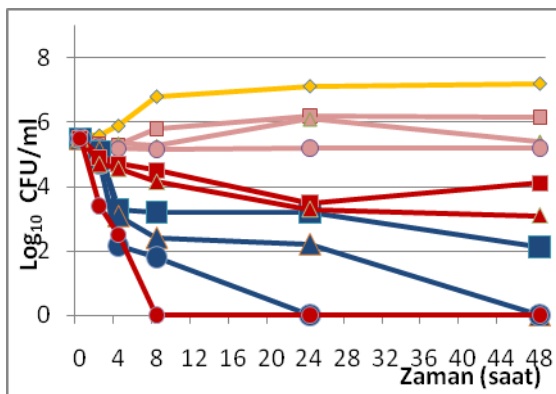
7



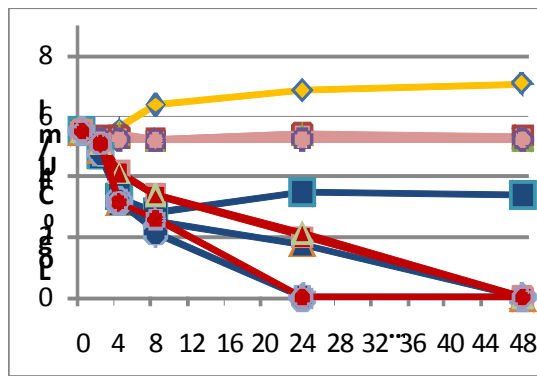
8



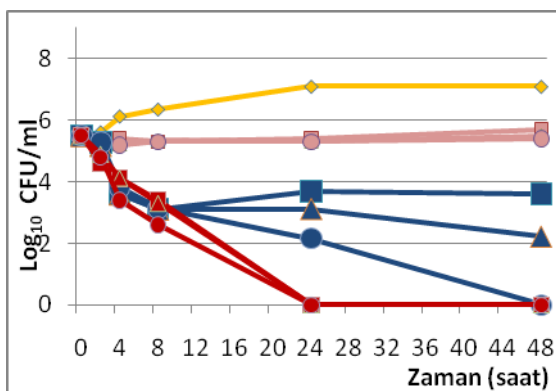
9



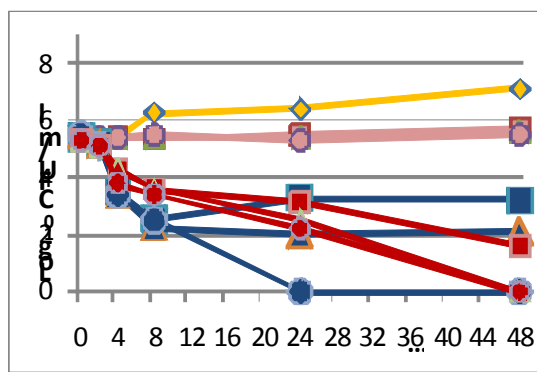
10



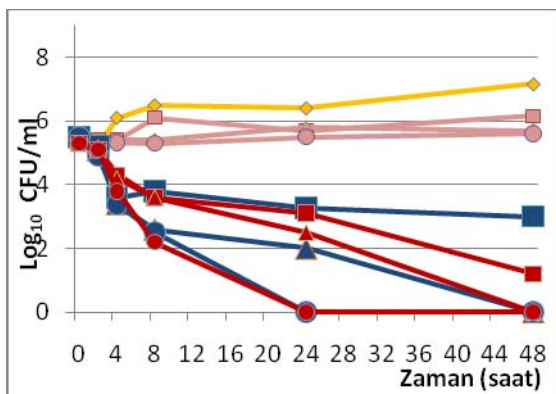
11



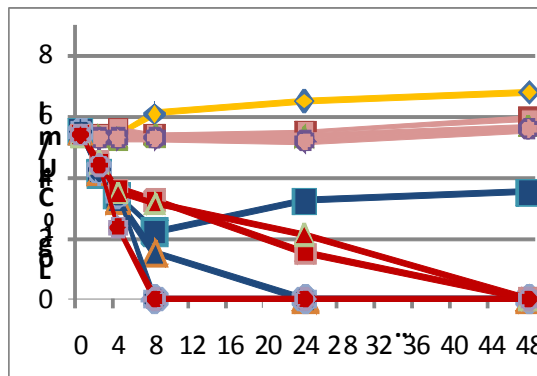
12



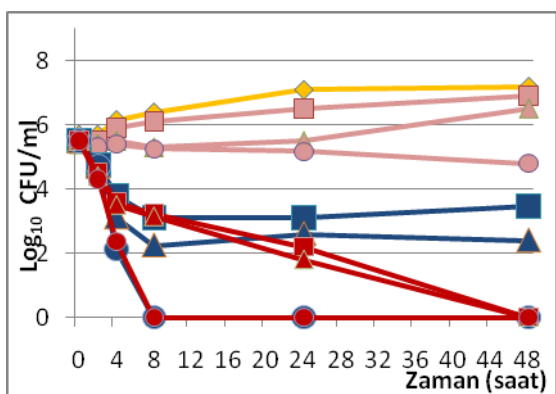
13



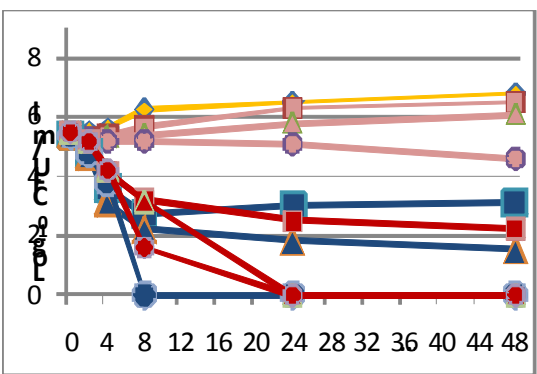
14



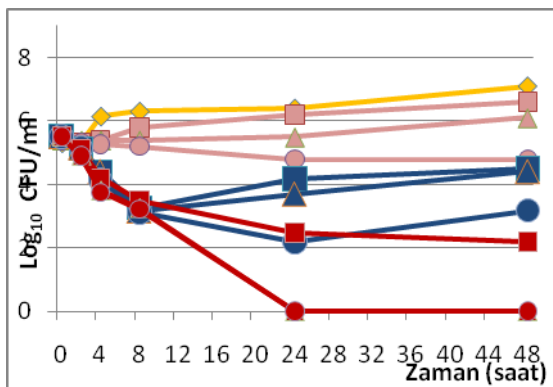
15



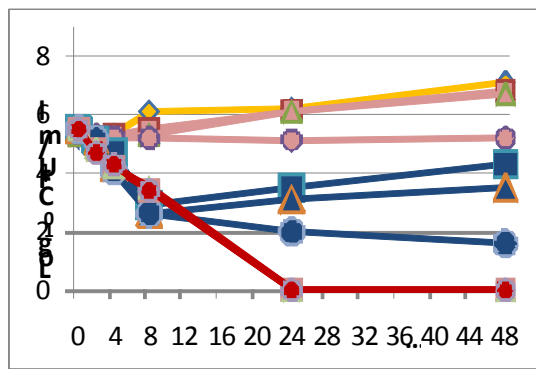
16



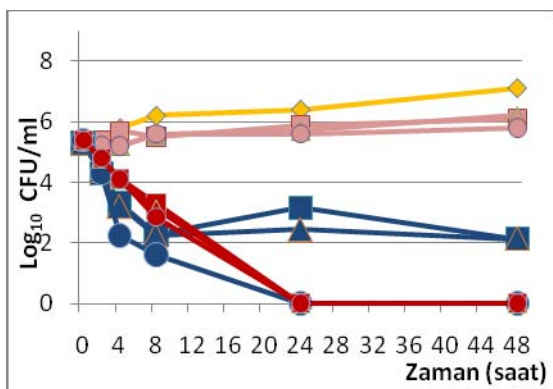
17



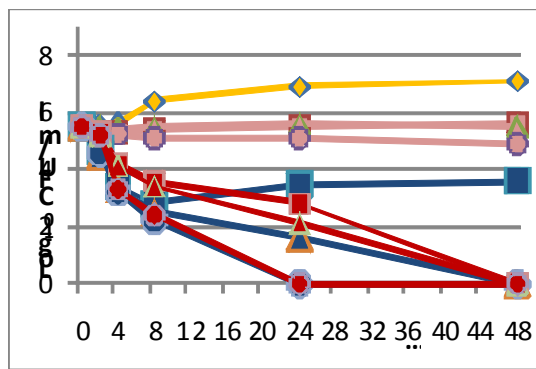
18



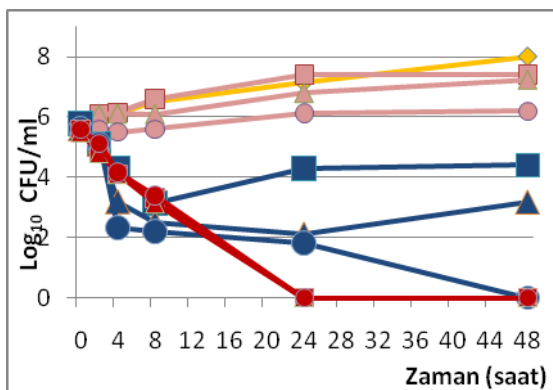
19



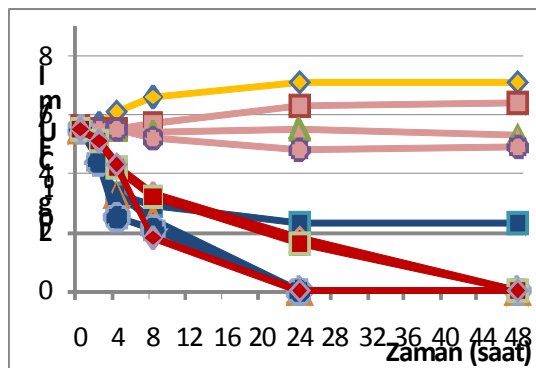
20



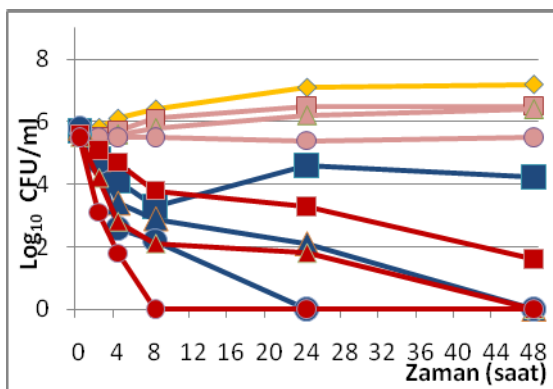
21



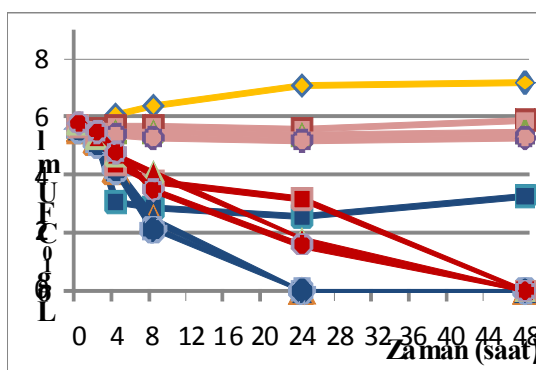
22



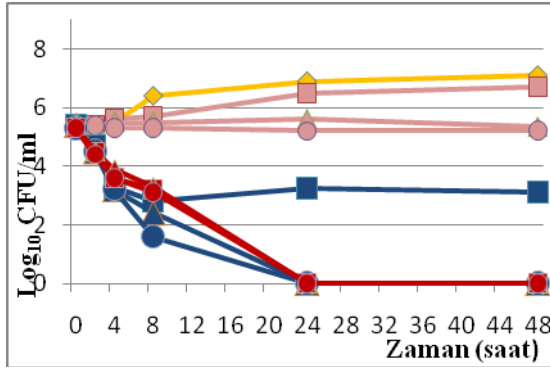
23



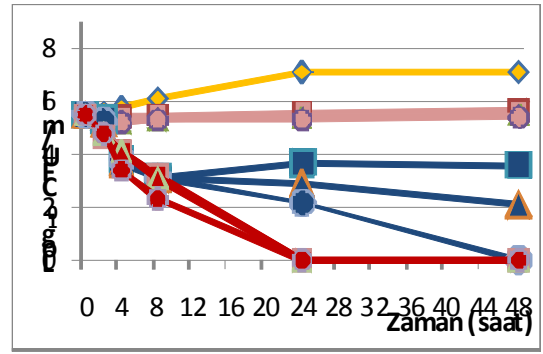
24



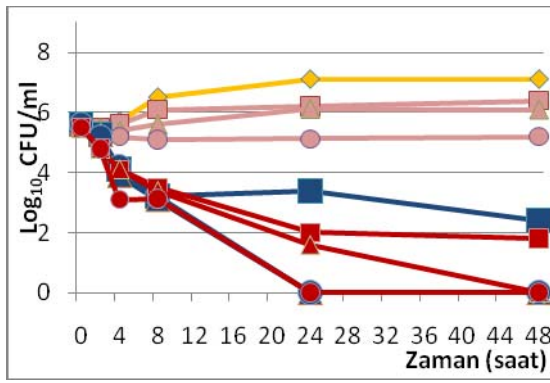
25



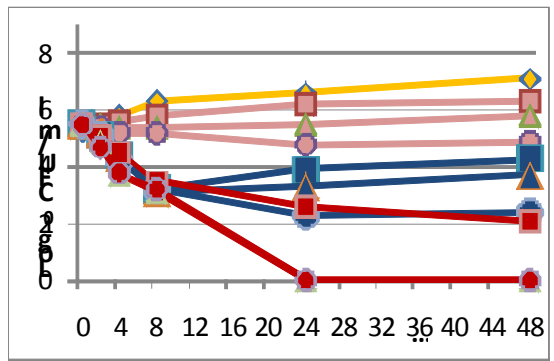
26



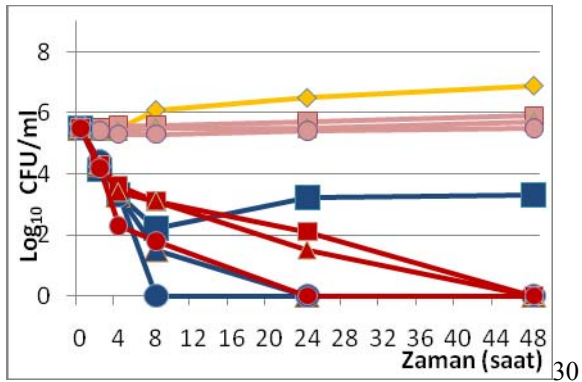
27



28



29

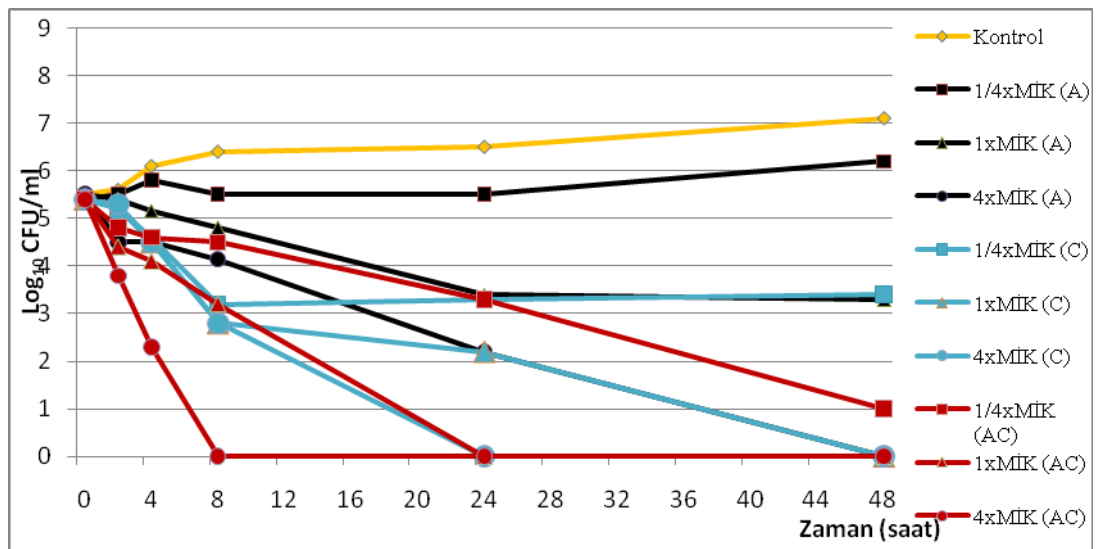


30

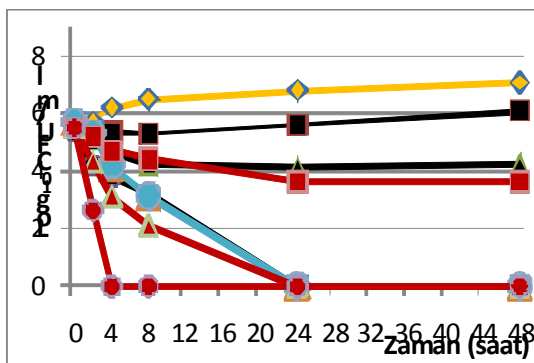
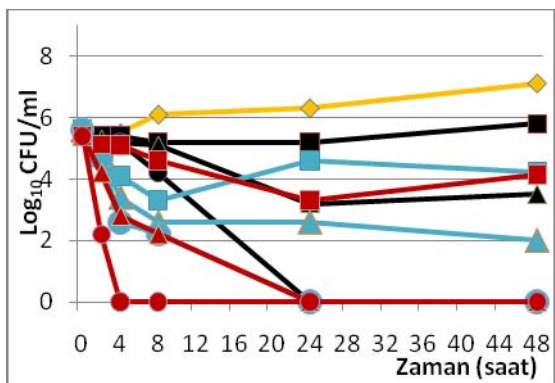
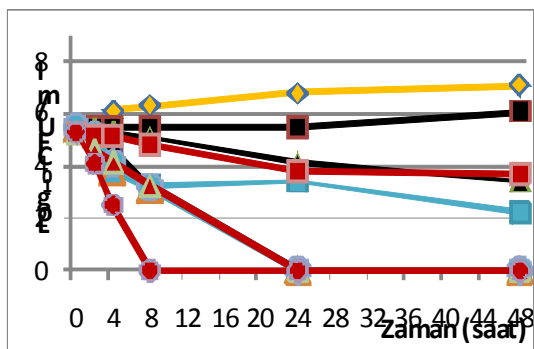
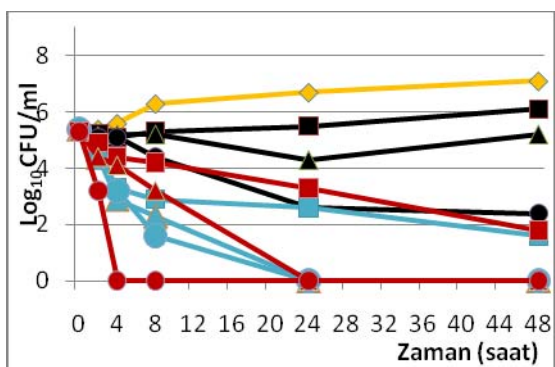
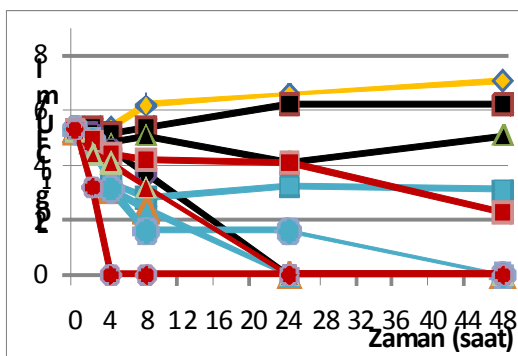
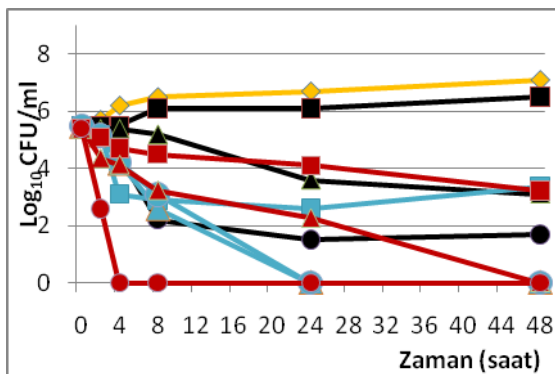
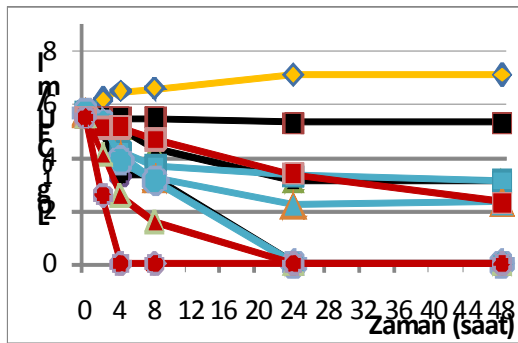
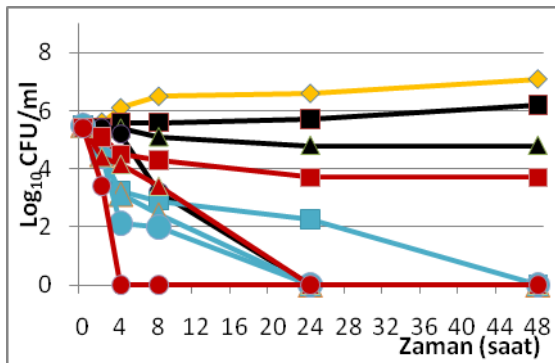
Şekil 4.4. VOR ve CAS'in tek başına ve kombinasyonda 30 *C.krusei* izolatu için time-kill eğrileri.

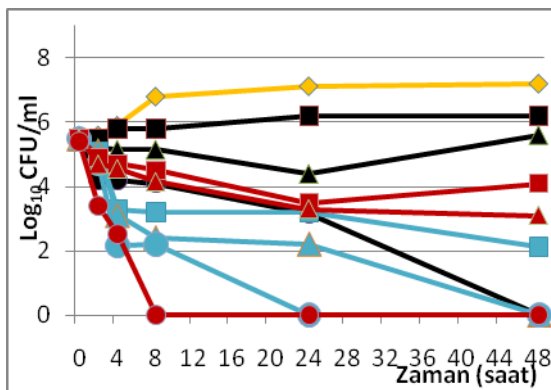
Time-kill yöntemi ile kombinasyon çalışmalarında en sık görülen etkileşme şekli her iki kombinasyon için de etkisizlik oldu (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5). Yani, izolatların çoğunluğunda ilaçlar arasında etkileşme oluşmadı. VOR-CAS kombinasyonunda büyük oranda etkisizlik gözlemlendi. Ancak, antifungallerin 1/4x MİK konsantrasyonlarındaki kombinasyonlarında 48. saatte sinerji oranı oldukça yüksek bulundu (%67). Genel olarak bu kombinasyon için ilaçların düşük konsantrasyonlarının kombinasyonu ile daha iyi sonuçların elde edildiği sonucuna varılabilir. VOR-CAS kombinasyonu için en düşük sıklıkta gözlenen etkileşme şekli antagonizma oldu ve en fazla 4xMİK konsantrasyonunda ve 24. saatte gözlemlendi (%13).

AMB-CAS kombinasyonunda da en sık gözlenen etkileşme şekli etkisizlik oldu. Kombinasyondaki ilaç konsantrasyonlarının artışı ile daha iyi sonuçlar elde edildi (doz ilişkili etki). En iyi sonuçlar 4x MİK konsantrasyonlarındaki kombinasyonlarda ve etkileşmenin ilk 4-8 saatlik döneminde gözlemlendi. 4x MİK konsantrasyonlarındaki AMB-CAS kombinasyonu ile izolatların 20'si için (%67) ilk 4 saatte ve 18'i için (%60) 8 saatte sinerjik etkileşme saptandı. Bu kombinasyon için de en az gözlenen etkileşme şekli antagonizma idi. En yüksek antagonizma oranı (%13) 1xMİK konsantrasyonlarında ve 24. saatte gözlemlendi.

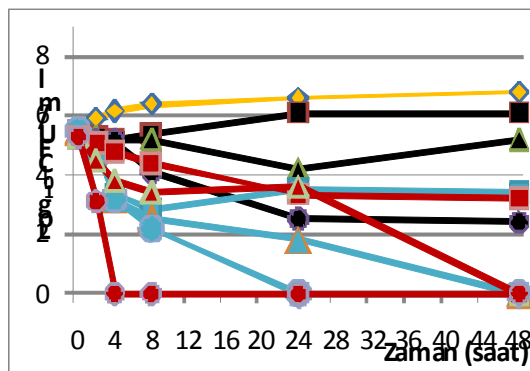


İzolat 1(A, amfoterisin B; C, kaspofungin; AC, amfoterisin B-kaspofungin)

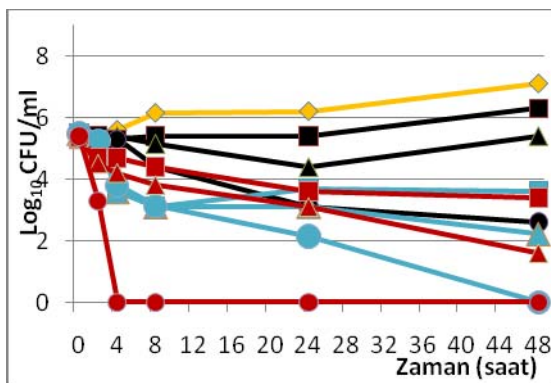




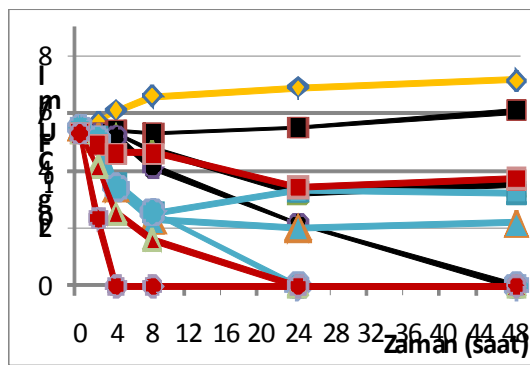
10



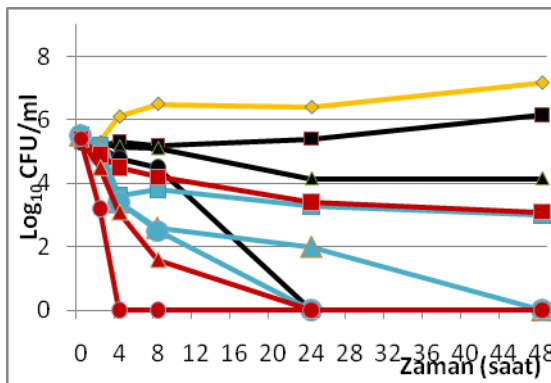
11



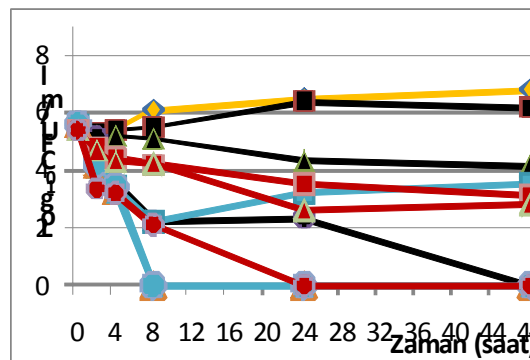
