



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**HEMOKÜLTÜRLERDEN İZOLE EDİLEN KANDİDALARIN
FLUKONAZOL DUYARLILIKLARI VE FLUKONAZOL İLE
SİPROFLOKSASİN, LEVOFLOKSASİN VE DOKSİSİKLİN
ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Melek Kaya

Ankara, 2010



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**HEMOKÜLTÜRLERDEN İZOLE EDİLEN KANDİDALARIN
FLUKONAZOL DUYARLILIKLARI VE FLUKONAZOL İLE
SİPROFLOKSASİN, LEVOFLOKSASİN VE DOKSİSİKLİN
ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Melek Kaya

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Müge Demirbilek

ANKARA, 2010

**Tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından KA09/60 Proje
Numarası ile Desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Doç. Dr. Füsün Can'a; uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, ilk asistanı olmaktan gurur duyduğum, tez danışmanım sayın Doç. Dr. Müge Demirebilek'e; Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Hande Arslan'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda destek veren Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Sedef Göçmen'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarımda kullandığım suşları temin ettiğim, Ankara ve Adana Başkent Üniversitesi hastanesinin görevli Yrd. Doç. Dr. Şule Çolakoğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Hikmet Eda Alışkan'a, Doç. Dr. Özlem Kurt Azap'a, Doç. Dr. Funda Timurkaynak'a ve her iki mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan tüm personele teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimime beraber başladığım, tez çalışmalarımda her zaman yanımda olan, manevi desteğini esirgemeyen, en yakın dostum Dr. Fulya Bayındır Bilman'a; uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen, 4 yıl boyunca birlikte çalışmaktan onur duyduğum laboratuvar teknisyenleri, Sayın Murat Ural ve Serdar Kurşunlu'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezimin ortaya çıkışında gösterdiği büyük emek ile istatistik çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Canan Yazıcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yetişmemde büyük emekleri olan, hayatım boyunca iyi ve kötü günde hep yanımda olan, uzakta olsalar da manevi olarak desteklerini esirgemeyen değerli annem ve babama, kardeşlerime; tez çalışmamda her zaman yanımda olan değerli eşim Mustafa Kaya'ya teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak başladığım günden beri; ondan çaldığım vakitleri esirgemeyen, sevgisi ile bana her zaman güç veren, en değerli varlığım oğlum Davut Can Kaya'ya sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Melek Kaya

ÖZET

Hemokültürlerden izole edilen kandidaların flukonazol duyarlılıkları ve flukonazol ile siprofloksasin, levofloksasin ve doksisisiklin etkileşiminin araştırılması.

Bu çalışmada kandan izole edilen kandida suşlarının invitro flukonazol duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesi ve seçilecek duyarlı ve dirençli kandidalarda flukonazol'ün levofloksasin, siprofloksasin, doksisisiklin kombinasyonları ile oluşan invitro ilaç etkileşiminin araştırılması hedeflendi.

Çalışmamızda, Başkent Üniversitesi Hastanesi'nde çeşitli ünitelerde yatan hastalardan alınan kan kültürlerinden izole edilen 300 kandida suşu kullanıldı. Tüm suşlar germ tüp oluşumu, mısır-unlu Tween 80 besiyerindeki morfolojik görünümleri, API 20C AUX (Biomerieux, Fransa) kiti kullanılarak biyokimyasal özellikleri incelenerek tiplendirildi. Tüm suşlarda flukonazol'ün standart toz formları ile CLSI standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon (M27-A3) yöntemi ile antifungal duyarlılıkları çalışıldı. İlaç etkileşimleri çalışmasına flukonazole dirençli dört *C. albicans*, iki *C. glabrata*, iki *C. tropicalis* ve duyarlı dört *C. albicans* ve *C. krusei*, *C. parapsilosis* standart suşlarıyla birlikte toplam 14 suş dahil edildi. Suşlarda, flukonazolün siprofloksasin, levofloksasin ve doksisisiklin ile kombinasyonlarının invitro etkinliği, checkerboard mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak çalışıldı. İlaç etkileşimlerinin sonuçları, flukonazol-doksisisiklin etkileşimi FİK indeksle ve hem flukonazol-doksisisiklin hemde flukonazol-kinolon etkileşim isobolografik analiz yöntemleri ile değerlendirildi.

Çalışmamızda, levofloksasin ve siprofloksasinin kandidalar üzerinde antifungal etkisi saptanmadı. Ancak doksisisiklinin, duyarlı kandida suşlarında dirençlilere göre daha düşük MİK değerleri elde edildi. Flukonazol - siprofloksasin kombinasyonlarında sinerji saptanmadı. Levofloksasin ile kombinasyonlarda ise iki suшта sinerji saptandı. Buna karşılık beş suшта siprofloksasin ile dört suшта ise levofloksasin ile antagonizma görüldü. Flukonazol- doksisisiklin kombinasyonlarının FİK indeks sonuçlarına göre; duyarlı bir suшта antagonizma elde edildi, diğer suşlarda ilaç etkileşimi saptanmadı. Ancak isobolografik analiz yöntem ile değerlendirildiğinde; suşların yarısında antagonizma ve bir suшта sinerji saptandı. Tüm kombinasyonlarda ilaç etkileşimleri suşta göre değişkenlik gösterdi.

Sonuç olarak; bulgularımız invivo ve invitro çalışmalar ile desteklenirse kandida enfeksiyonlarında ilaç etkileşimlerinin mekanizmasının anlaşılmasında ve tedavide yeni kombinasyon seeneklerinin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler; *Candida* spp, sinerji-antagonizma, FİK analizi, Isobolografik analiz, flukonazol-antibiyotikler

ABSTRACT

Fluconazole susceptibility of Candida species isolated from blood cultures and drug interactions of ciprofloxacin, levofloxacin and doxycycline with fluconazole

In this study, it was aimed to evaluate the results of the invitro fluconazole susceptibility of Candida strains isolated from blood culture and to investigate drug interactions on fluconazole susceptible and resistance strains formed by the combination of levofloxacin, ciprofloxacin, doxycycline with fluconazole.

In our study, 300 Candida strains isolated from blood cultures of patients hospitalized in various units of Baskent University Hospital were used., germ tube formation, morphologic appearance in Tween 80 corn-meal agar of all strains were tested and their biochemical characteristics were examined using the API 20C AUX (bioMerieux, France) kit. Antifungal susceptibility tests were performed by microdilution method according to CLSI standards (M27-A3) with fluconazole standard powder for all strains. Total 14 candida strains including fluconazole resistance four *C. albicans*, two *C. glabrata*, two *C. tropicalis* and fluconazole sensitive four *C. albicans* and reference strains of *C. krusei* and *C. parapsilosis*, were included to drug interaction studies. Invitro efficacy of the combination for fluconazole, with ciprofloxacin, levofloxacin and doxycycline were assessed using checkerboard microdilution method and the result analysis by FIC index for fluconazole-doxycycline and isobolographic methods for both fluconazole-doxycycline and Fluconazole-quinolone.