12



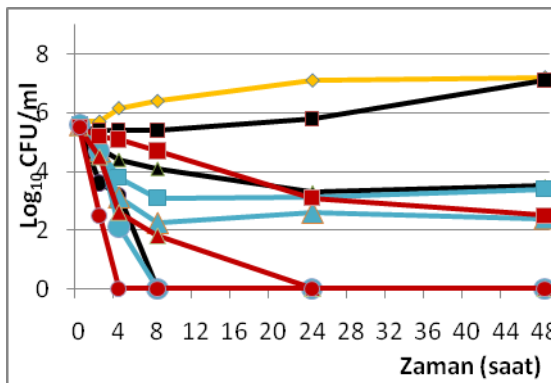
13



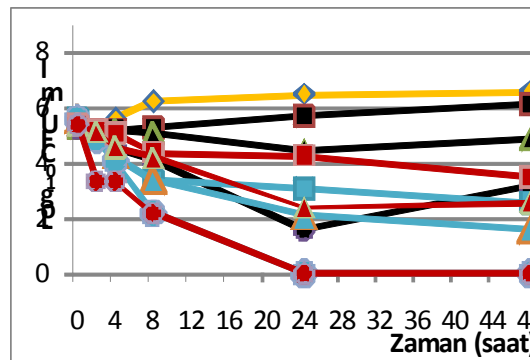
14



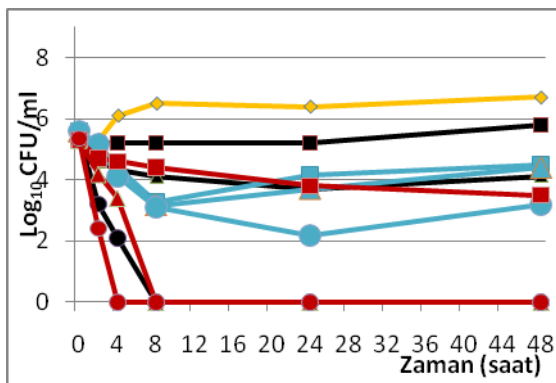
15



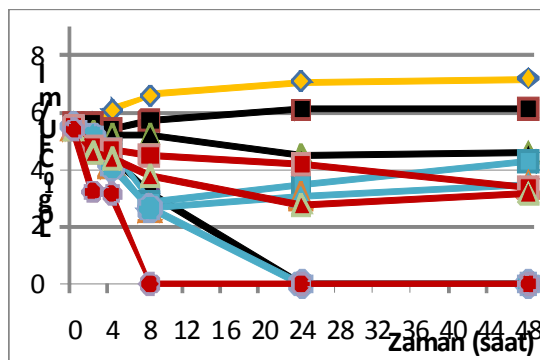
16



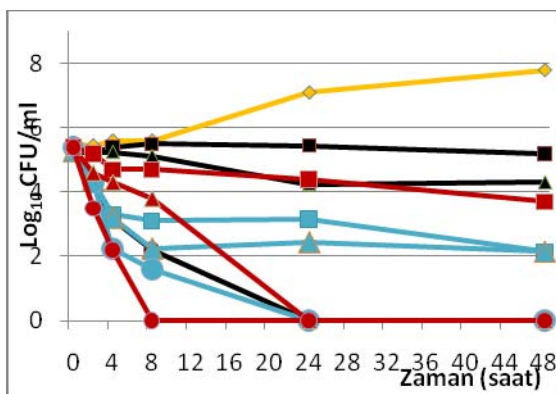
17



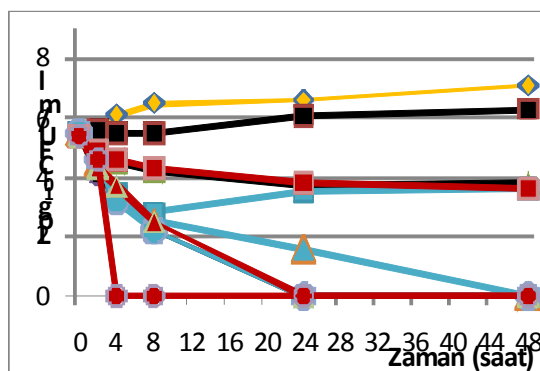
18



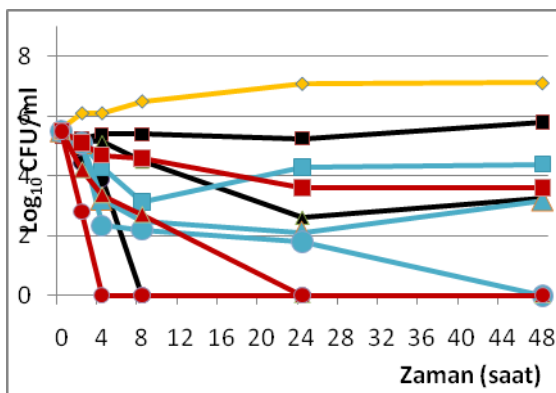
19



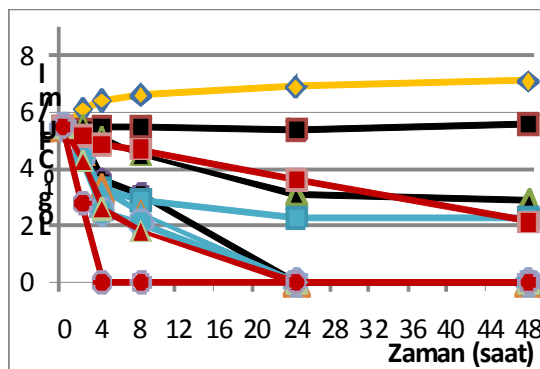
20



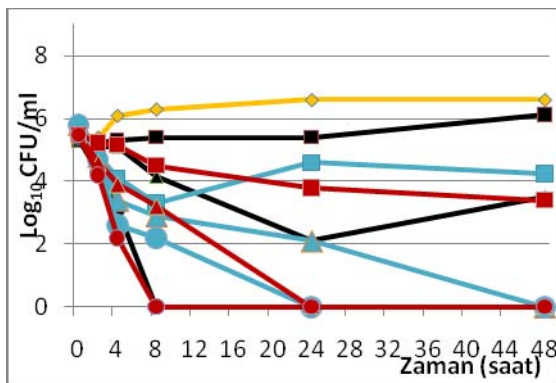
21



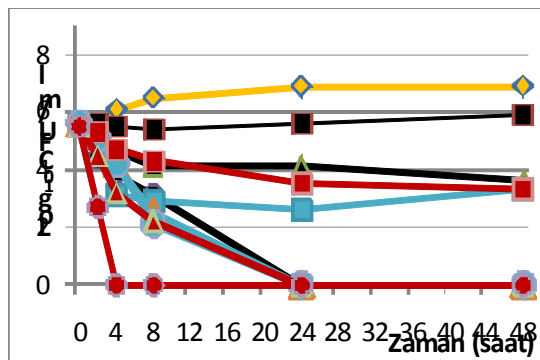
22



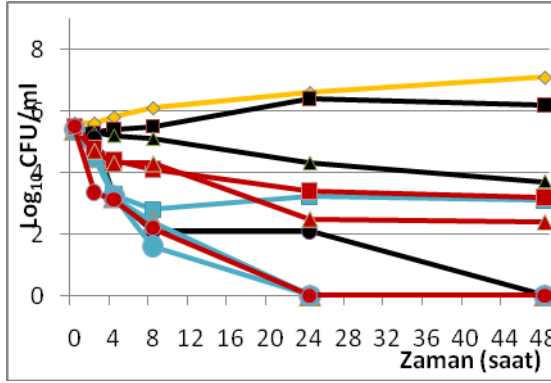
23



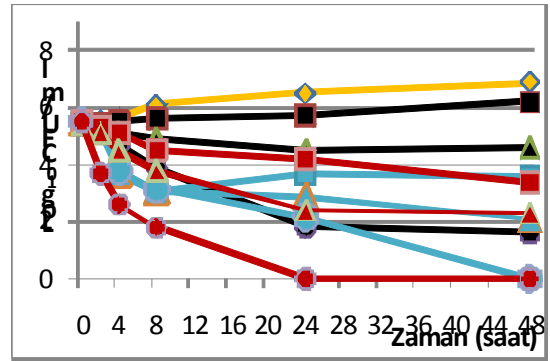
24



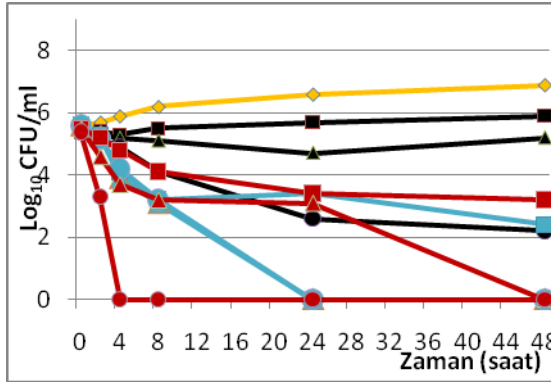
25



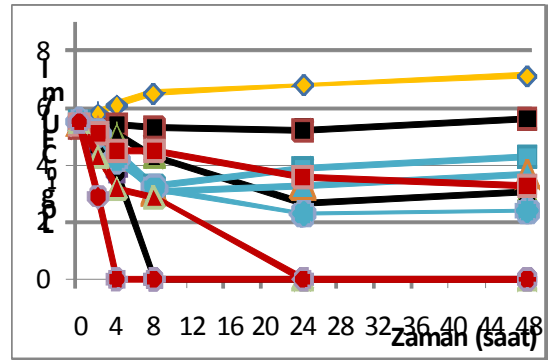
26



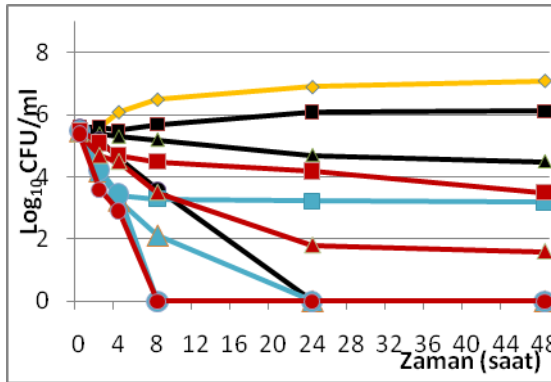
27



28



29



30

Şekil 4.5. AMB ve CAS'in tek başına ve kombinasyonda *time-kill* grafikleri

Tablo 4.4. *Time-kill* testleri ile elde edilen kombinasyon sonuçları*

İzolot No	VOR-CAS												AMB-CAS											
	1/4xMİK			1xMİK			4xMİK			1/4xMİK			1xMİK			4xMİK								
	8	24	48	4	8	24	48	4	8	24	48	8	24	48	4	8	24	48	4	8	24			
1	I	I	S	I	I	S	I	I	I	A	I	I	I	I	I	S	I	S	S	I				
2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	S	S	I			
3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	S	S	S	S	I				
4	I	I	S	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	A	I	S	S	I				
5	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	I				
6	I	I	S	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	I				
7	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I				
8	I	I	I	I	I	I	S	S	S	I	I	I	I	I	I	S	S	S	S	I				
9	I	A	A	I	I	I	A	S	S	I	I	I	A	A	I	I	I	S	S	I				
10	I	I	I	I	I	I	A	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	S	I				
11	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I				
12	I	S	S	I	I	S	S	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	S	S	S				
13	I	I	I	I	I	I	S	I	I	A	I	I	I	I	I	S	S	S	S	I				
14	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	S	S	I				
15	I	I	S	I	I	A	I	I	I	I	I	I	I	I	A	A	A	I	A	I				
16	I	I	S	I	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	S	I	I				
17	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I				
18	I	I	S	I	I	S	S	I	I	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	I				
19	I	S	S	I	I	S	S	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I				
20	I	S	S	I	I	S	S	A	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I	I	I				
21	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I				
22	I	S	S	I	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	S	I	I				
23	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I				
24	I	I	S	I	I	I	I	I	S	I	I	I	I	I	I	S	I	I	I	I				
25	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S	S	I				
26	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A	A	A	I	I	I				
27	I	S	S	I	I	S	S	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I				
28	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A	I	S	S	I	I				
29	I	I	S	I	I	S	S	I	I	S	S	I	I	I	I	S	S	S	I	I				
30	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I				

*Antifungal kombinasyonların üç farklı konsantrasyonda ve farklı saatlerde oluşturdukları etkileşme sonuçları. I, etkisiz (*Indifference*); S, sinerji; A, antagonizma.

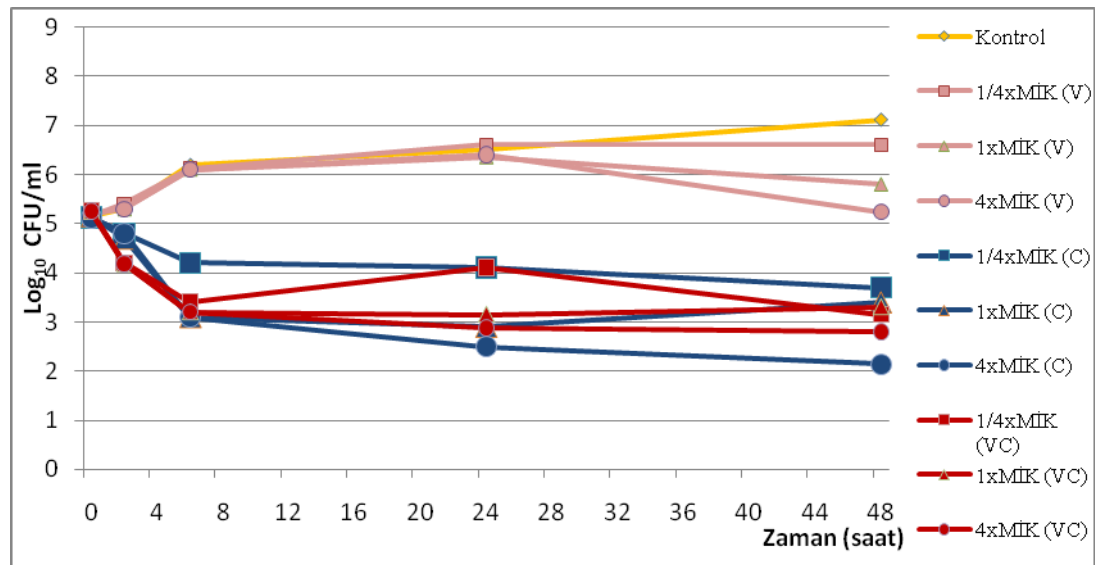
Tablo 4.5. *Time-kill* testleri ile saptanan ilaç etkileşmelerinin toplu sonuçları

Etkileşme sonucu	VOR-CAS												AMB-CAS											
	1/4xMİK			1xMİK			4xMİK			1/4xMİK			1xMİK			4xMİK								
	8	24	48	4	8	24	48	4	8	24	48	8	24	48	4	8	24	48	4	8	24			
S	-	7	20	-	-	9	10	2	3	5	2	-	-	-	1	11	9	20	18	1				
I	30	22	9	30	30	20	18	27	27	21	28	30	29	28	30	27	15	19	10	11	29			
A	-	1	1	-	-	1	2	1	-	4	-	-	1	2	2	4	2	-	1	-				

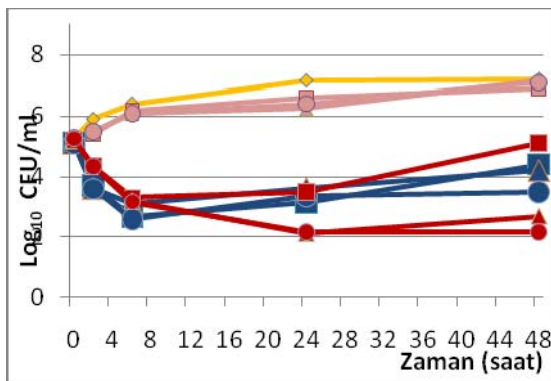
*Antifungal kombinasyonların üç farklı konsantrasyonda ve farklı saatlerde oluşturdukları etkileşme sonuçlarının toplam sayıları. I, etkisiz (*Indifference*); S, sinerji; A, antagonizma.

4.2.4. PAFE Çalışmalarının Sonuçları

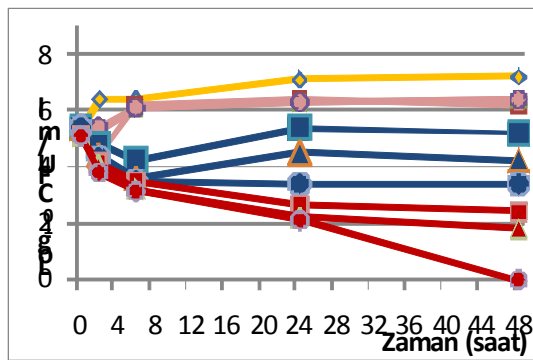
Çalışmaya alınan tüm izolatların antifungallere ve onların kombinasyonlarına 1 saatlik maruziyetlerinin ardından devam eden etkileri araştırıldı. Antifungallerin tek başına ve kombinasyondaki PAFE eğrileri oluşturuldu. Şekil 4.6 VOR-CAS, Şekil 4.7. AMB-CAS için oluşturulmuş grafikleri göstermektedir. Bu eğrilere göre PAFE, ilacın uzaklaştırılmasını takiben test kültürlerinin koloni sayısında $1\log_{10}$ 'luk artış olması için gereken süreden, kontrol kültürü koloni sayısında $1\log_{10}$ 'luk artış olması için gereken süre çıkarılarak hesaplandı.



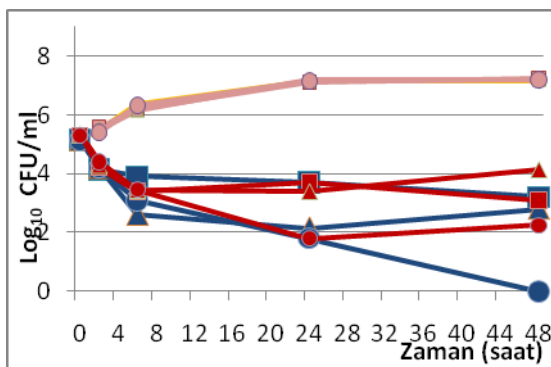
İzolat 1 (V, vorikonazol; C, kaspofungin; VC, vorikonazol-kaspofungin)