In our study, we determined that ciprofloxacin and levofloxacin had no effect on candida strains. MIC values of doxycycline were significantly higher in fluconazole resistance strains than susceptible strains. No synergistic effect obtained from fluconazole-ciprofloxacin combinations and only two from fluconazole-levofloxacin while antagonistic effects were detected in five fluconazole-ciprofloxacin and four fluconazole-levofloxacin combinations. antagonistic effect obtained from fluconazole-doxycycline combinations in one fluconazole susceptible strain with FIC index analyze. On the other hand antagonistic

interactions were obtained from half of all strains and synergistic interaction was determined in one strain with isobolographic analyze.

As a result, more invivo and invitro studies needed to support our findings to understand mechanisms of drug interactions and to generate new combinations for antifungal therapy.

Key words; *Candida* spp, synergy-antagonisms, FIC analyze, Isobolographic analyze, fluconazole-antibiotics

İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa</i>
Özet	<i>iii</i>
İngilizce özet	<i>v</i>
İçindekiler dizini	<i>vii</i>
Kısaltmalar ve simgeler dizini	<i>ix</i>
Şekiller dizini	<i>x</i>
Tablolar dizini	<i>xi</i>
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. Kandida Enfeksiyonları	2
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Tanı	4
2.3.1. Direkt Mikroskopi	4
2.3.2. İzolasyon	4
2.3.3. Tiplendirme	5
2.3.4. Diğer Tanı Yöntemleri	6
2.4. Antifungal İlaçlar	6
2.4.1. Azol Grubu Antifungaller: Flukonazol	7
2.4.2. Flukonazol Direnç Mekanizmaları	7
2.4.3. Diğer Antifungaller	8
2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri	8
2.5.1. Dilüsyon Yöntemleri	9
2.5.2. Difüzyon Yöntemi	9
2.5.3. E test	9
2.6. Kandida Enfeksiyonlarında İlaç Etkileşimleri	9
2.6.1. Antifungal-Antifungal İlaç Etkileşimi	10
2.6.2. Antifungal –Diğer İlaç Etkileşimleri	11
2.7. İlaç Etkileşimlerinde Araştırma Yöntemleri	13

3. Gereç ve Yöntem	14
3.1. Maya izolatları	14
3.2. Tiplendirme	14
3.2.1. Germ Tüp Testi	14
3.2.2. Mısır Unlu Tween 80 Agarda Mikroskopik Morfoloji İncelenmesi	15
3.2.3. Biyokimyasal Tiplendirme	16
3.3. Flukonazol Duyarlılık Testleri	17
3.3.1. Besiyeri	17
3.3.2. Flukonazol'un Stok Solüsyonu	17
3.3.3. Maya Süspansiyonu	17
3.3.4. Plakların Hazırlanması	18
3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi	18
3.4. Flukonazol ile İlaç Etkileşimlerinin Checkerboard Yöntemi ile Araştırılması	18
3.4.1 Stok Solüsyonlar	18
3.4.2. Maya süspansiyonları	19
3.4.3. Plakların Hazırlanması	19
3.5. Sonuçların Değerlendirmesi	26
3.5.1. FİK İndeks Analizi	26
3.5.2 İsobolografik Analiz	26
3.6. İstatiksel Analiz	28
4. Bulgular	29
4.1.1. Tür Düzeyinde Dağılım	29
4.2. Flukonazol Duyarlılık Sonuçları	29
4.3. Checkerboard Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
4.3.1 FİK İndeks Analizi	31
4.3.2 İsobolografik Analiz	33
5. Tartışma	40
6. Sonuç	51
7. Kaynaklar	54

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AmB	Amfoterisin B
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
D	Doksisiklin
FİK	Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon
F	Flukonazol
I	İnteraksiyon İndeks
L	Levofloksasin
MİK	Minumum İnhibitör Konsantrasyon
S	Siprofloksasin
SAP	Secreted Aspartic Proteases
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar

ŞEKİL DİZİNİ

	<i>Sayfa</i>
Şekil 3.1. <i>C.albicans</i> suşunun, mısır-unlu Tween 80 kültür plaklarında mikroskopik görünümü	15
Şekil 3.2. <i>C.glabrata</i> suşunun, mısır-unlu Tween 80 kültür plaklarında mikroskopik görünümü	16
Şekil 4.1. Kandidalarda tür dağılımı	29
Şekil 4.2. Albikans ve albikans dışı kandidaların konsantrasyonlarına göre MİK dağılımı	30

TABLO DİZİNİ

	<i>Sayfa</i>
Tablo 2.1. Kandidemi gelişmesinde rol alan risk faktörleri	3
Tablo 2.2. Kandida enfeksiyonlarında kullanılan antifungal ilaçlar	7
Kutu 3.1. Germ tüp test yöntemi	14
Kutu 3.2. Mısır Unlu Tween 80 besiyerinin hazırlanması ve ekim yöntemi	15
Kutu 3.3. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması	17
Tablo 3.1. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Siprofloksasin konsantrasyonları	20
Tablo 3.2. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Levofloksasin konsantrasyonları	21
Tablo 3.3. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Doksisisiklin konsantrasyonları	22
Tablo 3.4. Dirençli suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Siprofloksasin konsantrasyonları	23
Tablo 3.5. Dirençli suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Levofloksasin konsantrasyonları	24
Tablo 3.6. Dirençli Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Doksisisiklin konsantrasyonları	25
Tablo 4.1. Kandida türlerinin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ dağılımı	30
Tablo 4.2. Duyarlılık sonuçlarının türlere göre dağılımı	31
Tablo 4.3. Duyarlı ve dirençli suşlarda FİK indeks analiz sonuçları	32
Tablo 4.4. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Doksisisiklin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	33
Tablo 4.5. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Doksisisiklin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	34
Tablo 4.6. Test edilen suşlarda Flukonazol-Doksisisiklin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları	34
Tablo 4.7. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Siprofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	35
Tablo 4.8. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Siprofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	36
Tablo 4.9. Test edilen suşlarda Flukonazol-Siprofloksasin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları	36
Tablo 4.10. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Levofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	37

Tablo 4.11. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Levofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri	37
Tablo 4.12. Test edilen suşlarda Flukonazol-Levofloksasin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları	38
Tablo 4.13. Yapılan tüm analiz sonuçlarının suşlara göre dağılımı	39

1. GİRİŞ

Kandida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve hastane kaynaklı önemli enfeksiyonlara yol açan etkenlerdir. Hastane enfeksiyonlarında etken olan kandida türlerinin oranı son yirmi yılda belirgin artış göstermiştir (1). Kandidemiler, nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları içinde dördüncü, yoğun bakım ünitelerinde gelişen enfeksiyonlar içinde üçüncü sırada yer almaktadırlar (2).

Kandidemilerde tedavi mortalite ve morbidite yönünden önem kazanmakta flukonazol ilk tercih olarak karşımıza çıkmaktadır. Uzun süreli antifungal ilaç tedavisi alan hastalarda flukonazol duyarlılığı azalmakta ayrıca daha dirençli olan albicans dışı kandida enfeksiyon oranlarında artışa neden olmaktadır (3). Flukonazol direnç oranlarındaki bu artış, tedavi rejimlerinin değişmesine ve kombine ilaç tedavisine olan gereksinimi arttırmaktadır. Son yıllarda antifungal-antifungal ilaç kombinasyonlarının yanında, antifungaller ile farklı grup antibakteriyel ilaçlar arasındaki ilaç etkileşimi gösterilmiştir (4, 5, 6, 7).

Antimikrobiyal ilaç etkileşiminin invitro olarak checkerboard yöntemi ile araştırılması ve sonuçların fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeks analiz yöntemi ile değerlendirilmesi araştırmacılar tarafından yıllardır kullanılmaktadır (8, 9, 10). FİK indeks analiz yöntemi, antifungal ilaçlar ile kandidalar üzerinde etkisi olmayan farklı grup antibakteriyel ilaçlar arasındaki ilaç etkileşiminin araştırılmasında yeterli olmadığından aktif ve inaktif ilaç arasındaki ilaç etkileşiminin araştırılmasında Loewe etkileşim teorisine dayalı isobolografik analiz yöntemi tercih edilmektedir (6, 11, 12, 13).

Bu çalışmanın amacı, kandan izole edilen kandida suşlarında en sık kullanılan antifungal olan flukonazolun, invitro duyarlılık profilini değerlendirmek ayrıca flukonazole dirençli ve duyarlı suşlarda, flukonazolun, kinolonlar ve doksisisiklin kombinasyonları ile oluşan etkileşimlerini göstermektir.

Elde edilen sonuçlar, kandida enfeksiyonları nedeniyle hastanede uzayan yatış sürelerinin kısaltılmasında ve özellikle tedavide sorun yaratan dirençli suşların elimine edilmesinde yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kandidalar 4-6 µm çapında, tek hücreli, tomurcuklanarak çoğalan gerçek / yalancı hifler oluşturabilen, 80S ribozomları olan ökaryot hücre yapısında fakültatif anaerop doğada ve başta gastrointestinal sistem olmak üzere tüm mukozal yüzeylerde ve deride normal flora elemanı olarak bulunabilen mikroorganizmalardır (1).

Kandidalar 200'den fazla tür içermektedir. Bunlardan *C. albicans* başta olmak üzere *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea*, *C. rugosa* gibi türlerin insanlarda patojen oldukları bilinmektedir (1).

2.1. Kandida Enfeksiyonları

Kandida enfeksiyonları tüm dünyada yaygın görülen basit, invaziv olmayan mukokutanöz kandidiyazdan sistemik invaziv kandidiyaza kadar değişen, endojen ve ekzojen kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlardır. Endojen enfeksiyon özellikle hastaların florasında bulunan kandidalardan kaynaklanmaktadır. Ekzojen enfeksiyondan ise, başta sağlık personelinin elleri olmak üzere, kontamine biyomateryaller ve sıvılar, hastane ortamında kullanılan kataterler sorumlu tutulmaktadır (2, 14, 15). Santral venöz kataterlerin, periferik venöz kataterlere göre daha yüksek enfeksiyon riskine neden olduğu saptanmıştır. Kandida türlerinin biyolojik materyallerde biyofilm oluşturması, sürekli enfeksiyon odağı olarak rol oynamasına ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulmasına neden olmaktadır (2, 15).

Mukokutanöz kandidiyazda *C. albicans* en önemli etken olup; oral kandidiyaz (pamukçuk), kandida özefajiti, vulvovajinit ve balanit, primer kutanöz kandidiyaz, onikomikoz ve kronik mukokutanöz kandidiyaz şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Kandidemi basit olarak kanda kandidaların bulunması olarak tanımlansa da klinikte, ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), hipotermi ($<36^{\circ}\text{C}$), lökositoz, lökopeni, taşikardi, takipne, hipotansiyon (sistolik kan basıncı ≤ 90 mmHg) ve oligüri (<20 mL/saat) bulgularından en az biri olan olguların en az bir kan kültüründe kandida izole edilmesidir. Tanı ve tedavisi zor %40 oranında mortaliteye sahip ciddi bir klinik tablodur (2).

Kandidemilerin %95-97'sinden *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*, %3-5'inden ise *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* gibi farklı türler sorumlu tutulmaktadır. Ülkeler arasında tür dağılımı yönünden farklılık görülmektedir (14). Avrupa ülkelerinde ve Türkiye'de *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, *C. albicans*'tan sonra en sık kandidemi yapan türler arasında yer almaktadır (15).

Kandidaların kan dolaşımına ulaşmaları GİS mukozasından, damar içi kataterler yoluyla, pyelonefrit gibi lokalize enfeksiyon kaynağından olmaktadır. Hem yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda hem de nötropenik hastalarda kandidaların kan dolaşımına en fazla geçiş yolunun gastrointestinal sistemden penetrasyonla olduğu kabul edilmektedir (2). Tablo 2.1'de kandidemi gelişiminde rol oynayan başlıca risk faktörleri özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Kandidemi gelişmesinde rol alan risk faktörleri (2)

Erişkinde risk faktörleri	Yenidoğanda risk faktörleri
Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı	Düşük gestasyonel yaş
Santral venöz katater	Gastrointestinal hastalık
Total parenteral nutrisyon	Konjenital malformasyonlar
Mekanik ventilasyon	Şok
İmmüno-supresyon	

2.2. Epidemiyoloji

Candida albicans 1990'lı yıllardan önce en sık kandidemi etkeni olmasına rağmen, son yıllarda albicans dışı kandida türlerinde artış olduğu gösterilmiştir. Bu artışın nedeni olarak profilaktik ve ampirik olarak antifungallerin yaygın kullanımı gösterilmektedir (14, 15, 16).

Albicans dışı kandidalarda ilk sıralarda yer alan *C. parapsilosis*, ekzojen patojendir ve deri üzerindeki kolonizasyon oranlarının, mukozal yüzeylere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (14). Kataterler üzerinde biyofilm oluşturarak tedaviye direnç gelişmesine neden olmakta, hastanede yatan hastalar arasında nozokomiyal yolla veya hastane personelinin elleri ile taşınmaktadır (16). Bir diğer etken olan *C. glabrata* suşlarının onkoloji hastalarında insidansının arttığı gösterilmiştir (14). Sık görülen diğer albicans dışı kandidalardan *C. tropicalis* ve *C. krusei* kan ve kemik iliği transplantasyonu yapılacak olan hastalarda önemli enfektif patojenlerdir (14). *Candida guilliermondii* hastanede yatan

hastalarda kolonize olan, flukonazol duyarlılıklarında görülen azalma ile önem kazanmaktadır.