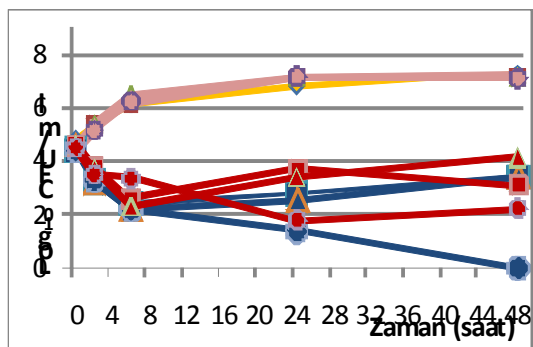
2



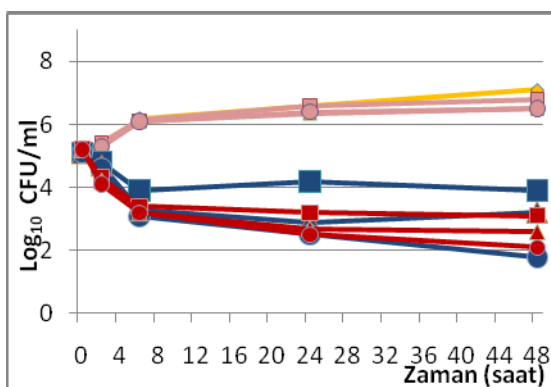
3



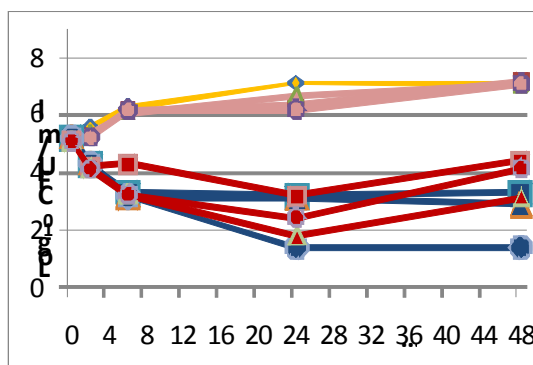
4



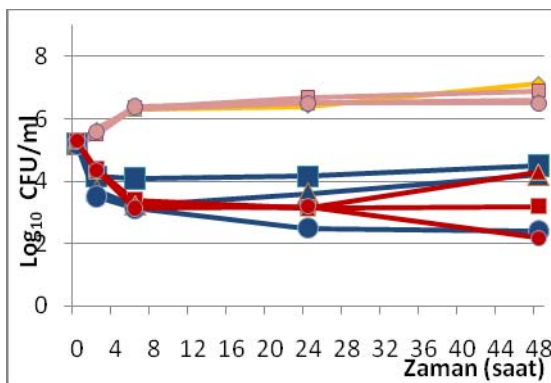
5



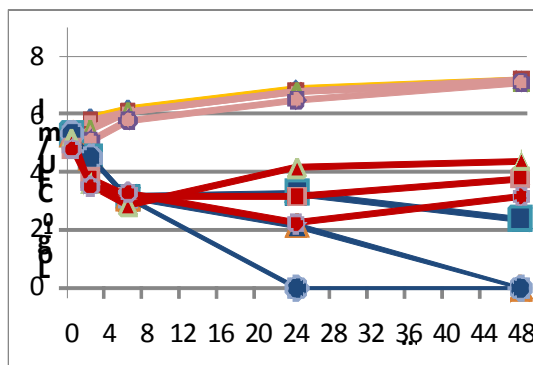
6



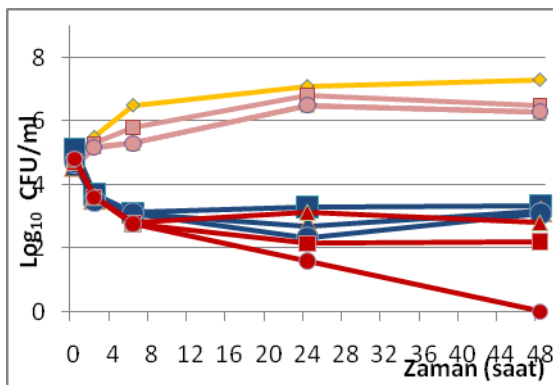
7



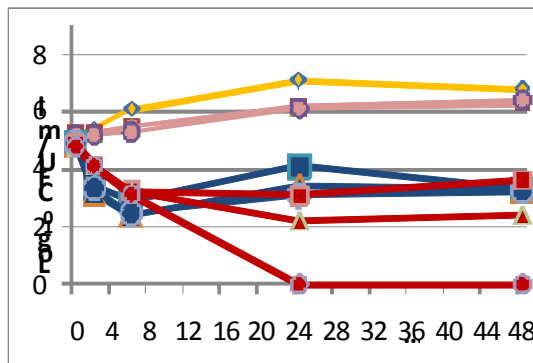
8



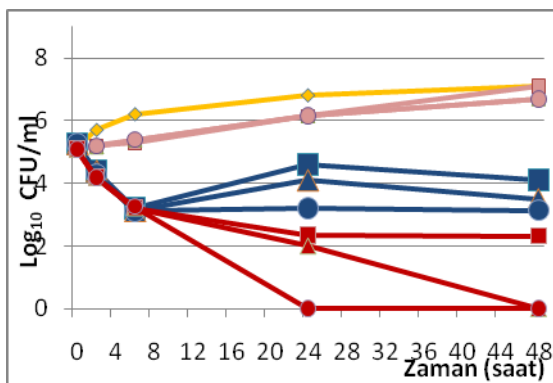
9



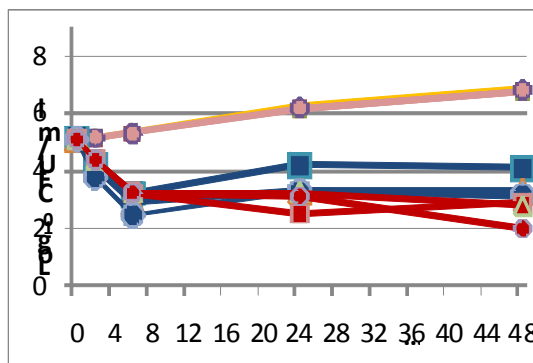
10



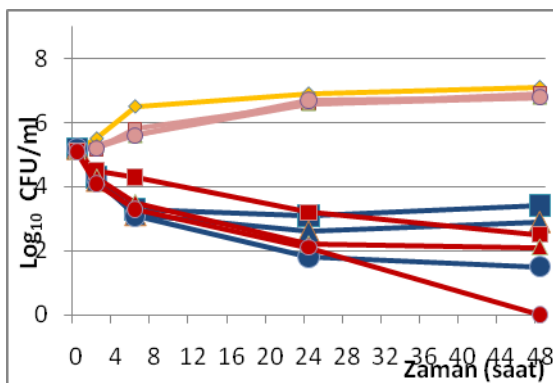
11



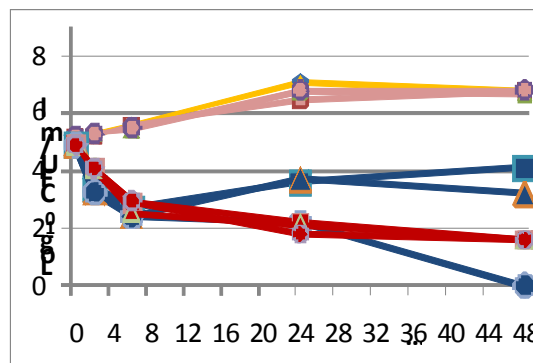
12



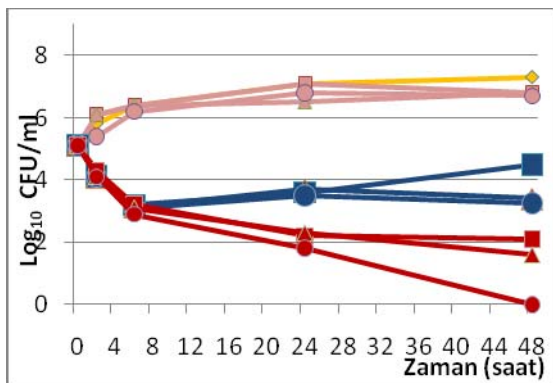
13



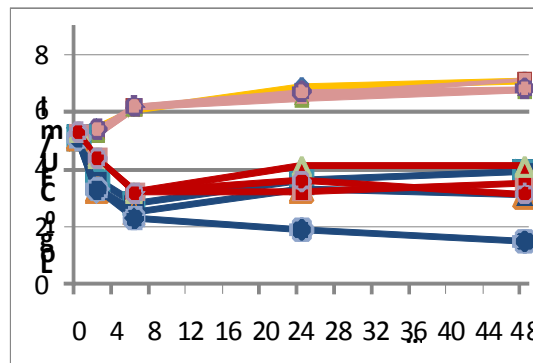
14



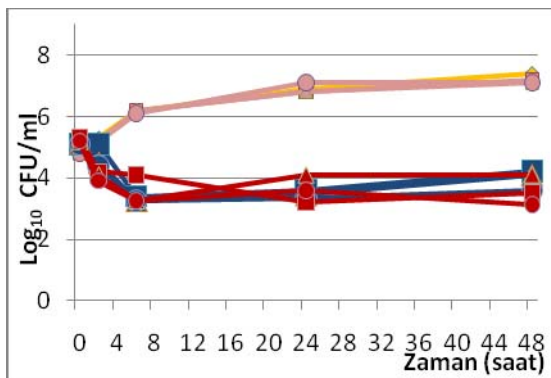
15



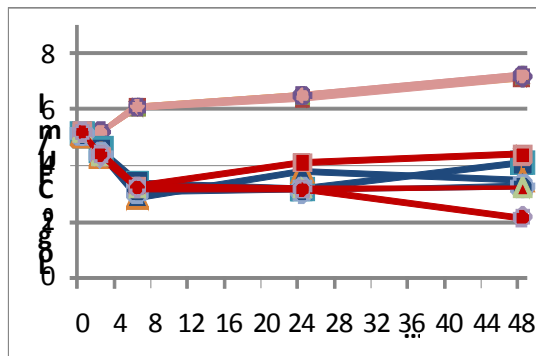
16



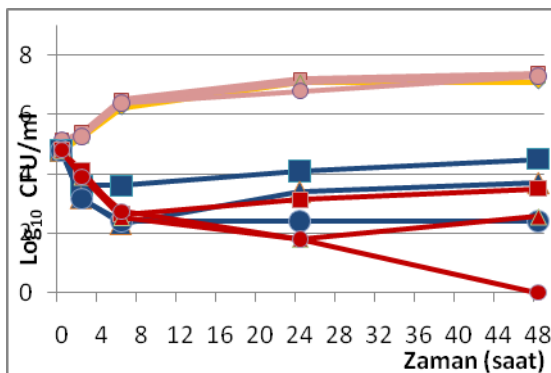
17



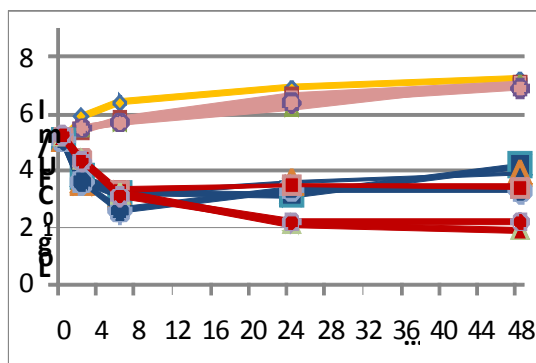
18



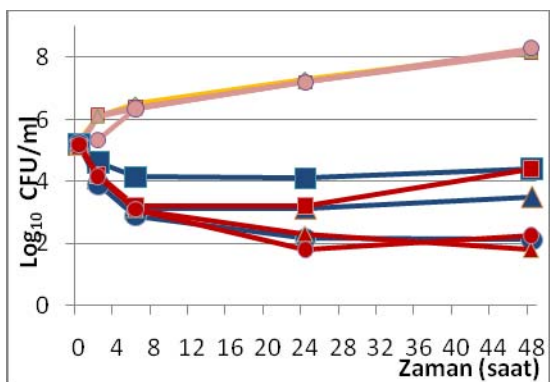
19



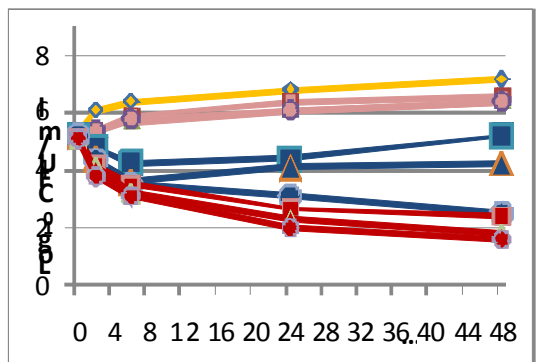
20



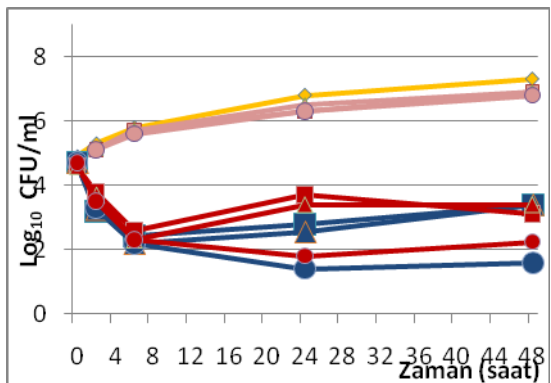
21



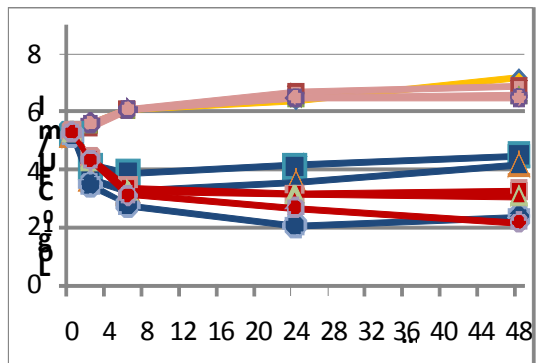
22



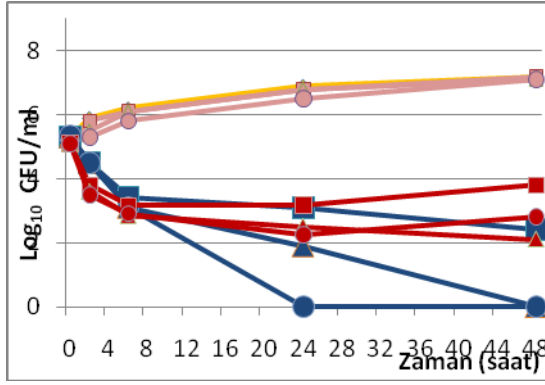
23



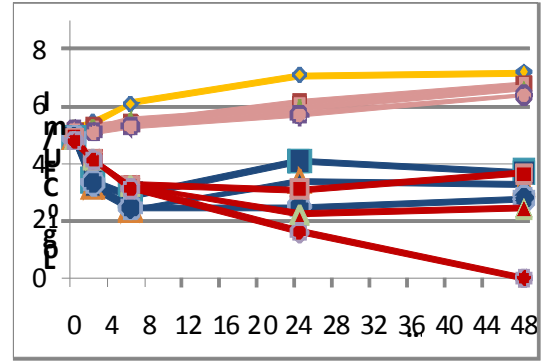
24



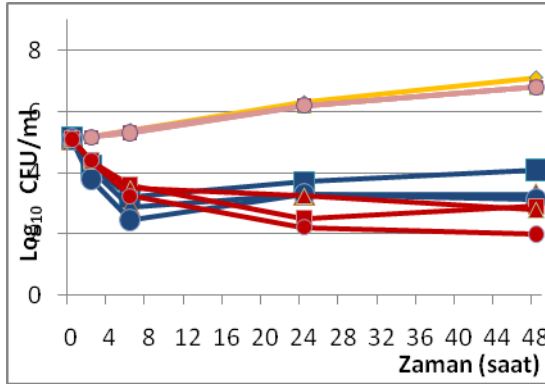
25



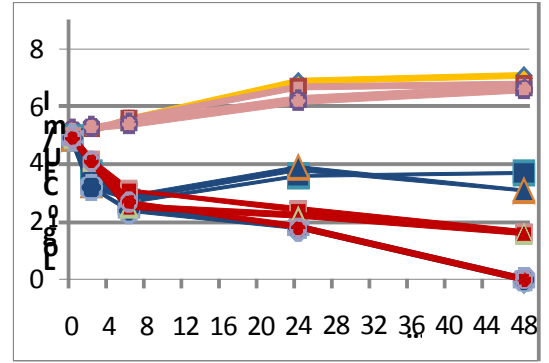
26



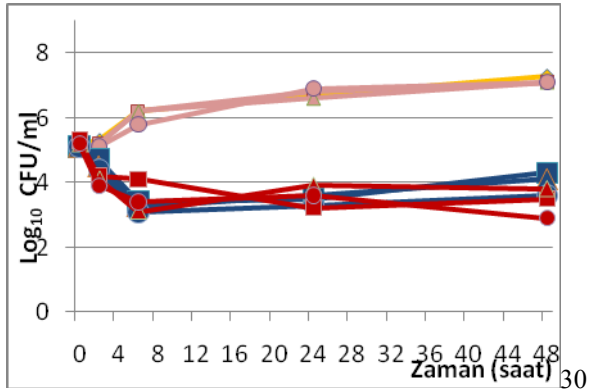
27



28

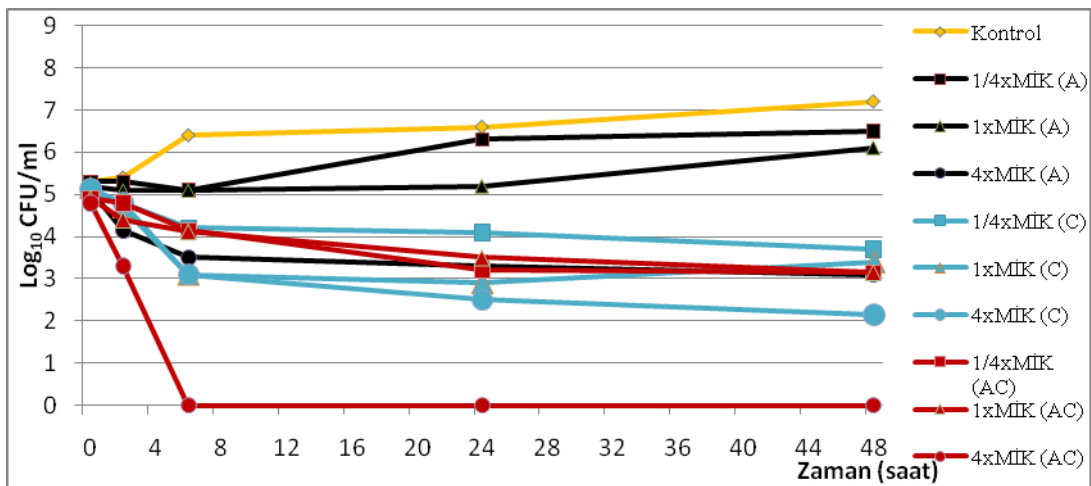


29

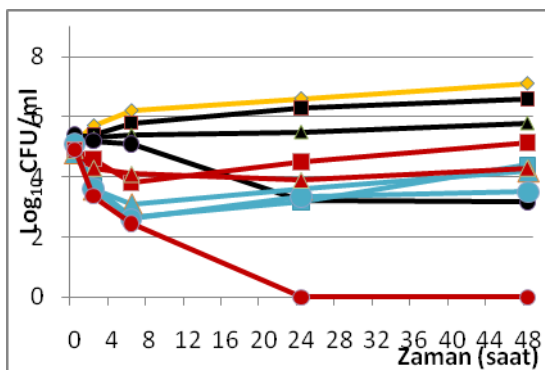


30

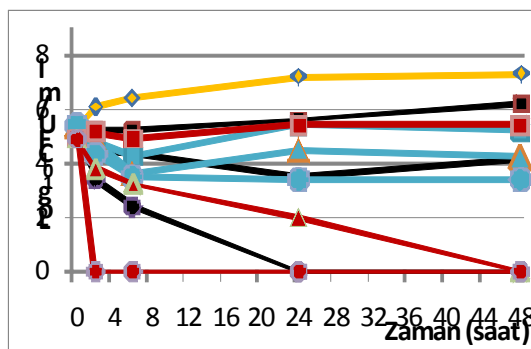
Şekil 4.6. VOR ve CAS'nin tek başına ve kombinasyonda PAFE grafikleri



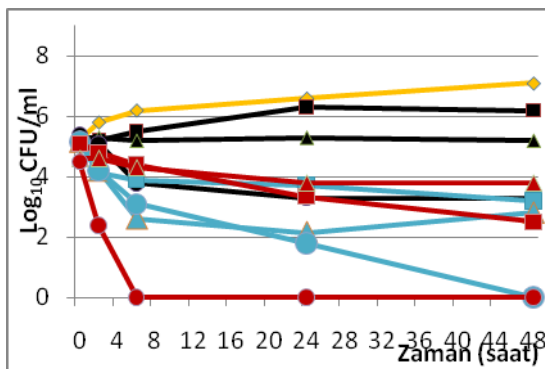
İzolat 1 (A, amfoterisin B; C, kaspofungin; AC, Amfoterisin B-kaspofungin)



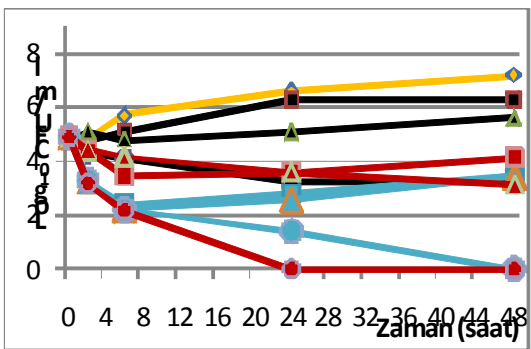
2



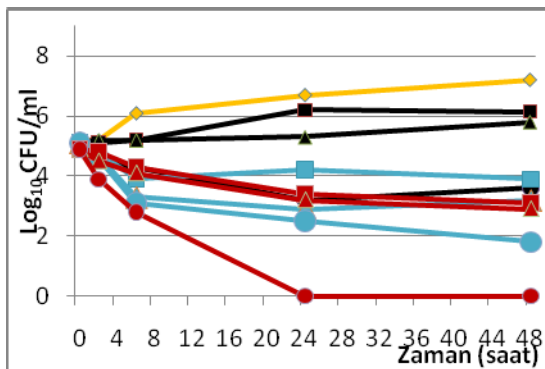
3



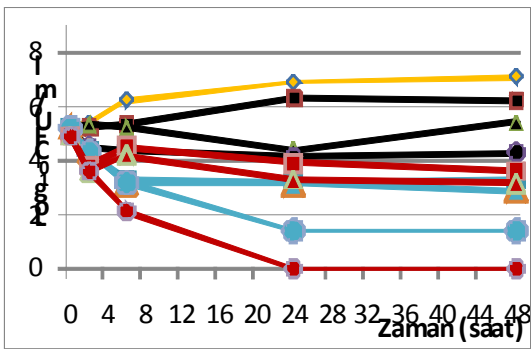
4



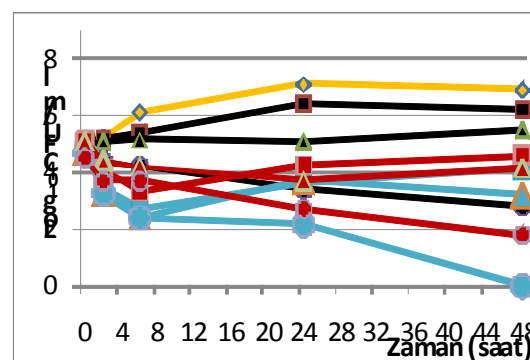
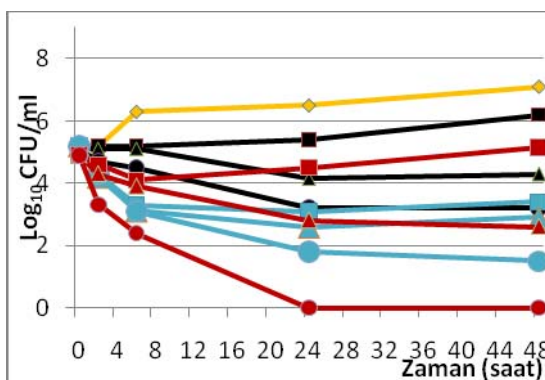
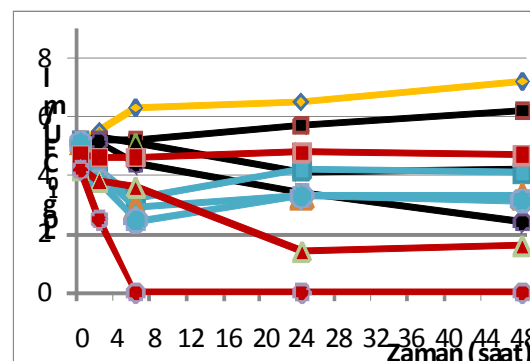
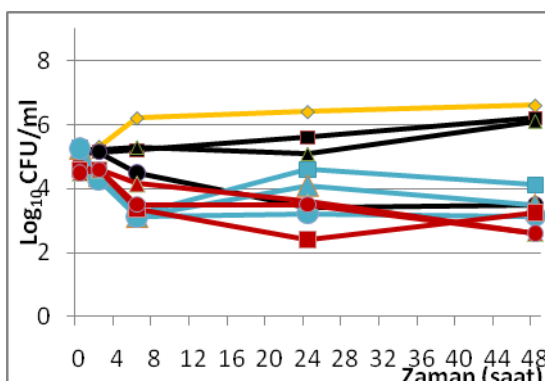
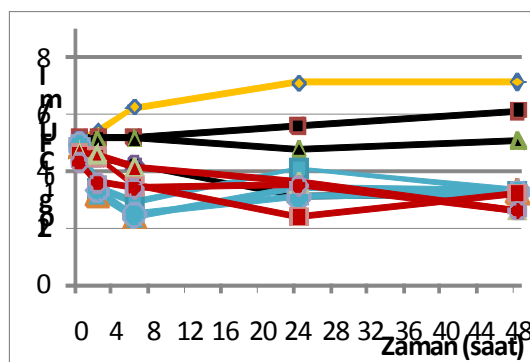
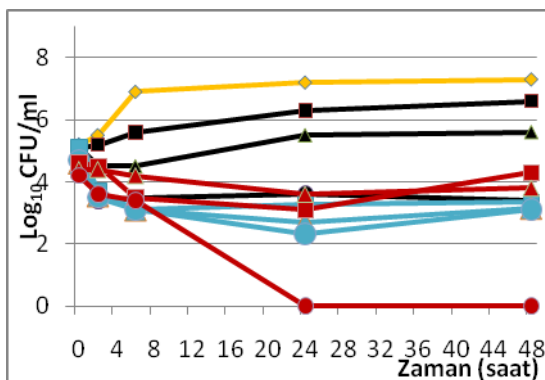
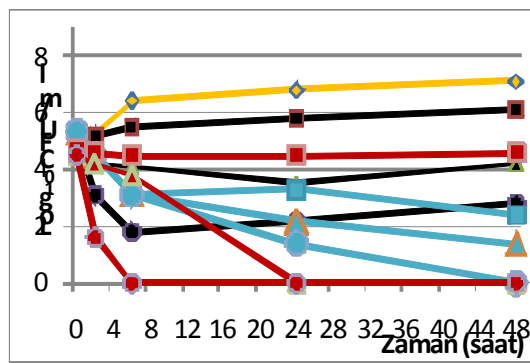
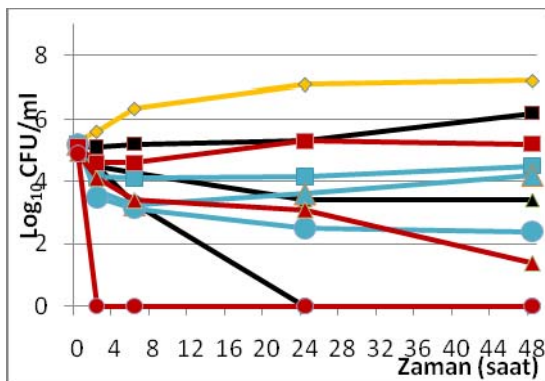
5

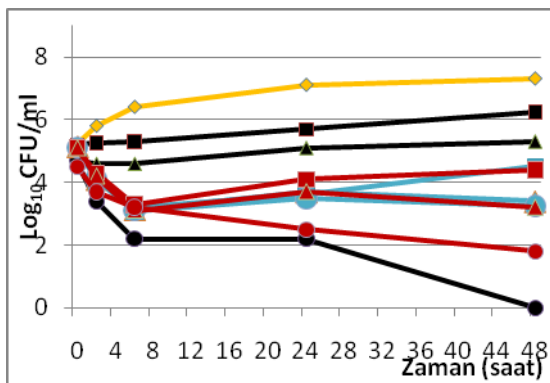


6

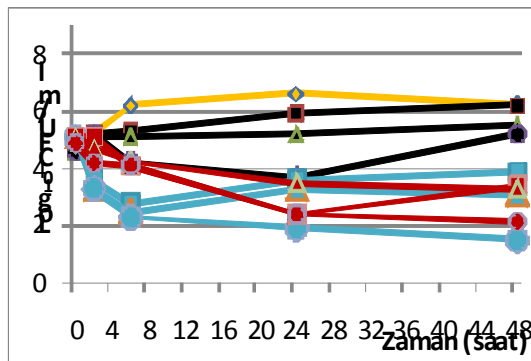


7

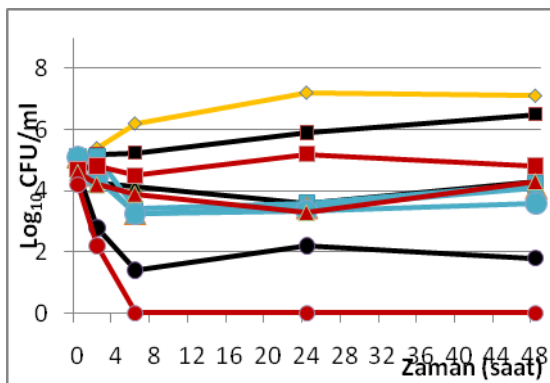




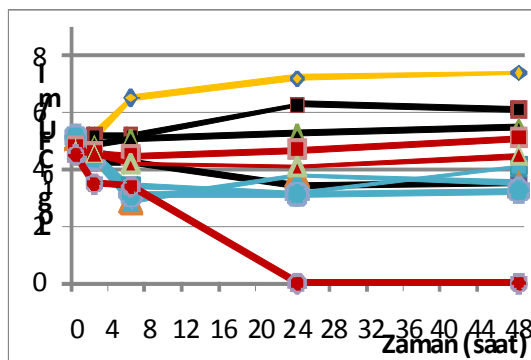
16



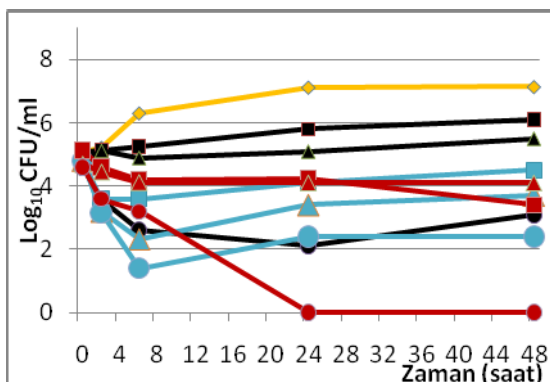
17



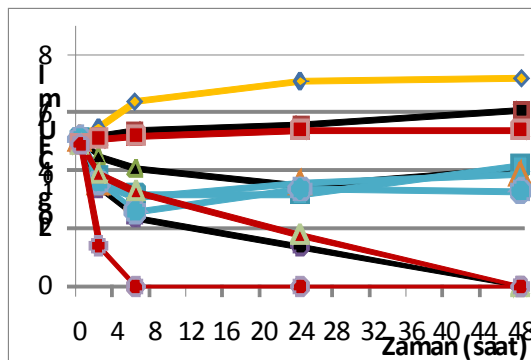
18



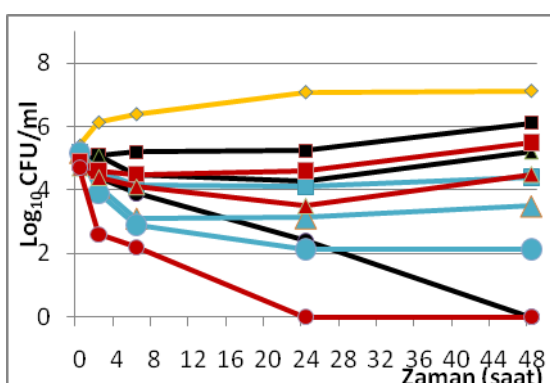
19



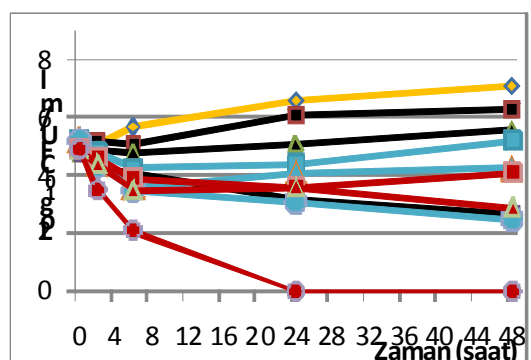
20



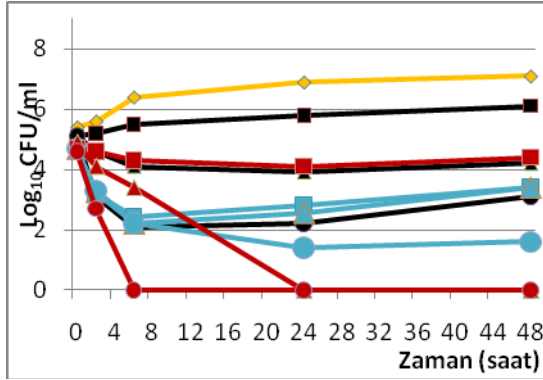
21



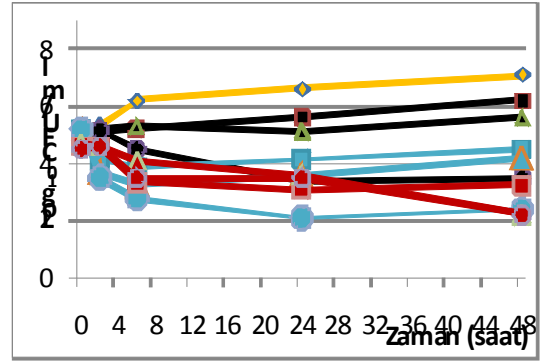
22



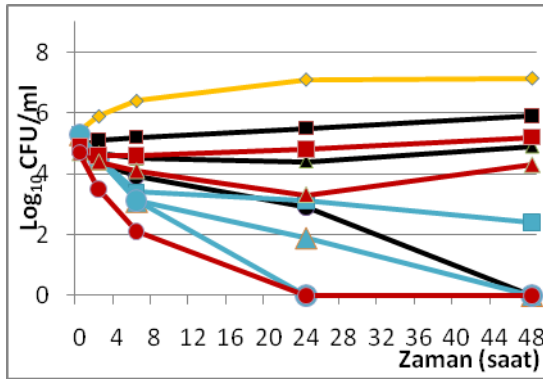
23



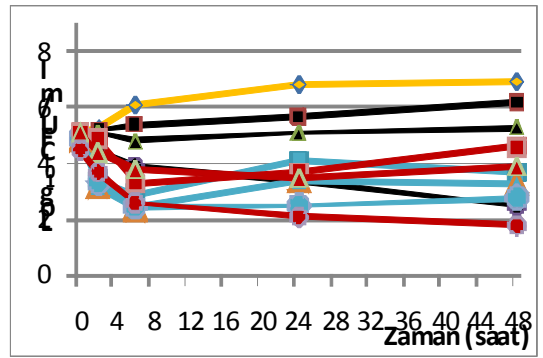
24



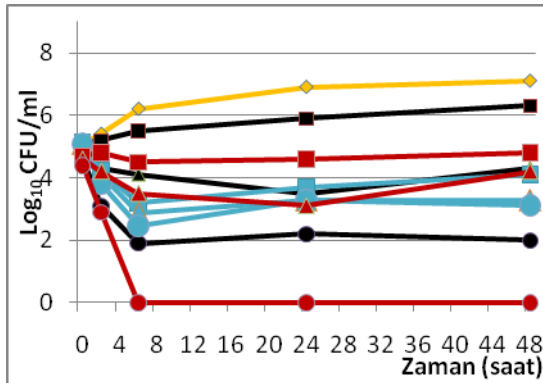
25



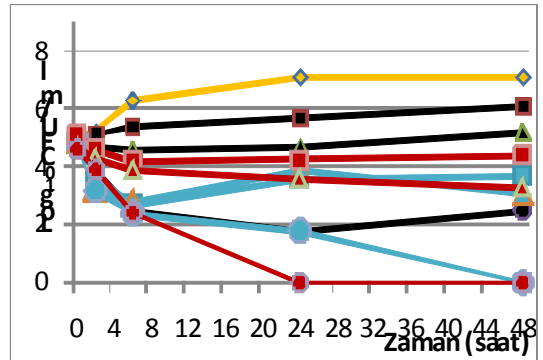
26



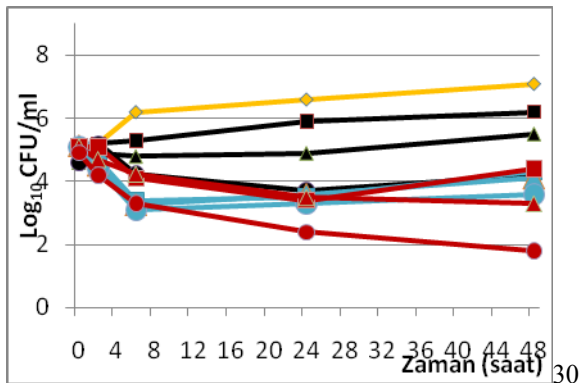
27



28



29



30

Şekil 4.7. AMB ve CAS'nin tek başına ve kombinasyonda 30 *C.krusei* izolatu için PAFE grafikleri

Tablo 4.6. Antifungallerin tek başına ve kombinasyonda PAFE süreleri

İzolant No	Farklı MİK'ler için PAFE süreleri (saat)														
	Tek başına antifungaller									Kombinasyon					
	VOR			AMB			CAS			VOR-CAS			AMB-CAS		
	1/4	1x	4x	1/4x	1x	4x	1/4x	1x	4x	1/4x	1x	4x	1/4x	1x	4x
1	0	0	0	16	42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
2	0	0	0	18	>42	>42	30	42	>42	30	>42	>42	28	>42	>42
3	0	0	0	42	>42	>42	16	18	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
4	0	0	0	18	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
5	0	0	0	10	>40	>40	44	42	>44	18	18	>44	>40	>40	>40
6	0	0	0	18	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
7	0	0	0	16	42	>42	>43	>43	>43	41	37	37	>42	>42	>42
8	0	0	0	42	>42	>42	>43	>43	>43	>43	43	>43	>42	>42	>42
9	0	0	0	42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	16	42	>42	>42	>42
10	0	0	0	18	20	>44	>45	>45	>45	>45	>45	>45	>44	>44	>44
11	0	0	0	43	>43	>43	17	19	>41	>41	>41	>41	>43	>43	>43
12	0	0	0	40	42	>42	14	18	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
13	0	0	0	42	>42	>42	18	>42	>42	>28	>28	>28	>42	>42	>42
14	0	0	0	42	>42	>42	>43	>43	>43	>43	>43	>43	>42	>42	>42
15	0	0	0	16	>42	>42	22	16	>42	>34	>34	>34	18	>42	>42
16	0	0	0	43	>43	>43	33	>43	>43	>42	>42	>42	43	>43	>43
17	0	0	0	42	>42	34	42	>42	>42	>42	>42	>42	42	>42	>42
18	0	0	0	26	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	42	>42
19	0	0	0	7	>43	>43	>42	>42	>42	34	>42	>42	>43	>43	>43
20	0	0	0	43	>43	43	>44	20	20	>44	>44	>44	>43	>43	>43
21	0	0	0	43	>43	>43	43	>43	>43	>43	>43	>43	>43	>43	>43
22	0	0	0	36	>42	>42	>44	>44	>44	44	>44	>44	42	42	>42
23	0	0	0	12	>40	>40	42	>42	>42	>42	>42	>42	>40	>40	>40
24	0	0	0	42	>42	42	41	41	>41	17	17	>41	>42	>42	>42
25	0	0	0	42	>42	>42	>42	42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42
26	0	0	0	42	>42	>42	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>42	42	>42
27	0	0	0	42	>42	>42	12	16	>40	>40	>40	>40	36	>42	>42
28	0	0	0	32	>42	>42	>28	>28	>28	>28	>28	>28	>42	42	>42
29	0	0	0	42	>42	>42	34	10	>34	>34	>34	>34	>42	>42	>42
30	0	0	0	42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	>42	42	>42	>42

PAFE çalışmalarında VOR ile ilacın hiçbir dozunda ölçülebilir post antifungal etki gözlenmedi, AMB ve CAS ile tüm konsantrasyonlar için ve tüm izolatlarda belirgin PAFE saptandı (Tablo 4.6). AMB'nin PAFE süresi konsantrasyonla ilişkiliydi ve en uzun PAFE 4x MİK konsantrasyonlarında saptandı. CAS ile de

konsantrasyon ilişkili PAFE gözlemlendi ve benzer şekilde en iyi sonuçlar 4x MİK konsantrasyonlarından elde edildi. İlaçların kombinasyonları, tek başlarına test edildiklerinde saptanan PAFE süresi üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadı. Bununla birlikte, AMB-CAS kombinasyonunun 4x MİK konsantrasyonlarında, antifungallerin uzaklaştırılmasından sonra etkileri tüm izolatlar için >42 saat devam etti ve genellikle VOR-CAS kombinasyonuna göre daha uzun PAFE süreleri elde edildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Farklı MİK konsantrasyonları için genel PAFE sonuçları

Antifungaller	PAFE süresi (Kalıcı PAFE gözlenen izolat sayısı) (saat)		
	1/4x	1x	4x
AMB	7-43 (0)	20->43 (26)	30->44 (27)
CAS	12->45 (16)	10->45 (19)	20->45 (29)
VOR-CAS	17->45 (24)	16->45 (25)	37->45 (28)
AMB-CAS	18->44 (23)	42->44 (26)	>42 (30)

Çalışmamızda antifungal kombinasyonları değerlendirmek için üç farklı yöntem kullandık. Buna göre Etest (her iki yöntem) ve time-kill kombinasyon testleri arasında VOR-CAS kombinasyonu için 30 izolatın 20'sinde (%67) ve AMB-CAS kombinasyonu için 15'inde (%50) uyum saptadık. Etest yöntemi ile AMB-CAS kombinasyonunda iki izolat için saptanan antagonizma time-kill testinde sinerjik etkileşme ile sonuçlandı. Bu iki izolat dışında hem Etest hem de disk difüzyon yöntemleri ile sinerjik ya da antagonistik etkileşmeler tespit edilemedi. Uyum sadece etkisiz sonuçlanan etkileşimlerde gözlemlendi.

Tablo 4.8. Etest ve *time-kill* kombinasyon sonuçlarının karşılaştırılması

İzolot no	VOR-CAS			AMB-CAS		
	Etest-1	Etest-2	<i>Time-kill</i> *	Etest-1	Etest-2	<i>Time-kill</i> *
1	I	I	S	I	I	S
2	I	I	I	I	I	I
3	I	I	I	I	I	S
4	I	I	I	I	I	A
5	I	I	I	I	I	I
6	I	I	S	I	I	I
7	I	I	I	I	I	I
8	I	I	I	A	I	S
9	I	I	I	I	I	I
10	I	I	I	I	I	I
11	I	I	I	I	I	I
12	I	I	S	I	I	I
13	I	I	I	I	I	S
14	I	I	I	I	I	S
15	I	I	A	I	I	A
16	I	I	I	I	I	S
17	I	I	I	I	I	I
18	I	I	S	A	I	S
19	I	I	S	I	I	I
20	I	I	S	I	I	S
21	I	I	I	I	I	I
22	I	I	S	I	I	S
23	I	I	I	I	I	I
24	I	I	I	I	I	S
25	I	I	I	I	I	I
26	I	I	I	I	I	A
27	I	I	S	I	I	I
28	I	I	I	I	I	A
29	I	I	S	I	I	S
30	I	I	I	I	I	I

*1x MİK konsantrasyonunda ve 24 saatteki *time-kill* sonuçları. I, etkisiz (indifference); S, sinerji; A, antagonizma.

5. TARTIŞMA

Özellikle immün düşük konaklar için sorun oluşturan *Candida* enfeksiyonları uzamış hastanede kalış süresi, yüksek tedavi maliyeti ve anlamlı mortalite oranlarıyla sonuçlanmaktadır. Birçok hastanede *C.glabrata* ve *C.krusei* gibi *C.albicans* dışı *Candida* türlerinin sıklığında artış olduğu bildirilmektedir (113, 114). *C.krusei* kolonizasyonu ya da enfeksiyonlarında gözlenen artıştan profilaktik FLU kullanımı sorumlu tutulmaktadır. Profilaktik FLU kullanımı yaygın *Candida* türlerini baskılayarak, daha az patojen, doğal dirençli ya da daha az duyarlı *Candida* türlerinin üremesine neden olabilmektedir. FLU ve AMB gibi yaygın kullanılan antifungallere doğal dirençli ya da sonradan direnç geliştiren fungal patojenler söz konusu olduğunda tedavide ekinokandinler ve yeni azoller gibi alternatif antifungallerin kullanımı gereklidir (115). Bu ilaçların etkinliği, biyoyararlılığı ve doku penetrasyonu çeşitli küf ve mayalar için değerlendirilmiştir (116).

Şimdilerde, farklı etki mekanizmalarına sahip yeni antifungallerin geliştirilmesi antifungal kombinasyon tedavilerine olan ilgiyi arttırmıştır. Sınırlı klinik bilgiye rağmen, özellikle küf enfeksiyonlarının yüksek mortalitesi, mevcut antifungallerin nispeten sınırlı etkinliği gibi nedenlerle tedavisi zor fungal enfeksiyonlarda polyen, geniş spektrumlu azoller ve ekinokandinleri içeren kombinasyonların kullanımı gündeme gelmektedir (83).

Antifungal kombinasyonların etkinliğini değerlendiren birçok çalışma bulunmakla birlikte, klinik hasta izolatlarını içeren testler nadirdir. İlaç etkileşimlerini değerlendiren bu testler, özellikle yeni ilaçların yüksek maliyeti ve muhtemel antagonistik etkileşimleri düşünüldüğünde, kombinasyon tedavisinin seçiminde yardımcı olabilir (6). Bu amaçla genellikle 96 kuyucuklu mikropalakların kullanıldığı *checkerboard* (dama tahtası) mikrodilüsyon yöntemi tercih edilmektedir. Daha az sıklıkla *time-kill* testi ve Etest yöntemlerini kullanan çalışmalar da bulunmaktadır. Bahsi geçen yöntemlerin her birinin kendine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (117, 118). Literatürde, antifungal kombinasyonların değerlendirildiği çok merkezli çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır ve henüz bu amaçla standardize edilmiş ve önerilen bir yöntem bulunmamaktadır.

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında etken spektrumu zamanla değişiklik göstermekte ve özellikle FLU'e dirençli türlerin sıklığı artmaktadır. *C.krusei* doğal

FLU direnci nedeniyle özellikle FLU profilaksisi alan hastalar için sorun oluşturan bir *Candida* türüdür. Bu nedenle çalışmamızda klinik *C.krusei* izolatlarının VOR, AMB ve CAS'e duyarlılığını, tek başına ve ikili kombinasyonlarında değerlendirdik.