Yapılan birçok çalışmada, kandidemi etkenlerinin dağılımı ve insidansının ülkeden ülkeye, aynı ülkede yıllar arasında hatta hastaneler arasında değiştiği bildirilmiştir (15).

2.3. Tanı

Kandidalar, normal cilt florasında yer almaları nedeni ile birçok örnekte bulunmaları tek başına tanı koydurucu olmamaktadır. Enfeksiyon kolonizasyon ayrımı için mutlaka klinik bulgularla beraber değerlendirilmelidir. Hemokültürlerden izole edildiğinde kesin kandidemi tanısı koyulamamakta, ayrıca kandidemili hastalarda izolasyon şansı düşük olmaktadır. Kandida tanısının hızlı ve doğru bir şekilde koyulması için örnekler uygun koşullarda laboratuvara gönderilmeli ve saklanmalıdır. Klinik örnekler aseptik koşullar altında ve antifungal tedavi öncesinde alınmalı en geç 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır (17).

2.3.1. Direkt Mikroskopi

Kandida şüphesi ile gönderilen hasta materyallerinden hazırlanan preparatlar lam lamel arası incelenebileceği gibi gram veya histolojik boyalar ile boyanabilmektedir. Mikroskopik değerlendirme öncesi %10'luk potasyum hidroksit kullanılması, epitel hücrelerinin lizise uğramasını sağlayarak, daha iyi tespit edilmesini sağlar. Mikroskopik inceleme ile psödohif yapılarının görülmesi özellikle mukokutanöz kandida enfeksiyonlarının tanısında değerlidir (1).

2.3.2. İzolasyon

Kandidalar, rutin laboratuvarlarda kullanılan kanlı agar, MacConkey agar gibi besiyerlerinde kolaylıkla 24-48 saatte üreyebilmektedirler. Maya kolonileri kültür plaklarında beyaz-opak renkte nemli görünümündedir ve kendisine özel bir kokusu ayrılmaktadır (18).

Klinik örneklerden kandida izolasyonunda kullanılan Sabouraud dekstroza (SDA), bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılamak ve seçici özellik sağlamak için sikloheksimid, gentamisin ve kloramfenikol gibi antimikrobiyal ajanlar eklenebilmektedir (18).

Yapılan çalışmalarda kromojenik besiyerleri de kandidaların izolasyonunda kullanılmaya başlanmıştır. En sık kullanılan CHROMagar besiyerinde kandida türlerinin koloni morfolojileri ve rengine göre ayrılmaktadır. Bu besiyerinde *C. albicans* yeşil, *C. tropicalis* mavi, *C. krusei* toz pembe, *C. glabrata* mor renkte, *C. parapsilosis* ise parlak beyaz koloniler oluşturmaktadır (19).

Otomatize hemokültür sistemlerinden olan BacT/ALERT3D (bioMerieux) veya BACTEC 9240 (Becton Dickinson) ayrıca isolator gibi sistemler kandida izolasyonunda kullanılabilir (1).

2.3.3. Tiplendirme

Kandidaların tiplendirilmesinde ilk olarak hızlı sonuç veren ve uygulaması kolay olan germ tüp testi yapılmaktadır. Bu test *C. albicans*'ın albicans dışı kandidalardan ayrılmasını sağlamaktadır. *C. albicans* dışında *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis*'de germ tüp oluşturan kandida türlerindedir. Diğer albicans dışı kandidalardan ise *C. tropicalis*, *C. kefir*, *C. krusei*'de psödoderm tüp oluşumu görülebilmektedir (1).

Kandidaların morfolojik yapılarını incelemek amacı ile mısır unlu tween 80 besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyeri kandidaların blastokonidya, klamidospore ve yalancı hif üretimini arttırmaktadır (18).

Biyokimyasal tanıda karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleri kullanılmaktadır. Karbonhidrat asimilasyon testinde, mayaların oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak çeşitli karbonhidratları kullanabilme özelliği, karbonhidrat fermantasyon testinde ise mayaların farklı karbonhidratları fermente ederek gaz oluşturup oluşturmadıkları araştırılmaktadır. Biyokimyasal tanıda kullanılmak üzere ticari olarak piyasada çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testlerden en sık kullanılanlar API 20C AUX (BioMerieux, Franca), API ID 32C (BioMerieux, Franca), Auxader (Sanofi Diagnostics Pasteur, France) ve Uni-Yeast Tek (Remel Laboratories, Lenexa, Kan.) kitleridir (20).

2.3.4. Diğer Tanı Yöntemleri

Kültür ve biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinden başka serolojik ve moleküler tanı yöntemleri de kandida enfeksiyonlarında kullanılmaktadır.

Serolojik Tanı

Antikor arayan testler başarılı sonuç vermemekte bu nedenle antijen testleri tercih edilmektedir. Bu amaçla; mannan, D-arabinitol, enolaz ve β -D-glukan en çok tercih edilenlerdir. Mannan antijeni, kandida hücre duvarında bulunmakta olup kandida enfeksiyonlarında kanda saptanabilmektedir. Fakat bu antijenin kandaki seviyelerinin hızla düşmesi nedeniyle bu testin sık olarak tekrarlanması gerekmektedir (21). Kandidaların hücre duvarında bulunan diğer antijen 1-3 β -D-glukandır. Bu antijenin kanda saptanabilmesi için 2004 yılında FDA tarafından onaylanmış Fungitell testi piyasada ticari olarak bulunmaktadır (1).

Moleküler Tanı

Candida albicans gen sekansı 2004 yılında tanımlanmış (22) ve moleküler tanı yöntemleri hızla uygulanmaya başlamıştır. Moleküler tanı yöntemleri direkt klinik materyalden (kan, serum, plasma, steril vücut sıvıları ve doku örnekleri) kandidiyaz tanısı koyulabilmesine olanak sağlarken pahalı olması, standardizasyonun olmaması nedeni ile rutin laboratuvarlarda tercih edilmemektedir (17).

Moleküler tanıda kullanılan Real-time PCR, floresan ile işaretlenmiş türe spesifik problemlerin kullanıldığı yeni bir yöntemdir. Bu yöntemin kısa sürede sonuç vermesi, kontaminasyon riskinin az olması ve tür düzeyinde identifikasyon yapması gibi avantajları bulunmaktadır (23).

2.4. Antifungal İlaçlar

Kandida enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan 4 grup antifungal ilaç tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Kandida enfeksiyonlarında kullanılan antifungal ilaçlar

Poliyen grubu antifungal ilaçlar	AmB
Azol türevi antifungaller	Ketokonazol Flukonazol Itrakonazol Vorikonazol
Yeni azol antifungaller	Posakonazol Ravukonazol İsavukonazol Albakonazol
Nükleik asit sentez inhibitörleri	5-fluorositozin
Hücre duvarına etkili ajanlar (Ekinokandinler)	Kaspofungin Mikafungin Anidulafungin

2.4.1. Azol Grubu Antifungaller: Flukonazol

Azoller, fungustatik etki gösteren antifungallerdir. Bu etkilerini, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzim olan sitokrom P450'ye bağlı 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek göstermektedirler (1). Kandida enfeksiyonlarının profilaksi ve tedavisinde en sık kullanılan azol flukonazoldür.