BMD testi ile VOR için izolatların MİK değerleri 0.25-0.50 µg/ml arasındaydı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.50 µg/ml, MFK ise 1.0-16.0 µg/ml arasında değişti. MFK değerleri MİK değerlerine göre oldukça yüksekti. Bu muhtemelen VOR'un *Candida*'lar üzerinde fungostatik etki göstermesinden kaynaklanmaktaydı. Buna göre çalışmaya alınan *C.krusei* izolatlarının tümü VOR'e duyarlı olarak saptandı. AMB için referans BMD testi ile MİK sonuçları 1.0-2.0 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 1.0 µg/ml ve 2.0 µg/ml şeklinde tespit edildi. AMB mayalar üzerine genellikle fungusidal etki gösterdiğinden MFK değerleri genellikle MİK'e eşit ya da 2-4 kat fazlaydı. AMB için kesinleşmiş MİK sınır değerleri bulunmamakla birlikte, yaygın kullanılan sınır değerlere göre izolatlarımızın %50'si AMB'ye duyarlıydı. CAS için BMD testi MİK sonuçları 0.25-1.0 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ sırasıyla 0.5 ve 1.0 µg/ml arasında gerçekleşti. CAS MFK değerleri de genellikle MİK değerlerine yakındı. Bunun muhtemel nedeni, ekinokandinlerin *Candida* hücre duvarı sentezini engelleyerek başlangıçta oluşturdukları fungostatik etkinin ardından hücre ölümüne neden olmalarıydı.

Klinik küf ve maya izolatlarını içeren büyük bir mantar grubu için azoller ve AMB'nin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, tüm mayalar için VOR ile 0.031-0.5 µg/ml, AMB ile 1.0-1.0 µg/ml ve 189 *C.krusei* izolatı için VOR ile 0.25-0.50 ve AMB ile 1.0-2.0 µg/ml rapor edilmiştir (119). Fothergill ve ark. (100) *C.krusei* izolatları için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini AMB ile 0.25-0.50 µg/ml, CAS ile 0.25-0.25 µg/ml ve VOR ile 0.5-1.0 µg/ml bildirmektedirler. Kandan izole edilmiş 20 *C.krusei* izolatına karşı ekinokandinlerin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında Canton ve ark. (120), CAS için MİK aralığını 0.5-2 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 1 ve 2 µg/ml, MFK aralığını ise 1-64 µg/ml olarak rapor etmektedirler. Başka bir çalışmalarında da *C.krusei* ATCC 6258 standart suşu için VOR MİK aralığını 0,12-1 µg/ml, AMB MİK aralığını 1-4 µg/ml ve CAS MİK aralığını 0.25-1 µg/ml olarak bildirmektedirler (99). Yakın zamanda yayınlanmış bir çalışmada da 109 *C.krusei* izolatı için VOR MİK aralığı ≤0,008-2 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin sırasıyla 0.25-0.50 µg/ml olduğu ve VOR direncinin sadece bir izolatta saptandığı; AMB MİK aralığı 0.5-2 µg/ml, MİK₅₀

ve MİK₉₀ değerleri 1 ve 2 µg/ml; CAS MİK aralığı ≤0.008-0.5 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.12 ve 0.25 µg/ml olarak bildirilmektedir (121).

Bu raporlara göre çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçların literatürle uyumlu olduğu, VOR ve CAS'in *C.krusei* izolatlarına karşı in vitro şartlarda oldukça etkili olduğu söylenebilir. Ancak AMB için elde edilen yüksek MİK değerleri dikkat çekicidir. AMB şiddetli sistemik fungal enfeksiyonlarda hala en sık kullanılan antifungal ajan olmakla birlikte, bizim çalışmamızda da gözlenen azalmış duyarlılık, yakın zamanda bu antifungalın kullanımını sınırlayıcı önemli bir sorun olarak görünmektedir.

Etest yöntemi ile *C.krusei* izolatlarının VOR MİK değerleri 0.094-0.5 µg/ml arasında elde edildi. İzolatların tamamı için Etest yöntemi ile elde edilen MİK değerleri, referans BMD yöntemi ile elde edilen MİK değerlerinin ±2 dilüsyon aralığında yer aldı ve bu antifungal için Etest ile BMD arasındaki uyum oranı %100 hesaplandı. AMB için de Etest ve BMD arasında %100 uyum elde edildi ve AMB Etest MİK'leri 0.5-2.0 µg/ml tespit edildi. Oysa CAS için %83 oranında (30 izolatın 25'inde) uyum tespit edildi ve genellikle Etest MİK'leri (0.047-0.50 µg/ml) daha düşük olma eğilimindeydi.

Etest ile elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yayınlanmış benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumluydu. Maxwell ve ark. (122) sık karşılaşılmayan *Candida* türleri için VOR ve FLU duyarlılığını değerlendirmede Etestin kullanılabilirliğini araştırmışlar ve *C.krusei* (n=118) ve VOR için Etest ve BMD arasında %99 oranında uyum tespit etmişlerdir. Farklı türleri içeren 212 *Candida* izolatı ve 7 antifungal için Etest ve ticari bir duyarlılık sisteminin referans BMD ile karşılaştırıldığı bir yayında bütün izolatlar ve antifungaller için Etest ile referans yöntem arasında ≥%92 uyum, *C.krusei* ve VOR, AMB, CAS için %100 uyum rapor edilmiştir (97). Fleck ve ark. (123) *Candida*'ların 5 antifungal ajana duyarlılığını Etest ve referans mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirmişler, Etest yöntemiyle *C.krusei* izolatları için VOR, AMB, CAS MİK aralıklarını ile sırasıyla 0.25-4, 0.25-2, 0.5-2 µg/ml saptamışlar ve tüm *Candida* türlerinin bu antifungallere duyarlılığını belirlemede iki yöntem arasında sırasıyla %89, 96, 98 uyum oranları bildirmişlerdir. Bu iki yöntem için Negri ve ark. (106) AMB ile %83 uyum bildirmekteyken, Dannaoui ve ark. (124) referans yöntem olarak EUCAST standartlarını kullandıkları çalışmalarında AMB ile %75, VOR ile %87 uyum rapor etmektedirler.

Etest ve referans mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyum mantarın türü, inkübasyon süresi gibi değişkenlere bağlı olarak çalışmalar arasında farklılık gösterebilmekle birlikte, genellikle kabul edilebilir sınırların üzerindedir (92). Etestin son derece pratik ve uygulamasının kolay olması, birçok farklı mantar türü için kullanılabilmesi, mevcut antifungallerin çoğu için ticari olarak bulunması, MİK değerlerini referans yöntemle oldukça yüksek uyumlulukla saptayabilmesi gibi avantajları olduğundan, antifungal duyarlılığı değerlendirmede kullanışlı bir yöntem olduğunu, bu nedenle referans BMD testine güvenilir bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

Antifungal duyarlılığı değerlendirmede referans yöntem sıvı dilüsyon (mikro/makro) testleridir. Ayrıca ticari olarak geliştirilmiş Etestlerle de oldukça uyumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Bunun yanında, CLSI tarafından antifungal duyarlılığı değerlendirmek için yakın zamanda disk difüzyon testi geliştirilmiş ve FLU ve VOR için standardize edilmiştir (95). Nispeten ucuz, pratik ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilir olması bu yöntemin en önemli avantajlarıdır. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile izolatların tamamında zon çapları VOR ile ≥ 18 mm, AMB ile ≥ 18 mm ve caspofungin için ≥ 25 mm tespit edilmiştir. Bu durumda VOR ve CAS'e izolatların tamamı duyarlı idi, AMB için ise izolatların hiçbirisi için direnç gözlenmedi.

Disk difüzyon testinin güvenilirliğini değerlendiren birçok çalışmada genellikle referans yöntemle yüksek uyum oranları bildirilmektedir. Pfaller ve ark. (125) 54 katılımcı merkezle yürüttükleri çalışmalarında VOR için disk difüzyon testi ile referans yöntem arasında genel olarak % 94 – 99 ve *C.krusei* izolatları için % 89 – 99 oranında uyum saptadıklarını bildirmektedirler. Başka bir çalışmalarında ise 91 merkezden 14 farklı *Candida* türünü içeren toplam 8702 izolattan oluşan çalışmalarında VOR için %99 uyum bildirmişlerdir (126). Daha küçük izolat grubu içeren bir çalışmada ise *Candida* genusu içindeki türlerden bağımsız olarak disk difüzyon ve referans test arasındaki uyum %95 olarak bildirilmiştir (127).

CAS ve AMB ile disk difüzyon testini içeren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Milici ve ark. (128) CAS için disk difüzyon ve referans BMD arasındaki genel uyum oranını %77 olarak bildirmiş olmakla birlikte, bu karşılaştırmada 2 µg CAS içeren diskler kullanılmış ve zon çapları ≥ 12 mm ise duyarlı, ≤ 11 mm ise dirençli kabul edilmiştir. Espinel-Ingroff ve ark. (107), toplam 110 *Candida* spp. ve *Cryptococcus*

neoformans izolatının 5 antifungal ajana duyarlılığını değerlendirmek için ticari bir sistem, disk difüzyon ve referans yöntemi karşılaştırmışlar ve referans yöntemle disk difüzyon arasındaki uyumu VOR için %96, CAS için % 97–100, AMB için %100 oranında bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada CAS ve AMB için MİK ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ (disk zon çapları CAS için ≥ 14 mm, AMB için ≥ 15 mm) ise duyarlı ve MİK ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (her iki ilaç için de disk zon çapları ≤ 13 mm) ise dirençli kriterleri kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Negri ve ark. (106) 100 μg 'lık AMB diskleri ile 70 *Candida* izolatı için %100 uyum bildirmekteyler.

CAS ve AMB disk difüzyon testi için kesin sınır değerler bulunmamakla birlikte, verilen çalışmalarda kullanılmış sınır değerlere göre bizim izolatlarımız bu iki antifungale duyarlıdır. Bu sonuçlar bahsedilen çalışmaların sonuçları ile benzerdir. Antifungal duyarlılığı belirlemede disk difüzyon testi için VOR ve FLU dışında diğer antifungaller için henüz standardizasyon oluşturulamamıştır. Şimdilik, VOR ve FLU için kullanılan disk difüzyon testinin diğer antifungaller için de standardize edildiğinde oldukça yaygın kullanım alanı bulacağını düşünmekteyiz.

Antifungal duyarlılığı değerlendirmede *time-kill* testleri ile elde edilen veriler, fungusidal etkinin hızı ve genişliği, farmakodinamik özellikler (konsantrasyonla etki ve post antifungal etki arasındaki ilişki), birlikte verilen ilaçlar arasındaki sinerji ya da antagonizma hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu bilgiler antifungal ajanlar ile onların mantarlar üzerindeki etkileri arasında bulunan dinamik ilişkinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu yüzden *time-kill* testleri antimikrobiyallerin etkilerini değerlendirmede vazgeçilmez araçlar olmuşlardır (101). Diğer duyarlılık test yöntemleri ile sadece bir zaman noktasındaki duyarlılık sonuçları görülebilmekteyken, *time-kill* testleri ile ilaçların zaman içindeki davranışları saptanabilmektedir. Ancak *time-kill* testleri oldukça zahmetli ve zaman alıcı testlerdir. Bu nedenle rutin kullanımları söz konusu değildir.

Çalışmamızda üç antifungal ajanın, üç farklı konsantrasyonda (1/4x MİK, 1x MİK, 4x MİK) farmakodinamik etkilerini *time-kill* testleri ile 30 klinik *C.krusei* izolatına karşı değerlendirdik. VOR konsantrasyonla ilişkili olmaksızın bütün izolatlara karşı fungostatik aktivite sergiledi. İlaç konsantrasyonundaki değişiklik mikroorganizma sayısında farkedilebilir bir değişiklik oluşturmadı. Oysa AMB ve CAS tamamen doz ilişkili etki sergiledi. AMB 1/4x MİK ve 1x MİK konsantrasyonlarında fungostatik, 4x MİK konsantrasyonunda fungusidal aktivite

gösterdi. CAS ise ilk 8 saatte tüm konsantrasyonlarında hızlı bir öldürme etkisi göstererek, 1/4x MİK'de fungustatik, 1 ve 4x MİK'de fungusidal etki ortaya koydu.

Azollerin hem *C.albicans* hem de diğer *Candida* türleri için konsantrasyondan bağımsız gösterdiği fungustatik etki daha önceki çalışmalarla da desteklenmektedir (109, 129). Ancak Canton ve ark. (130) VOR ile posakonazolü *C.krusei* izolatları için değerlendirdikleri çalışmalarında, bu ilaçların konsantrasyon bağımlı etkiye sahip olduğunu, koloni sayısındaki azalmanın $\geq 0,5$ mg/l VOR konsantrasyonlarında başladığını, koloni sayısındaki %90'lık bir azalmanın 32 mg/l VOR ile başarılabilirdiğini ve %99'luk öldürme hızına hiç ulaşamadığını bildirmektedirler. Bizim sonuçlarımıza göre VOR fungal üremeyi engellemekle birlikte, belirgin fungal ölüme neden olmamıştır. Ancak biz MİK üzerinde sadece 4 katlık konsantrasyonda (4x MİK) çalıştık. Konsantrasyon ilişkili etkiyi ve belirgin öldürme hızını saptayamamış olmamız nispeten düşük VOR konsantrasyonu ile çalışmış olmamızdan kaynaklanıyor olabilir.

Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Canton ve ark. (120), *C.krusei* izolatlarında CAS ile birlikte üç ekinokandin için de ilk 6 saatlik dönemde konsantrasyon ilişkisiz hızlı bir fungusidal aktivitenin ardından konsantrasyonla ilişkili olarak öldürme hızında yavaşlama ya da tekrar üreme gözlemlendiğini bildirmektedirler. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, çalışmamızda CAS'in 1/4x MİK konsantrasyonlarında izolatların %70'inde (n=21) başlangıçtaki hızlı fungusidal etkinin ardından tekrar üreme gözlemlendi. *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* izolatlarına CAS'in etkinliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, MİK'in üzerindeki konsantrasyonlarda antifungalın fungal hücre sayısında anlamlı azalmalara neden olduğu, ancak bu azalmaların fungusidal etki boyutuna ulaşmadığı ve CAS'in test durumlarına ve izolatlara bağlı olarak fungusidal ya da fungustatik aktivite sergileyebildiği vurgulanmaktadır (131).

Genellikle CAS ile ilgili MİK ve üzerindeki konsantrasyonlarda hızlı fungusidal etkiden söz eden yayınların yanında, Barchiesi ve ark. (132), *C.glabrata*'ya karşı 1/2-4x MİK konsantrasyonlarında fungusidal bir aktivite tespit etmediklerini bildirmektedirler. Çalışmalarda, CAS ve değişik *Candida* türleri ile saptanan sonuçlar arasında farklılıklar olduğu gözlemlendi. Bütün çalışmalar için ortak özellik, başlangıçta (ilk 6-8 saatte) gözlenen yüksek fungal öldürme hızı ve ardından gözlenen konsantrasyon ilişkili etkiydi. Bu nedenle, CAS'in etkenin türüne, izolata,

test durumlarına göre fungustatik ya da fungusidal etki gösterebildiği, ilacın dozunun artışı ile aktivitesinin arttırılabileceği ve hızlı etki göstermesinin ilaca önemli bir üstünlük sağlayabileceği düşünüldü.

Canton ve ark. (133) tarafından 7 *Candida* türünün hem standart hem de klinik izolatlarına karşı AMB'nin öldürme kinetikleri ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. *C.albicans* ve *C.dublinsiensis* için 2x MİK konsantrasyonlarında çok hızlı (2-4 saat) fungusidal aktivite gözlenirken, *C.parapsilosis* için 4x MİK ile 48 saatte, *C.glabrata* için 4x MİK ile 24 saatte fungusidal etkiye ulaşılabildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada en düşük öldürme hızı *C.tropicalis* ve *C.krusei* için elde edilmiştir. AMB, *C.tropicalis* ve *C.krusei*'ye karşı düşük bir fungusidal aktiviteye sahipti ve bu etkinin elde edilebilmesi için AMB'nin 4x MİK konsantrasyonu ile 40-48 saatlik bir süre gerekiyordu. Ancak *C.krusei* referans izolatı için AMB'nin 4x MİK konsantrasyonu ile sadece 13 saatte fungusidal etkinin gözlemlendiği bildirilmektedir.

Bizim çalışmamızda da AMB'nin 4x MİK altındaki konsantrasyonlarında 48 saatlik takip süresi boyunca fungusidal etki saptanmadı; 1/4x MİK konsantrasyonlarında belirgin bir öldürme etkisi gözlenmezken, 1x MİK konsantrasyonlarında gözlenen öldürme hızı hiçbir izolat için fungusidal etki sınırına ulaşamadı. 4xMİK konsantrasyonunda ise izolatların 9'unda ilk 8 saatte, 16'sında 24 saatte ve 5'inde 48 saatte fungusidal aktivite saptandı. Canton ve ark. (133)'nin bildirdiğinden farklı olarak biz, izolatların %83'ünde ilk 24 saatte fungusidal etkiyi gözledik. Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilmiş 5 *C.krusei* ile çalışılmıştı, oysa biz farklı kaynaklardan elde edilmiş 30 izolatı değerlendirdik. AMB'nin farmakodinamiğini değerlendiren benzer çalışmalarda da farklı *Candida* türleri için fungusidal etkinin $\geq 4x$ MİK konsantrasyonlarında saptandığı bilgisi bizim sonuçlarımızı desteklemektedir (109, 129). Sonuç olarak AMB tür ilişkili olarak yüksek konsantrasyonlarda yavaş bir fungusidal aktivite sergilemekte ve etkisi izolatlar arasında farklılık gösterebilmektedir.

Çalışmamızda yer alan üç antifungalın PAFE'lerini değerlendiren sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Bu tür değerlendirmeler ilaçların özellikle doz aralıklarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Ekinokandinlerin antifungal etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışmada AMB ile CAS'in konsantrasyon ilişkili uzun PAFE sergiledikleri bildirilmektedir (90). Her üç antifungalın da yer aldığı

başka bir farmakodinamik değerlendirmede, nadir kan kültürü izolatlarında VOR için ölçülebilir bir PAFE saptanmazken, CAS sadece bir *C.lusitaniae* izolatı için doz ilişkisiz PAFE ve AMB tüm izolatlar için anlamlı bir doz ilişkili PAFE sergilemiştir (109). Chryssanthou ve ark. (134) otomatize sistemle üç farklı *Candida* standart suşuna karşı AMB ile belirgin konsantrasyon ilişkili artış gösteren PAFE bildirmektedirler. Clancy ve ark. (131)'nin çalışmalarında ise CAS'nin 4 ve 16x MİK konsantrasyonlarında, 24 saat boyunca devam eden belirgin PAFE saptanmış ve bu sonuçların sistemik kandidozun bir hayvan modelinde CAS için elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu bildirilmiştir (135).

Bizim PAFE çalışmamızın sonuçları genel olarak bu çalışmalarla uyumluydu. *C.krusei* izolatlarına karşı VOR ile ilacın test edilen üç konsantrasyonu için de herhangi bir PAFE saptanmadı. Genellikle VOR'ün tüm konsantrasyonlarında ilaçsız kontrol ile benzer bir üreme eğrisi elde edildi. Oysa hem AMB hem de CAS ile konsantrasyon ilişkili ve uzun süreli PAFE saptandı. AMB'nin 1/4x MİK konsantrasyonunda ilacın uzaklaştırılması sonrasında koloni sayısında belirgin bir azalma izlenmemekle birlikte, $1\log_{10}$ 'luk artışın oluşması için 7-43 saat gerekti. 1x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarında PAFE daha belirgindi ve izolatların sırasıyla 26 ve 27'sinde bu etki takip süresince kalıcıydı. CAS daha belirgin ve daha uzun süreli bir PAFE sergiledi. Genel olarak bizim sonuçlarımız literatürde bildirilenlere göre her iki ilaç için de daha uzundu. Ancak bu tür çalışmalarda genellikle az sayıda izolat çalışmaya alınmakta ve 24 saatlik takip yapılmaktadır. Bizim sonuçlarımızdaki farklılığın izolat sayımızın fazla olmasından ve takip süremizin uzun olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Ayrıca, bilgilerimize göre *C.krusei* izolatlarını ve bu antifungalleri içeren benzer başka bir rapor olmadığından sonuçlarımız birebir karşılaştırılamamıştır.

Bu bulguların klinik önemi kesin olmamakla birlikte, küçük total miktarlardaki AMB ve CAS ile fungusidal etkinin sağlanabilmesi için kısa intervalli bölünmüş dozlar yerine, uzun intervallerle yüksek dozların uygulanmasının daha yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

Dirençli fungal türlerin sıklığındaki artışla birlikte, mevcut antifungal bileşiklerdeki artış, yeni antifungallerin kombine kullanımı gibi, daha iyi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ilgiyi artırmıştır. Örneğin, fungal hücre duvarı esas bileşeni 1,3- β -D-glukan sentezini inhibe ederek etki gösteren

ekinokandinler antifungal kombinasyon için ilave bir hedef sağlamaktadır. Ekinokandinlerle fungal hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, teorik olarak diğer bir antifungalın hücreye penetrasyonunu arttırabilir. Bu nedenle ekinokandinlerle kombinasyon çalışmaları ümit verici görünmektedir (118).

Referans *C.krusei* izolatu ile 8 farklı laboratuvarda AMB, VOR, CAS ve posakonazolün ikili kombinasyonlarının checkerboard yöntemi ile değerlendirildiği çalışmada, bütün kombinasyonlarda elde edilen MİK'lerin ilaçların tek başına değerlendirildiğinde elde edilen MİK'lerden daha düşük olduğu, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indekslerine göre tüm kombinasyonlar arasındaki ilişkinin etkisizlik olduğu ve antagonizmanın görülmediği bildirilmektedir (6). Røling ve ark. (108) 4 *Candida* türü ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı 2 ekinokandinle FLU kombinasyonunu *time-kill* yöntemi ile değerlendirmiş ve ekinokandin-azol kombinasyonunun antagonistik sonuçlanmadığını ve gelecekte klinik çalışmalar için ümit verici olduğunu bildirmişlerdir.

FLU dirençli 3 *C.glabrata* izolatına karşı CAS-VOR kombinasyonunun değerlendirildiği başka bir çalışmada bu kombinasyonun ciddi *C.glabrata* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği vurgulanmaktadır (136). *Aspergillus fumigatus* ile enfekte edilmiş deney hayvanlarında VOR-CAS kombinasyonu ile tedavinin belirgin bir sinerjik etkileşim ortaya koymamakla birlikte, ilaçların tek başına etkilerine göre biraz daha etkili olduğu bildirilmektedir (137). Graybill ve ark. (138) CAS ile FLU kombinasyonunun etkinliğini in vivo hayvan deneyi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, böbrek fungal yükünde ilaçların tek başına sağladıklarından daha fazla bir azalma sağlanmadığını bildirmektedirler.

İnvaziv *Aspergillus* enfeksiyonlarının tedavilerine yönelik yayınların derlendiği bir analizde AMB-CAS kombinasyonu için 3 çalışmada sinerji ve 1 çalışmada etkisizlik, VOR-CAS kombinasyonu için 1 çalışmada etkisiz etkileşimin gözlemlendiği bildirilmektedir (139). Dannaoui ve ark. (140) da *Aspergillus* türleri için ikili ve üçlü antifungal kombinasyonları checkerboard ve agar difüzyon yöntemleri ile değerlendirmişler, CAS'in AMB ya da VOR ile kombinasyonunun bütün izolatlar için aditif etkileşme gösterdiğini ve antagonizma gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Klinik *Trichosporon asahii* izolatlarına karşı bu kombinasyonların checkerboard yöntemi ile değerlendirilmesinde özellikle AMB-CAS kombinasyonu ile yüksek

oranda (%89) sinerji, VOR-CAS kombinasyonu ile %17 sinerji gözleendiği ve antagonistik etkileşme saptanmadığı bildirilmektedir (141).

Barchiesi ve ark. (142) AMB-CAS kombinasyonunun *C.parapsilosis* izolatlarına karşı etkinliğini checkerboard, disk difüzyon, *time-kill* yöntemlerini ve bir in vivo hayvan deneyini kullanarak değerlendirmişlerdir. Üç izolat ile yapılan checkerboard yönteminde inhibitör konsantrasyon değerlerinde anlamlı azalmalar olmakla birlikte, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indekslerine göre %100 etkisiz ilişki saptanmış, antagonizma gözlenmemiştir. Disk difüzyon yöntemi ile kombinasyonda, 24 saatte genel olarak her bir ilacın tek başına test edildiklerinde saptanan en geniş zon çapından daha geniş zonlar elde edilememiştir. Ancak 48 saatlik inkübasyonda bazı konsantrasyonlarında kombinasyonla daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Bir izolatla yapılan *time-kill* testinde fungusidal etkiye hiçbir şekilde ulaşılamamış olmakla birlikte, 1x MİK konsantrasyonlarındaki kombinasyonla en etkin ilaçla sağlanandan daha yüksek bir etki gözleendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada in vivo testlerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Hossain ve ark. (143) AMB-CAS kombinasyonunun in vivo ve in vitro etkinliğini azol dirençli *C.albicans* izolatlarına karşı değerlendirmişler, in vitro checkerboard dilüsyon yöntemi ile etkisiz ilişki saptandığı halde, bu kombinasyonun in vivo böbrekteki fungal sayıyı anlamlı şekilde azaltan tek yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir. *C.glabrata* ile oluşturulmuş deneysel kandidemi modellerinde de, CAS ya da mikafungin ile AMB kombinasyonunun organ sterilizasyonunu sağlayan tek tedavi yaklaşımı olduğu vurgulanmaktadır (132, 144). Ekinokandin grubu bir antifungal olan mikafungin ile AMB kombinasyonunu checkerboard dilüsyon yöntemi ile 145 klinik *Candida* izolatı için değerlendirildiği başka bir in vitro çalışmada, üremede kalıcı azalmanın gözleendiği konsantrasyonun MİK olarak kabul edilmesi durumunda %50 oranında sinerjik etkileşme gözleendiği ve antagonizma saptanmadığı bildirilmektedir (112).

Bizim daha önce *C.glabrata* izolatlarına karşı antifungal kombinasyonları değerlendirdiğimiz benzer bir çalışmamızda *time-kill* yöntemi ile AMB-CAS kombinasyonunda çalışmaya alınan 50 izolatın %46'sında sinerjik etkileşme saptamış ve antagonizma gözlememiştik (145). Aynı izolatlar ile benzer başka bir çalışmamızda da VOR-CAS kombinasyonu için %16 sinerji, %82 etkisizlik ve %2 antagonizma tespit ettik (146).

İn vitro fungal üreme üzerine kombinasyonların etkilerinin, kombinasyonda kullanılan ilaçların konsantrasyonu ve kombinasyondaki oranına, test edilen fungal türlere, çalışmadaki izolat sayısına, kullanılan farklı yöntemlere göre değişiklik gösterebileceği bildirilmektedir (5). Gerçekten, şimdiye kadar bahsedilen kombinasyon çalışmaları arasında, aynı çalışmadaki farklı yöntemlerin sonuçları arasında bile farklılıklar olduğu görülmektedir. Ancak anılan çalışmaların birleştiği ortak nokta, bunların hiçbirisinde VOR-CAS ya da AMB-CAS kombinasyonları için belirgin antagonistik etkileşmenin görülmemiş olmasıdır.

Çalışmamızda kombinasyonları üç farklı konsantrasyon için değerlendirdik. Her iki kombinasyon için de sıklıkla saptadığımız etkileşme şekli etkisizlik oldu. Antagonizma oranının oldukça düşük olduğu gözlemlendi. VOR-CAS kombinasyonunda 1/4x MİK konsantrasyonunda 24 ve 48. saatlerde yüksek oranda gözlenen sinerji ve etkisizlik ilgi çekiciydi. İlaçların düşük dozlarda kombinasyonu ile yüksek in vitro yanıt alınması, gelecek klinik çalışmalar açısından ümit verici bir bulgu olabilir. Bu sayede tek başına bir ilacın yüksek dozda kullanılması yerine çok daha düşük dozlarda iki ilacın kombine kullanılması ile toksik yan etkilerin azaltılması, tolere edilebilirliğin artırılması sözkonusu olabilir. Aksine bu kombinasyonda 4x MİK konsantrasyonunda sinerjik etkileşme daha az oluştu.

AMB-CAS kombinasyonunda ise *time-kill* yöntemiyle 4x MİK konsantrasyonlarında ilk 4-8 saatte gözlenen hızlı fungusidal etki, hızlı klinik yanıtın amaçlandığı ciddi enfeksiyonlar için önemli bir sonuç olabilir. Bu hızlı fungusidal etki aynı zamanda ilk 4-8 saatlerde yüksek bir sinerjik etkileşmenin de oluşmasına yol açtı. Bu kombinasyon için en iyi sonuçlar 4x MİK konsantrasyonlarında elde edildi, 1/4x MİK konsantrasyonları için yüksek oranlarda etkisiz tipte bir etkileşime rağmen sinerji gözlenmedi.

VOR-CAS kombinasyonunda tek başına CAS'e göre PAFE süreleri, *time-kill* sonuçları ile uyumlu olarak, 1/4x MİK için daha belirgin uzadı. En uzun PAFE süresi 4x MİK konsantrasyonunda görülmekle birlikte, tek başına CAS ile elde edilen sonuçlara bir üstünlüğü gözlenmedi. AMB-CAS kombinasyonunda 4x MİK konsantrasyonlarında *time-kill* testinde gözlenen hızlı fungusidal etki nispeten daha yavaş bir şekilde burada da gözlemlendi. İzolatların tamamında bu konsantrasyondaki kombinasyonda >42 saat süren PAFE tespit edildi. Bu etki iki ilaçla tek başına elde edilenden belirgin oranda daha hızlı ve daha uzun süreliydi. Ancak 1/4 ve 1x MİK

konsantrasyonlarındaki kombinasyonların PAFE süreleri, ilaçların tek başlarına ortaya koyduklarından daha farklı değildi. VOR-CAS kombinasyonu için 1/4x MİK ve AMB-CAS kombinasyonu için de 4x MİK konsantrasyonları daha ümit verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Kombinasyon çalışmalarımızın sonuçları genel olarak literatürle uyumludur. Buna göre CAS'in VOR ve AMB ile kombinasyonları *C.krusei* nedenli enfeksiyonlar için in vitro etkili görünmektedir. Şimdilik tek ilaç tedavisi şeklinde uygulanan VOR, AMB ve CAS bu *Candida* türüne in vitro etkili bulunmakla birlikte, bu ilaçların kombinasyonunu içeren tedavi yaklaşımları, şiddetli sistemik enfeksiyonu bulunan immüdüşkün hastalar, endokarditli hastalar ya da uygun antifungal tedaviye rağmen tekrarlayan enfeksiyonu bulunan hastalar gibi özel klinik durumlar için göz önünde bulundurulabilir. Bu ilaçlar arasındaki olumlu etkileşmenin mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte yaygın görüş, ekinokandinlerin hücre duvarı sentezini inhibe etmesinin ardından, VOR ve AMB gibi ondan farklı bir etki mekanizmasına sahip ilacın hücreye penetrasyonunun artmasıdır (92, 142).

Antifungal duyarlılığı değerlendirmek için standardize edilmiş yöntemler (CLSI M27-A2 ve CLSI M44-A) bulunmasına rağmen, antifungal kombinasyonların etkinliğini değerlendiren yöntemlerle ilgili standartlar henüz oluşturulmamıştır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem checkerboard mikrodilüsyon yöntemi olmakla birlikte, kombinasyonun dinamikleri hakkında bilgi vermesi açısından *time-kill* testleri daha yararlıdır. En iyi yöntemi saptamak için yapılmış az sayıda karşılaştırmalı çalışma bulunmaktadır. Bu yöntemlere son zamanlarda E-test yöntemi eklenmiştir.

Gram negatif bakteri ve mikobakterilere karşı ilaç kombinasyonlarının etkinliğini değerlendirmek için Etest yönteminin başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir (147, 148). Ancak daha yakın zamanda yapılan bir başka raporda imipenem dirençli *Acinetobacter baumannii* izolatlarına karşı minosiklin ve kolistin kombinasyon çalışmasında Etest ve *time-kill* yöntemi uyumsuz bulunmuştur (149).

Mantar türlerine karşı ilaç kombinasyonlarının etkinliğini belirlemek amacıyla Etest ve disk difüzyon yöntemini değerlendiren çalışma sayısı çok sınırlıdır. Lewis ve ark. (102) *Candida* türlerine karşı antifungal kombinasyonların etkinliğini değerlendirmek için Etest, *checkerboard* dilüsyon ve *time-kill* yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar antifungal kombinasyonu

değerlendirmede Etest ile *time-kill* arasındaki uyumun iyi olduğunu ancak *checkerboard* yönteminin, özellikle RPMI besiyerinin kullanıldığı çalışmalarda AMB aktivitesindeki değişiklikleri saptamada duyarlılığının kötü olduğunu ve dikkatli değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar. Ernst ve ark. (150) da Etestin mikrodilüsyona göre *time-kill* testiyle daha uyumlu sonuçlar verdiğini bildirmektedirler.

AMB-CAS kombinasyonunun 3 in vitro ve bir in vivo yöntemle değerlendirildiği çalışmalarında Barchiesi ve ark. (142), checkerboard dilüsyon testinin aksine, disk difüzyon testinin *time-kill* ve in vivo testlerle benzer sonuçlar verdiğini bildirmektedirler.

Daha önce *C.glabrata* izolatları ile yaptığımız çalışmamızda AMB-CAS kombinasyonunda birinci ve ikinci Etest yöntemleri ile *time-kill* arasındaki uyum sırasıyla %88 ve %52 bulunmuştu (145). Disk difüzyon testleri ile kombinasyonları değerlendirmede bildirilmiş herhangi bir kriter bulunmamakla birlikte, kombinasyonda elde edilen zon çaplarının hiçbirisi, tek başına ilaçların oluşturduğu zonlardan daha küçük değildi. CAS ile azol antifungallerin kombinasyonlarının değerlendirildiği başka bir çalışmamızda da Etest ile *time-kill* yöntemi arasındaki uyum %66-86 arasında gerçekleşmişti (146).

Şimdiki çalışmamızda VOR-CAS kombinasyonu için 30 izolatın 20'sinde (%67) ve AMB-CAS kombinasyonu için 15'inde (%50) Etestin her iki yöntemi ile *time-kill* arasında uyum saptadık. Etestin her iki yöntemi ile kombinasyonda, ilaçların tek başına saptanan MİK değerlerine göre fark edilebilir bir değişiklik saptanmadı. Bu nedenle Etestin sinerjik ve antagonistik etkileşimleri saptamada yetersiz kaldığını düşünmekteyiz. Disk difüzyon yöntemi de kombinasyonları değerlendirmede çok etkili bulunmadı. Disk difüzyon testleri ile kombinasyon sonuçlarının yorumlanmasına yönelik herhangi bir kriter bulunmamakla birlikte, *time-kill* yöntemi ile sinerji ya da antagonizma saptanan izolatlar için disk difüzyon testi zon çaplarında fark edilebilir bir artış ya da azalma gözlenmedi.

Son yıllarda profilaktik FLU kullanımının artması ile birlikte, *C.krusei* ve *C.glabrata* gibi FLU dirençli ya da daha az duyarlı *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlarda artış gözlenmektedir. Dar spektrumlu, toksisitesi yüksek ve tolere edilebilirliği düşük, sınırlı sayıdaki antifungal tedavi seçenekleri, invaziv enfeksiyonların tedavisinde ilaç kombinasyonunu gündeme getirmiştir.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz her iki kombinasyon ile ümit veren sonuçlar elde ettik. Ancak bunlar *in vitro* sonuçlardır ve bunların *in vivo* klinik testlerle doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçların suşa göre değişebileceği göz ardı edilmemelidir.

Kombinasyonların etkinliğini değerlendirmede Etest pratik bir yöntemdir. Ancak biz nispeten düşük uyum oranları tespit ettik. Disk difüzyon testlerinde ise yorumlama aşaması ile ilgili sıkıntılar bulunmaktadır. Her iki yöntem için standardizasyonun sağlanması amacıyla ileri çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Kombinasyon testlerinde ilaçların zaman içindeki hareketlerini takip etmesi, ilaç etkilerinin hızını ve genişliğini göstermesi bakımından *time-kill* testleri daha kullanışlı gibi görünmektedir. Ancak bu testlerin oldukça zahmetli ve zaman alıcı olduğu unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, VOR, AMB ve CAS *C.krusei* izolatlarına karşı *in vitro* etkili antifungallerdir. VOR, konsantrasyondan bağımsız fungustatik etki gösterirken, AMB ve CAS doz ilişkili fungusidal etki sergilemektedir. CAS'ın VOR ile kombinasyonu, özellikle MİK altındaki konsantrasyonlarda, AMB ile kombinasyonu MİK üzerindeki konsantrasyonlarda ümit verici sonuçlar sergilemiştir. Bu sayede tek başına bir ilacın yüksek dozda kullanılması yerine çok daha düşük dozlarda iki ilacın kombine kullanılması ile toksik yan etkilerin azaltılması, tolere edilebilirliğin artırılması söz konusu olabilir. Ayrıca bu kombinasyonlar, sistemik enfeksiyonu bulunan şiddetli immüdüşkün hastalar, endokarditli hastalar ya da uygun antifungal tedaviye rağmen tekrarlayan enfeksiyonu bulunan hastalar için alternatif tedavi seçenekleri sunabilir. Ancak bunlar *in vitro* gözlemlerdir. Farklı türleri ve çoklu doz rejimlerini içeren ilave laboratuvar ve klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya 30 klinik *C.krusei* izolatu alınmış ve tüm izolatların referans BMD yöntemi (CLSI M27-A2) ile minimal inhibitör konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Her bir ilaç için elde edilen MİK değerlerinin 1/4, 1 ve 4 katlık konsantrasyonları ile hem ilaçların tek başına hem de ikili kombinasyonları ile tüm izolatlara karşı *time-kill* ve PAFE deneyleri uygulanmıştır. Bunun yanında Etest ve disk difüzyon yöntemleri ile de duyarlılık ve kombinasyon deneyleri yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

- VOR, AMB ve CAS in vitro şartlarda referans yöntemle tüm *C.krusei* izolatlarına karşı etkili bulunmuştur. İzolatların MİK değerleri VOR için 0.25-0.50 µg/ml, AMB için 1.0-2.0 µg/ml, CAS için 0.25-1.0 µg/ml arasında gerçekleşmiştir.
- Etest yöntemiyle duyarlılık testlerinde VOR MİK değerleri 0.094-0.5 µg/ml arasındaydı ve Etest ile BMD arasındaki uyum oranı %100 kabul bulundu. AMB için de Etest ve BMD arasında %100 uyum saptandı ve AMB Etest MİK'leri 0.5-2.0 µg/ml tespit edildi. CAS için Etest MİK'leri 0.047-0.50 µg/ml arasındaydı ve referans yöntemle %83 oranında uyum tespit edildi.
- Disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testlerinde tüm izolatlarda zon çapları VOR ile ≥ 18 mm, AMB ile ≥ 18 mm ve CAS ile ≥ 25 mm tespit edilmiştir. Bu durumda VOR ve CAS'e izolatların tamamı duyarlı idi, AMB için ise izolatların hiçbirisi için direnç gözlenmedi.
- CAS ve AMB disk difüzyon testi için kesin duyarlılık sınır değerleri bulunmamaktadır. VOR için disk difüzyon yöntemi ile referans yöntem arasındaki kategorik uyum oranı %100 olarak gerçekleşti.
- *Time-kill* duyarlılık testlerinde VOR konsantrasyonla ilişkili olmaksızın bütün izolatlara karşı fungustatik aktivite gösterirken, AMB ve CAS tamamen doz ilişkili etki sergiledi. AMB ile 1/4x MİK ve 1x MİK konsantrasyonlarında fungustatik, 4x MİK konsantrasyonunda fungusidal aktivite gözlemlendi. CAS ise ilk 8 saatte tüm konsantrasyonlar için hızlı bir öldürme etkisi göstererek, 1/4x MİK'de fungustatik, 1 ve 4x MİK'de fungusidal etki ortaya koydu.
- VOR ile ilacın üç konsantrasyonu için de herhangi bir PAFE saptanmadı. Oysa hem AMB hem de CAS ile konsantrasyon ilişkili ve uzun süreli PAFE saptandı.