Fungustatik etkisini sitoplazmik membran üzerinden göstermektedir. *Candida albicans* türleri flukonazole duyarlı iken, albicans dışı kandidalarda flukonazol direnç oranları daha yüksektir. Albicans dışı kandida türlerinden özellikle *C. krusei*, flukonazole doğal dirençli iken *C. glabrata* suşları flukonazole genellikle dirençli veya doza bağlı duyarlıdır (24).

2.4.2. Flukonazol Direnç Mekanizmaları

Son yıllarda flukonazolun tedavi ve profilakside yaygın olarak kullanımı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda flukonazol direncinin birden fazla mekanizma ile meydana geldiği gösterilmiştir (25). Bu mekanizmalar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Sterol sentezinde rol alan 14 α -demetilaz enziminin inhibe edilmesi ile kandidaların plazma membranında biriken steroller membranın akışkanlığının ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (25).
2. Sterol sentezinde rol alan 14 α -demetilaz enzimini kodlayan ERG11 genindeki mutasyonlar, substrat ve inhibitörün enzime bağlanmasını etkilemektedir (25).

3. ERG11 geninin aşırı ekspresyonu ile protein miktarı artmakta ve flukonazolun yetersiz kalmasına neden olmaktadır (25).
4. Membran transport protein genlerinden olan CDR1, CDR2, MDR1 genlerinin aşırı ekspresyonu antifungal ilaçların efflüksünü artırmaktadır. Bu genlerin inaktive olması antifungallerin hücre içinde birikmesine neden olmaktadır. CDR1 gen inaktivasyonu *C. albicans*' larda çoklu ilaç direncinden sorumlu iken, MDR1 gen inaktivasyonu sadece flukonazol direncinde önemini korumaktadır. CDR2 gen mutasyonlarının hücre içi flukonazol birikimi üzerine olan etkisi gösterilememiştir (26).
5. Biyofilm oluşumu, kandidalarda ilaç penetrasyonunu azaltmakta ve ilacın matriks dışına atılmasına neden olmaktadır (27).
6. Kandida patogeneğinde rol oynayan secreted aspartic protease (SAP), 10 üyeden oluşan SAP gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. SAP, *C. albicans* dışında *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* tarafından salgılanarak konak doku invazyonu ve adezyonu sonucunda konağın hücre ve moleküllerini parçalayarak antimikrobiyallere direnç gelişmesine neden olmaktadır (27).

2.4.3. Diğer Antifungaller

Kandida tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan Amfoterisin B (AmB), fungal membranda yer alan en önemli sterol olan ergosterole bağlanarak fungusidal etki göstermektedir. Ekinokandinler, fungal hücre membranında protein yapısında bir makromolekül olan ve hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan β -1,3 D glukoz sentezini inhibe ederek fungusidal etki gösteren ilaçlardır (29). Flusitozin, sentetik florlanmış pirimidin analogudur ve mantar hücrelerinde aktif metaboliti 5-florourasile dönüşmektedir. 5-FU protein ve DNA sentezini inhibe etmektedir (1).

2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

İnvitro antifungal duyarlılık testleri, epidemiyolojik çalışmalarda ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık olarak kullanılmaktadır. Direnç oranlarındaki artış, antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyon çalışmalarına olan gereksinimi arttırmıştır (30).

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) yeni adı ile Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI)'in antifungal duyarlılık alt komitesi 1982 yılından beri kandidalarda standardizasyon çalışmalarını sürdürmektedir (28). İlk olarak 1992 yılında M27, daha sonra sırası ile 1995'de M27-T, 1997'de M27-A, 2002'de M27-A2 ve son olarak 2009 yılında M27-A3 antifungal duyarlılık test kriterleri yayınlanmıştır (31, 32, 33, 34, 28). CLSI tarafından mayaların antifungal duyarlılıklarının araştırılması için önerilen referans yöntemde kandidalarda azol grubu ilaçlar, ekinokandinler ve flusitozin için direnç sınır değerleri belirlenmiş, amfoterisin B (AmB) içinse henüz saptanmamıştır (34).

2.5.1. Dilüsyon Yöntemleri

CLSI M27-A3 kriterlerine göre, mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemlerinin standardizasyonu en son halini almıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antifungal duyarlılık testleri içinde en yaygın kullanılan yöntem haline gelmiştir. (28).

2.5.2. Difüzyon Yöntemi

Tüm dünyada antibakteriyel duyarlılık testleri için en sık kullanılan yöntem disk difüzyon yöntemidir. CLSI M44-A kriterlerine göre standart disk difüzyon yönteminde flukonazol (25µg) ve vorikonazol (1µg) diskleri kullanılarak kandidalarda da bu yöntem geliştirilmiştir. Kandida izolatlarının flukonazol için disk difüzyon yöntemi ile sınır değerleri; duyarlı suşlarda ≥ 19 mm, orta duyarlılarda=15-18 mm, dirençli suşlarda ise ≤ 14 mm olarak belirlenmiştir (28).

2.5.3. E Test:

Etest şeritleri, üzerinde dengeli bir şekilde giderek artan konsantrasyonda antifungal ilaç içermektedir. Bu antifungal duyarlılık yöntemi, difüzyon temeline dayanmaktadır. AmB, flukonazol, 5- flusitozin, ketokonazol, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin için Etest şeritleri ticari olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda standart mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırıldığında Etest yöntemi ile elde edilen sonuçlar benzer bulunmuştur (35, 36).

2.6. Kandida Enfeksiyonlarında İlaç Etkileşimleri

İnvaziv kandidiyazda hızlı ve etkili tedavi ihtiyacı her geçen gün artış göstermektedir. Kandida enfeksiyonlarında özellikle invaziv formlarında özellikle biyofilm oluşumu gibi nedenlerden dolayı bazen monoterapiler başarılı olamamaktadır (37). İlaç kombinasyonlarının önemli avantajları arasında sinerjistik etkinin oluşması, ilaçların etki

spektrumlarının artması ve direnç oranlarındaki azalma yer almaktadır. Antagonistik etkinin saptanması, toksik etki ve maliyetin artması kombine ilaç tedavilerinin kullanımını kısıtlamaktadır (10, 38).

Kombine kullanım için İnvitro ilaç etkileşimlerinin araştırılmasında sinerji, antagonist veya aditif etki saptanabilmektedir (8). Sinerji; ilaçların kombinasyonlarda tek başlarına oluşturdukları etkilerin toplamından daha fazla etki oluşturması olarak tanımlanmaktadır. Antagonizma; ilaçların kombinasyonlarda tek başlarına oluşan etkilerinin toplamından daha az etki oluşturmalarıdır. Aditif etkileşim ise kombinasyonlarda tek başına kullanıldıklarında elde edilen etkilerinin toplamının saptanmasıdır (8).

Rastlantısal olarak bazı antibiyotikler ile antifungal ilaçların birlikte kullanılması kandidalarda antifungal etkiyi arttırdığı klinik çalışmalar ile gözlenmiştir. Antifungallerin, antifungaller ve antibiyotiklerle kombine etkilerinin araştırılması kandidalarda artan direnç oranları nedeniyle önem kazanmaktadır (38).

2.6.1. Antifungal - Antifungal İlaç Etkileşimi

Antifungallerin kandidalarda farklı hedefleri etkileyerek antifungal etki göstermektedirler (30). Kombine edildiklerinde klinik sonuçlarının yüz güldürücü olması nedeniyle çok sayıda invitro çalışma yapılmaktadır.

Kandida enfeksiyonlarında en sık kullanılan antifungal ajanlardan olan, azoller ve AmB' nin invitro ortamda kombinasyon etkileri araştırıldığında antagonistik etki elde edilmiştir. Antagonistik etkiden, azollerin ergosterol sentezini azaltması ve AmB'nin ergosterole bağlanamaması sorumlu tutulmaktadır (39, 40).

Son yıllarda artan direnç nedeniyle özellikle flukonazole dirençli kandida izolatlarına fungusidal etkili ekinokandin grubu yeni antifungaller geliştirilmiştir. Ekinokandinler, hepatik sitokrom enzimlerini kullanmamaları nedeniyle flukonazol ile antagonistik etki göstermezler (29). Kaspofunginin AmB ile kombine etkisi kandan izole edilen *C. parapsilosis* klinik izolatlarında invivo ve invitro olarak araştırılmış ve sinerji saptanmıştır. Kaspofungin hücre duvar sentezini inhibe ederek AmB'nin hücre membranından geçişini arttırmaktadır (42).

Ekinokandinlerden mikafunginin kandan izole edilen *C. albicans* ve albicans dışı kandida suşlarında flukonazol ile kombine etkileri araştırılmış, öncelikle ilaç etkileşimi saptanmazken *C. albicans* ve *C. tropicalis*'de özellikle aditif etki görülmüştür (44). Mikafunginin; flukonazol, vorikonazol, AmB ve flusitozin ile kombinasyonunda, *C. glabrata* suşlarında azoller ile sinerjistik saptanmamıştır (45).

Kandida enfeksiyonlarında kullanılan ajanlarla etkileşim gösteren bir diğer antifungal olan terbinafin aslında dermatofit enfeksiyon tedavisi için geliştirilmiştir. Bir çalışmada flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında; terbinafinin, AmB ile kombinasyonlarında, azollere göre daha yüksek oranlarda sinerjistik etki saptanmıştır (41). Kaspofungin terbinafin kombinasyonları, *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. krusei* suşlarında invitro araştırılmış; *C. albicans* ve *C. kefyr* suşlarında sinerjistik etki saptanırken, *C. dubliniensis*'de ilaç etkileşimi saptanmamıştır (43).

2.6.2. Antifungal ve Diğer İlaç Etkileşimleri

Kandida enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan azol grubu antifungaller sitokrom P450 üzerinde ergosterol sentez inhibisyonu yapmaktadırlar. Çalışmalarda sitokrom P450 enzim aracılığı ile metabolize edilen ilaçların, azollerle kombinasyonlarında toksik etkilerinin arttığı gösterilmiştir. Bir çalışmada itrakonazol, ketokonazol ve posakonazolün midazolam ile kombinasyonlarında midazolamın toksik etkilerinde artış saptanmıştır (46).

Yücesoy ve arkadaşları (48), flukonazol-nonsteroid antiinflamatuvarları kombine ettikleri çalışmada sinerjistik etki saptamışlardır.

Azollerden; flukonazol, itrakonazol ve vorikonazolün amiodoron ile kombinasyonlarında sinerjistik etki saptanmıştır. Bu etki amiodoronun ergosterol sentezini engellemesi ve kandidalarda apoptozise neden olması olarak gösterilmiştir (49).

Yapılan bir çalışmada biyofilm oluşturan albicans dışı kandidalardan *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* suşlarında rifampisin-AmB kombinasyonlarının etkisini araştırılmış ve bu kombinasyonların, kandidalarda biyofilm oluşumunu azalttığını saptanmıştır (49).

Antifungal-Kinolon Etkileşimi

Kinolonlar nalidiksik asitin sentetik analogu, geniş spektrumlu antibakteriyel etkili ajanlardır. Florokinolonlar, DNA giraz enziminin gyrA kısmına bağlanarak etki gösterirler ve antifungal aktiviteleri yoktur. Ancak fungal topoizomeraz I ve topoizomeraz II enzimlerine bağlanarak fungal DNA replikasyonunu bozduğu gösterilmiştir (51, 52).

Antifungaller ile beraber kullanıldıklarında antifungal etkinliği artırabilecekleri öne sürülmüş ve bunun nedeni olarak, flurokinolonların ATP bağımlı efflux pompası aracılığı ile antifungallerin hücre içi konsantrasyonunu arttırması olduğu belirtilmiştir (4).

Diğer bir çalışmada azol dirençli suşlarda ofloksasin tek başına antifungal etki göstermezken, ofloksasin+flukonazol kombinasyonu ile sinerjistik etki saptanmış, aynı çalışmada ofloksasin+flukonazol kombinasyonunun invivo ortamda etkisi araştırıldığında farelerin yaşam sürelerinin uzamadığı ancak böbrek ve dalaklarında kandida sayılarının azaldığı saptanmıştır (51).

Stergiopoulou ve arkadaşları (6); Siprofloksasin (S)+Flukonazol (F), S+AmB ve S+CAS kombinasyonlarının duyarlı kandida izolatlarında etkilerini araştırmış siprofloksasinin tek başına antifungal etkisini saptamamışlardır. Bu çalışmada ilaç etkileşimi, kombinasyonlardaki ilaç konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiştir. Başka bir çalışmada, siprofloksasin, trovafloksasin ile AmB ve flukonazol kombine edildiğinde, hastaların yaşam sürelerinin arttığı gösterilmiştir (7).

Antifungal-Tetrasiklin Etkileşimi

Tetrasiklinler bakterilerin 30S ribozomal alt birimine bağlanıp, tRNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki göstermektedir (1). Araştırmacılar tarafından kandidalar üzerindeki antifungal+tetrasiklin kombinasyon etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır. Tetrasiklin+AmB kombinasyonlarının *C. albicans* suşunun AmB duyarlılığını 32 kat arttırmasından eflüks pompasındaki ekspresyon inhibisyonu sorumlu tutulmuştur (7). Muhamed El-Azizi (50), Doksisisiklin (D)+AmB kombinasyonlarının, albicans dışı kandidalarda AmB'nin antifungal etkisini arttırdığını, aynı zamanda biyofilm oluşumunu azalttığını saptamıştır.