AMB'nin 1/4x MİK konsantrasyonunda koloni sayısında belirgin bir azalma izlenmemekle birlikte, $1\log_{10}$ 'luk artışın oluşması için 7-43 saat gerekti. 1x MİK ve 4x MİK konsantrasyonlarında PAFE daha uzundu ve sırasıyla izolatların 26 ve 27'sinde bu etki takip süresince kalıcıydı. CAS daha belirgin ve daha uzun süreli bir PAFE sergiledi.

- *Time-kill* yöntemi ile kombinasyon çalışmalarında en sık görülen etkileşme şekli her iki kombinasyon için de etkisizlik oldu.
- VOR-CAS kombinasyonunda, antifungallerin 1/4x MİK konsantrasyonlarında 48. saatte sinerji oranı %67 bulundu. Bu kombinasyon için en düşük sıklıkta gözlenen etkileşme şekli antagonizma oldu ve en fazla 4x MİK konsantrasyonunda ve 24. saatte gözlendi (%13).
- AMB-CAS kombinasyonunda ilaç konsantrasyonlarının artışı ile daha iyi sonuçlar elde edildi. En iyi sonuçlar 4x MİK konsantrasyonundaki kombinasyonlarda ve etkileşmenin ilk 4-8 saatlik döneminde gözlendi. 4x MİK konsantrasyonlarında AMB-CAS kombinasyonu ile izolatların 20'si için (%67) ilk 4 saatte ve 18'i için (%60) 8. saatte sinerjik etkileşme saptandı. Bu kombinasyon için de en az gözlenen etkileşme şekli antagonizma idi. En yüksek antagonizma oranı (%13) 1x MİK konsantrasyonunun 24. saatinde gözlendi.
- VOR ile ilacın hiçbir dozunda saptanabilir post antifungal etki gözlenmedi, AMB ve CAS ile tüm izolatlar için belirgin konsantrasyon ilişkili PAFE saptandı. İlaçların kombinasyonları ile tek başlarına elde edilen PAFE'den belirgin farklılıklar gözlenmemekle birlikte, AMB-CAS kombinasyonu ile VOR-CAS kombinasyonuna göre daha yüksek PAFE süreleri saptandı.
- Etestin her iki yöntemi ile *time-kill* arasında VOR-CAS kombinasyonu için %67 ve AMB-CAS kombinasyonu için %50 uyum saptandı.
- Disk difüzyon testleri ile kombinasyon sonuçlarının yorumlanmasına yönelik herhangi bir kriter bulunmamakla birlikte, time kill yöntemi ile sinerji ya da antagonizma saptanan izolatlar için disk difüzyon testi zon çaplarında fark edilebilir bir değişiklik gözlenmedi.

KAYNAKLAR

1. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2938-58.
2. Kwan Chung KJ, Bennet JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lea and Fabinger; 1992.
3. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2006.
4. Dismukes WE. Antifungal therapy: from amphotericin B to present. Trans Am Clin Climatol AssoC. 1993; 104: 166-79.
5. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(1): 163-94.
6. Chaturvedi V, Ramani R, Ghannoum MA, Killian SB, Holliday N, Knapp C, Ostrosky-Zeichner L, Messer SA, Pfaller MA, Iqbal NJ, Arthington-Skaggs BA, Vazquez JA, Sein T, Rex JH, Walsh TJ. Multilaboratory testing of antifungal combinations against a quality control isolate of *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4): 1500-2.
7. Lehmann PF. Fungal structure and morphology. In: Merz WG, Hay RJ, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005. p. 69-81.
8. Chauhan N, Li D, Singh P, Calderone R, Kruppa M. The cell wall of *Candida* spp. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press; 2002. p. 159-79.
9. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. Clin MicrobiolRev. 2004; 17(2): 281-310.

10. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(1): 14-29.
11. Shea YR. Algorithms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p.1745-61
12. Gow NAR. Cell Biology and Cell Cycle of *Candida*. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 145-59.
13. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. *Jawetz Medical Microbiology*. 23th ed. Boston: McGraw-Hill; 2004. 623-61.
14. Hazen KC, Howell SA. Hazen KC, Howell SA. *Candida, Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1762-88.
15. Hazen KC, Howell AS. Mycology and Antifungal Susceptibility Testing. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2004. 8.0.1.
16. Calderone R, Gow NAR. Host Recognition by *Candida* Species. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 67-87.
17. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 1-20.
18. Pujol C, Renaud F, Mallie M, de Meeus T, Bastide JM. Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. *J Med Vet Mycology.* 1997; 35: 115-21.
19. Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC. Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* species as Pathogens. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 37-55.
20. De Hoog GS, Gene GJ, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures; 2000.
21. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133-63.
22. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as

- the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer*. 2008; 112(11): 2493-9.
23. Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*. 1994; 41(5): 295-310.
 24. Pemán J, Jarque I, Bosch M, Cantón E, Salavert M, de Llanos R, Molina A. Spondylodiscitis caused by *Candida krusei*: case report and susceptibility patterns. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(5): 1912-4.
 25. Sili U, Yilmaz M, Ferhanoglu B, Mert A. *Candida krusei* arthritis in a patient with hematologic malignancy: successful treatment with voriconazole. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(7): 897-8.
 26. Rajendram R, Alp NJ, Mitchell AR, Bowler IC, Forfar JC. *Candida* prosthetic valve endocarditis cured by caspofungin therapy without valve replacement. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(9): 72-4.
 27. Petrocheilou-Paschou V, Georgilis K, Kontoyannis D, Nanas J, Prifti H, Costopoulos H, Stamatelopoulos S. Pneumonia due to *Candida krusei*. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(12): 806-9.
 28. Krcmery V Jr, Spanik S, Kunova A, Trupl J, Grausova S, Krupova I, Mateicka F, Pichnova E, Grey E, Sabo A. Nosocomial *Candida krusei* fungemia in cancer patients: report of 10 cases and review. *J Chemother*. 1999; 11(2): 131-6.
 29. Alva EM, Khayr W. *Candida krusei* sinusitis. *Am J Ther*. 1998; 5(2): 121-3.
 30. Sivasubramanian G, Sobel JD. Refractory urinary tract and vulvovaginal infection caused by *Candida krusei*. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2009; 20(11): 1379-81.
 31. Choi HK, Jeong SJ, Lee HS, Chin BS, Choi SH, Han SH, Kim MS, Kim CO, Choi JY, Song YG, Kim JM. Blood stream infections by *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a single-center experience. *Korean J Intern Med*. 2009; 24(3): 263-9.
 32. Dorko E, Pilipcinec E, Mahel M, Virágová S, Bracoková I, Dorko F, Svický E, Danko J, Holoda E, Ondrasovic M, Tkáčiková L. Yeast-like microorganisms in eye infections. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46(2): 147-50.

33. White TC. Mechanisms of resistance to antifungal agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. 1961-71.
34. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(2):211-24.
35. Odds FC, Gow NAR, Brown AJP. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP, editors. *Molecular principles of fungal pathogenesis*. Washington DC: ASM Press; 2006. p. 305–19.
36. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183: 5385–94.
37. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003; 36: 223-8.
38. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35(4): 283-309
39. Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol*. 2004; 82(2): 196-204.
40. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(4): 465-72.
41. Romani L. Immunology of Invasive Candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p.223-42.
42. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 3-14
43. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anesthesiol*. 2009; 75(7-8): 453-8.
44. Ruhnke M. Skin and Mucous Membran Infections. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 307-26.

45. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(3): 335-48.
46. Kullberg BJ, Filler SG. Candidemia. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 327-40.
47. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(3): 309–17.
48. Redmond A, Dancer C, Woods ML. Fungal infections of the central nervous system: A review of fungal pathogens and treatment. *Neurol India.* 2007; 55(3): 251-9.
49. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 730-97.
50. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP, Vos P, Sigounas G. Analysis of factors related to the occurrence of chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia in a non-bone marrow transplant setting: a follow-up study. *Cancer.* 2001; 92(6): 1349-53.
51. Richardson MD, Carlson P. Culture- and Non-culture-Based Diagnostics for *Candida* Species. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 387-94.
52. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9): 3640-5.
53. Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1998;18: 101-53.
54. Laín A, Elguezabal N, Amutio E, Fernández de Larrinoa I, Moragues MD, Pontón J. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Dev Immunol.* 2008; 2008: 721950.
55. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1998 ;11(1): 121-41.

56. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1999 ;37(5): 1510-7.
57. Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transplant Infect Dis.* 2006; 8: 128-39.
58. Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2002; 51(5): 433-42.
59. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, Hara K. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(12): 3115-8.
60. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(2): 199-205.
61. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(12): 5957-62.
62. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A, Ito A, et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 1995; 345(8941): 17-20.
63. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 465-84.
64. Yeo SF, Huie S, Sofair AN, Campbell S, Durante A, Wong B. Measurement of serum D-arabinitol/creatinine ratios for initial diagnosis and for predicting

- outcome in an unselected, population-based sample of patients with *Candida* fungemia. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11): 3894-9.
65. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 2006; 43(1): S15.
 66. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 479–86.
 67. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 5122-8.
 68. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. *Med Mycol.* 2006; 44(5): 389-98.
 69. Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(4): 37-45.
 70. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2181-7.
 71. Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med J Aust.* 2007; 187(7): 404-9.
 72. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology.* 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2009.
 73. Arikan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1949-60.
 74. Martinez R. An update on the use of antifungal agents. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(5): 449-60.

75. Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis.* 1999; 1(4): 273-83.
76. Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, Natarajan-Amé S, Letscher-Bru V. Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): i39-i48.
77. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, de Pauw B; Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global *Aspergillus* Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002; 347(6): 408-15.
78. Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(5): 630-7.
79. Letscher-Bru V, Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(3): 513-21.
80. Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother.* 2009; 43(10): 1647-57.
81. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial Combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2000. p. 432-49.
82. Uzun Ö. Antifungal Kombinasyon Tedavisi. *Ankem Derg.* 2006; 20(2): 36-7.
83. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH: Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 693-715.
84. Howden BP, Slavin MA, Schwarzer AP, and Mijch AM. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22: 111–3.

85. Park DW, Sohn JW, Cheong HJ, Kim WJ, Kim MJ, Kim JH, Shin C. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 26.
86. Ustun C, Huls G, Stewart M, Marr KA. Resistant *Microascus cirrosus* pneumonia can be treated with a combination of surgery, multiple anti-fungal agents and a growth factor. *Mycopathologia.* 2006; 162(4): 299-302.
87. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A; Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2) :515-21.
88. Lewis RE. Pharmacodynamic implications for use of antifungal agents. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7(5): 491-7.
89. Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am.* 2006; 20(3): 679-97.
90. Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(4): 1108-11.
91. Smith J, Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit.* 2008; 30(2): 167-72.
92. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 2007; 45(7): 569-87.
93. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard NCCLS document M27-A2. Wayne, Pa; 2002.
94. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard NCCLS Document M38-A. Wayne, Pa; 2002.
95. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline M44-A. Wayne, Pa; 2004.

96. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion Document E.Dis 7.1. Munich, Germany; 2002.
97. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller LB. Comparative Evaluation of Etest and Sensititre YeastOne Panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 Reference Broth Microdilution Method for Testing *Candida* Susceptibility to Seven Antifungal Agents. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (3): 698-706.
98. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(1): i13-8.
99. Canton E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(1): 107-19.
100. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am.* 2006; 20(3): 699-709.
101. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 1207-12.
102. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49: 345-51.
103. Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Knapp CC, Sheehan DJ, Walsh TJ. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2620-9.
104. Brown SD, Traczewski MM. Caspofungin disk diffusion breakpoints and quality control. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(6): 1927-9.
105. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey,

- Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9): 2902-5.
106. Negri M, Henriques M, Svidzinski TI, Paula CR, Oliveira R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species from infection and colonization. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23(5): 324-30.
 107. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(3): 858-64.
 108. Roling EE, Klepser ME, Wasson A, Lewis RE, Ernst EJ, Pfaller MA. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 43(1): 13-7.
 109. Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R. In vitro pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(11): 4453-6.
 110. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(12): 3846-53.
 111. Lozano-Chiu M, Nelson PW, Paetznick VL, Rex JH. Disk diffusion method for determining susceptibilities of *Candida* spp. to MK-0991. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5): 1625-7.
 112. Serena C, Mariné M, Quindós G, Carrillo AJ, Cano JF, Pastor FJ, Guarro J. In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(4): 1529-32.

113. Vos MC, Endtz HP, Horst-Kreft D, Doorduyn J, Lugtenburg E, Verbrugh HA, Lowenberg B, de MS, van PC, van BA: *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. J Clin Microbiol. 2006; 44 (3): 1111-4.
114. Martin D, Persat F, Piens MA, Picot S. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24(5): 329-33.
115. Hautala T, Ikäheimo I, Husu H, Säily M, Siitonen T, Koistinen P, Vuopio-Varkila J, Koskela M, Kujala P. A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. BMC Infect Dis. 2007; 22: 97.
116. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. Clin Infect Dis. 2006; 43(8): 1060-8
117. Meletiadis J, Verweij PE, TeDorsthorst DT, Meis JF, Mouton JW. Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. Med Mycol. 2005; 43(2):133-52.
118. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? J Antimicrob Chemother. 2004; 54(5): 854-69.
119. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(6): 2009-15.
120. Canton E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(7): 3108-11.
121. Lyon GM, Karatela S, Sunay S, Adiri Y; for the CaSS Investigators. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* Surveillance Study (CaSS). J Clin Microbiol. 2010 Feb 3. (Epub ahead of print)

122. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(3): 1087-90.
123. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(4): 767-71.
124. Dannaoui E, Paugam A, Develoux M, Chochillon C, Matheron J, Datry A, Bouges-Michel C, Bonnal C, Dromer F, Bretagne S. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Sep 23. (Epub ahead of print)
125. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 5208-13.
126. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3): 819-26.
127. Noake T, Kuriyama T, White PL, Potts AJ, Lewis MA, Williams DW, Barnes RA. Antifungal susceptibility of *Candida* species using the Clinical and Laboratory Standards Institute disk diffusion and broth microdilution methods. *J Chemother.* 2007; 19(3): 283-7.
128. Milici ME, Maida CM, Spreghini E, Ravazzolo B, Oliveri S, Scalise G, Barchiesi F. Comparison between disk diffusion and microdilution methods for determining susceptibility of clinical fungal isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(11): 3529-33.
129. Szabo Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemény-Beke A, Asztalos L, Rozgonyi F, Majoros L. In vitro efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida*

- dublinsiensis* isolates using time-kill methodology. *Mycoses*. 2009 Sep 16. (Epub ahead of print)
130. Canton E, Pemán J, Valentín A, Bosch M, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. Comparison of posaconazole and voriconazole in vitro killing against *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62(2): 177-81.
 131. Clancy CJ, Huang H, Cheng S, Derendorf H, Nguyen MH. Characterizing the effects of caspofungin on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida glabrata* isolates by simultaneous time-kill and postantifungal-effect experiments. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(7): 2569-72.
 132. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Arzeni D, Giannini D, Scalise G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(12): 4989-92.
 133. Canton E, Peman J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(7): 2477-82.
 134. Chryssanthou E, Cars O, Sjölin J. New automated method for determining postantifungal effect of amphotericin B against *Candida* species: effects of concentration, exposure time, and area under the curve. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(12): 4016-8.
 135. Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(12): 5058-68.
 136. Baltch AL, Bopp LH, Smith RP, Ritz WJ, Michelsen PB. Anticandidal effects of voriconazole and caspofungin, singly and in combination, against *Candida glabrata*, extracellularly and intracellularly in granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-activated human monocytes. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(6): 1285-90.
 137. MacCallum DM, Whyte JA, Odds FC. Efficacy of caspofungin and voriconazole combinations in experimental aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(9): 3697-701.

138. Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Hernandez S, Larsen RA. Addition of caspofungin to fluconazole does not improve outcome in murine candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(7): 2373-5.
139. Steinbach WJ, Stevens DA, Denning DW. Combination and sequential antifungal therapy for invasive aspergillosis: review of published in vitro and in vivo interactions and 6281 clinical cases from 1966 to 2001. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(3): S188-224.
140. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 970-8.
141. Li H, Lu Q, Wan Z, Zhang J. In vitro combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Mar 2. (Epub ahead of print)
142. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D, Scalise G. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(3): 941-5.
143. Hossain MA, Reyes GH, Long LA, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Efficacy of caspofungin combined with amphotericin B against azole-resistant *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(6): 1427-9.
144. Olson JA, Adler-Moore JP, Smith PJ, Proffitt RT. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(12): 4895-902.
145. Kiraz N, Dag I, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: comparison of disk diffusion, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2): 788-90.
146. Kiraz N, Dag I, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N, Oz Y. Synergistic Activities of Three Triazoles with Caspofungin against *Candida glabrata* isolates Determined by Time-Kill, Etest and Disk Diffusion Methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar 1. (Epub ahead of print)

147. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 38(1): 43-50.
148. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(8): 1914-8.
149. Tan TY, Ng LS, Tan E, Huang G. In vitro effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60(2): 421-3.
150. Ernst EJ, Yodoi K, Roling EE, Klepser ME. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(2): 578-81.