2.7. İlaç Etkileşimlerinde Araştırma Yöntemleri

Aynı veya farklı grup antibiyotikler arasında ilaç etkileşimlerinin araştırılmasında birden fazla yöntem bulunmaktadır. İlaç etkileşimlerinin araştırılmasında en sık checkerboard yöntemi kullanılmaktadır. Bir diğer yöntem minimum fungusidal konsantrasyon değerlerini ölçen time-kill yöntemidir (36).

Checkerboard yöntemi ile elde edilen verilerin fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksleri hesaplanmaktadır. FİK indeks değerlerinin hesaplanması uzun yıllardır en sık kullanılan yol olmuştur. FİK modelinde, $1 = (\text{MİK kombinasyondaki A ilacı} / \text{MİK tek başına A ilacı}) + (\text{MİK kombinasyondaki B ilacı} / \text{MİK tek başına B ilacı})$ eşitliği doğru olduğunda indifferans söz konusudur yani etkileşim yoktur. FİK 0.5 ve daha az olduğunda sinerjistik etki, 4'ten büyük olduğunda ise antagonistik etki olarak değerlendirilmektedir (38). FİK indeksini hesaplamak için kombinasyonda kullanılan her iki ajanın MİK değerlerine gereksinim olduğundan, antifungal ilaçlar ve antifungal aktivitesi olmayan ilaçlar arasındaki ilaç etkileşiminin araştırılmasında, yeni analitik yöntemlere olan ihtiyaç artmıştır. Son yıllarda FİK indeks hesaplama yöntemine alternatif olarak isobolografik analiz yöntemi geliştirilmiştir (8).

İsobolografik analizlerin ilaç etkileşimlerinde kullanılması ilk olarak Loewe tarafından 1927 yılında geliştirilen etkileşim yok teorisine dayanarak gerçekleştirilmiştir (8, 10, 11, 13). Önceleri iki ilacın birlikte kullanıldığında oluşan artan veya azalan etki doğrusal isobogramlar ile değerlendirilmiştir. Daha sonra bu etkileşimin doğrusal isobogramlar ile gösterilmesinin yanlış sonuçlara neden olabileceği anlaşılmış ve doğrusal olmayan isobogramlar kullanılmaya başlanmıştır (4, 6, 12). İsobolografik analiz yönteminin temeli, kombine ilaçlarla oluşan konsantrasyon-etki regresyon eğrilerinin, ilaçların tek başlarına etkilerinden elde teorik kombinasyon eğrileri ile kıyaslamasına dayalı analizdir (12). Bu yöntem, antimikrobiyal ajanların etkileşiminin araştırılmasında kullanıldığında checkerboard plaklarının sonuçları esas alınmakta, analizlerin yapılmasını birçok istatistik yazılım programı ile desteklemektedir. Bu yöntem ile hem iki aktif ilacın hem de ilaçlardan sadece birinin aktif olduğu kombinasyonlarda ilaç etkileşim analizleri yapılabilmektedir (6, 12).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 11.03.2009 tarihinde onaylanmış (Proje no: KA 09/60) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

3.1. Maya izolatları

Projede 300 kandida suşu kullanıldı. Tüm suşlar Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara ve Adana hastanelerinin çeşitli ünitelerinde yatan hastaların hemokültürlerinden izole edildi. İdentifiye edilen suşlar çalışılncaya kadar %0.25 gliserollü Brucella buyyon besiyerinde -86°C’de saklandı.

3.2. Tiplendirme

Tüm suşlar germ tüp oluşumu, mısır-unlu tween 80’deki mikroskobik morfolojilerine ve API 20C AUX kitinde karbonhidratlara etkilerine bakılarak tiplendirildi.

3.2.1. Germ Tüp Testi

Tüm suşlara germ tüp testi kutu 3.1’de verildiği şekilde uygulandı. Mikroskobik incelemenin sonucunda, ana hücreden orijin alan ve başlangıç noktasında boğumlanma yapmaksızın filament şeklinde uzantı yapan oluşumlar izlendi. Bu oluşumlar germ tüp pozitif olarak değerlendirildi. Germ tüp pozitif olan maya kolonileri *Candida albicans/dublinskiensis* olarak tiplendirildi.

Kutu 3.1. Germ tüp test yöntemi

Gerekli Malzemeler

- ✓ SDA’da üremiş saf maya kültürleri
- ✓ İnsan serumu
- ✓ Lam, lamel
- ✓ Öze
- ✓ Etüv
- ✓ Işık mikroskobu

Deneyin Yapılması

- ✓ Saf maya kolonisinden 0.5 ml insan serumu içinde süspansiyon hazırlandı.
- ✓ 35°C’de 3 saat inkübe edildi.
- ✓ Lam – lamel arası preparat hazırlandı.

3.2.2. Mısır Unlu Tween 80 Agarda Mikroskopik Morfoloji İncelenmesi

Tüm suşlar mısır unlu Tween 80 agardaki morfolojik yapılarına göre tiplendirildi. Testin yapılışı kutu 3.2.de verildi.

Kutu 3.2. Mısır Unlu Tween 80 besiyerinin hazırlanması ve ekim yöntemi

Formül:

Mısır unu (Sigma)	40gr
Agar	20gr
Tween 80	10ml
Distile su	1000ml

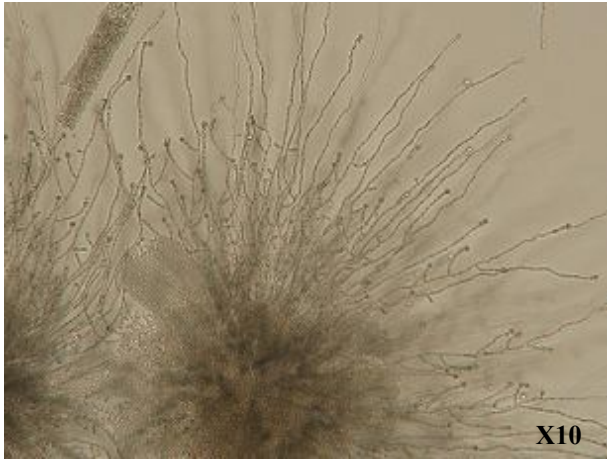
Besiyerinin Hazırlanması:

- ✓ Mısır unu tartıldı.
- ✓ Distile su içinde eritildi.
- ✓ Su banyosunda 65°C'de 1 saat bekletildi.
- ✓ Kağıt filtre yardımı ile süzüldü.
- ✓ pH 6.6+/- 6.8 ayarlandı.
- ✓ Agar ve Tween 80 eklendi.
- ✓ Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

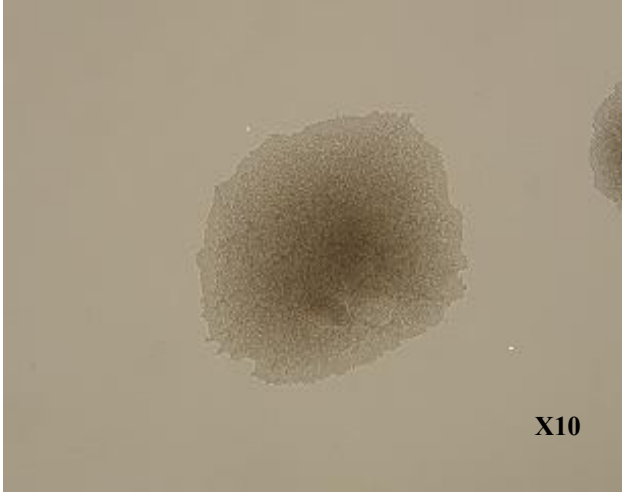
Ekim Yöntemi

- ✓ Saf maya kolonilerinden mısır unlu besiyerine birbirine paralel olacak şekilde 3 çizgi ekimi yapıldı.
- ✓ Lamel alevden geçirilerek steril edildi ve soğutuldu.
- ✓ İki alana yerleştirildi.
- ✓ Plakların etrafı parafin ile kapatıldı.

Plaklar oda ısısında 72 saat inkübe edildikten sonra ışık mikroskopundaki morfolojik görünümlerine göre değerlendirildi. Mısır-unlu Tween 80 kültür plaklarındaki pasajlar yalancı hif, gerçek hif yapıları, klamidiaspor oluşumu, blastokonidyum yapıları açısından incelendi. Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4'de kandidaların 10'luk objektifdeki mikroskopik görüntüleri verildi.



Şekil 3.1. *C. albicans* suşunun, mısır-unlu Tween 80 kültür plaklarında mikroskopik görünümü



Şekil 3.2. *C. glabrata* suşunun, mısır-unlu Tween 80 kültür plaklarında mikroskopik görünümü

3.2.3. Biyokimyasal Tiplendirme

Albicans dışı kandidaların morfolojik yapılarının incelenmesinden sonra API 20C AUX kiti ile karbonhidratlara etkisine bakıldı. API 20C AUX kiti 19'u karbonhidrat asimilasyon testleri ve biri üreme kontrol olmak üzere 20 mikrokuyucuktan oluşmaktadır. Test edilen karbonhidratlar: glukoz, gliserol, 2-keto-D-glukonat, L-arabinoz, D-ksiloz, adonitol, ksilitol, galaktoz, inozitol, sorbitol, α -metil-D-glukosid, N-asetil-D-glukozamin, selobiyoz, laktoz, maltoz, sükroz, trehaloz, melibiyoz ve rafinozdur (20).

Taze maya kolonisinden serum fizyolojik içinde McFarland 2 olacak şekilde maya süspansiyonu hazırlandı. Maya süspansiyonu kitin içindeki ampüllerde hazır olarak bulunan sıvılara 100'erül aktarıldı. Daha sonra apilerdeki mikrokuyucuklara dağıtıldı ve 35°C etüvde 48 saat inkübe edildikten sonra kitin prosedürüne uygun olarak okundu. Zayıf üreme gösteren suşların inkübasyonları bir gün daha uzatıldıktan sonra değerlendirildi.

3.3. Flukonazol Duyarlılık Testleri

Flukonazol duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI'in M27-A3 kriterlerine uygun olarak invitro olarak yapıldı. *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 suşları kalite kontrol amacıyla her teste dahil edildi (28).

3.3.1. Besiyeri

Mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılık çalışmadan önce MOPS (0.165 M morfolinpropananasulfonik asit, Sigma) ile tamponlanmış (pH: 7.0) L-glutamin içeren RPMI 1640 (Sigma) besiyeri hazırlandı (28) (kutu 3.3.).

Kutu 3.3. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması

Formül

RPMI 1640 tozu	10,4 g
MOPS buffer	34,5 g
Distile su	1000 mL
pH 7,0 +/- 0,1	

Besiyerinin Hazırlanması:

- ✓ RPMI tartıldı ve 900ml steril distile suda eritildi.
- ✓ MOPS 34,5 gr tartılarak eklendi ve eritildi
- ✓ Karışımın pH'ı 10 molar NaOH ile pH 7.0'a ayarlandı.
- ✓ Toplam hacim steril distile su ile 1000ml'ye tamamlandı.
- ✓ Çapı 0,2µm olan membran filtreden (marka) süzülerek steril edildi.

Not: Sıvı RPMI + 4°C'de en fazla 3 ay saklandı.

3.3.2. Flukonazol'ün Stok Solüsyonu

Stok solüsyonların hazırlanmasında, flukonazol'ün (Pfizer) standart toz formları kullanıldı. Flukonazol stok solüsyonu 2560 mg/L konsantrasyonunda steril distile suda hazırlandı ve -86°C'de testler yapılmaya kadar saklandı.

3.3.3. Maya Süspansiyonu

Açılan suşlar iki kere pasajlandı. Saf maya kolonilerinden PhoenixSpec (BD, France) cihazı kullanılarak serum fizyolojik ile 0,5 MacFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.

3.3.4. Plakların Hazırlanması

Besiyeri olarak MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 kullanıldı. Stok solüsyonları ilk kuyucukta 64 mg/L olacak şekilde RPMI ile sulandırıldı ve standart protokole uygun olarak 96 çukurlu U tabanlı steril mikrolaklarda (TPP, İsviçre) birinci sütuna 100'er µl dağıtıldı. Flukonazol'ün çift kat seri dilüsyonları yapıldı. Her sıradaki 12. kuyucuklar üreme kontrol olarak bırakıldı. Maya süspansiyonları tüm kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. Öncelikle flukonazol konsantrasyonları 64 – 0,06 mg/L olarak ayarlandı. Direnç saptanan suşların MİK değerlerini görebilmek için flukonazol konsantrasyonu 256 mg/L'ye çıkarılarak tekrar çalışıldı.

3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Plaklar 37°C 48 saat inkübe edildi ve sonuçlar görsel olarak değerlendirildi. Standartlara göre üremenin %50 olarak azaldığı kuyucuktaki flukonazol konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. Suşların flukonazol dirençlerine CLSI standartlarında belirlenen sınır değerlere göre karar verildi. Kandidalarda flukonazol için MİK değerleri ≤8 mg/L ise duyarlı, 16-32 mg/L arasında doza bağlı duyarlı, ≥64 mg/L ise dirençli kabul edildi.

3.4. Flukonazol ile İlaç Etkileşimlerinin Checkerboard Yöntemi ile Araştırılması

Dirençli 8, duyarlı 4 suş rastgele seçilip *C. krusei*, *C. parapsilosis* standart suşları dahil edilerek toplam 14 suшта çalışıldı. Bu suşlarda; flukonazolün kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasin ve levofloksasin, tetrasiklinlerden ise doksisisiklin ile etkileşimi standart checkerboard yöntemi modifiye edilerek araştırıldı (8, 10).

3.4.1 Stok Solüsyonlar

Flukonazol'ün duyarlılık çalışması için hazırlanan stok çözeltileri kullanıldı. Siprofloksasin (Fako, 3585), doksisisiklinin (Sigma, K0598) standart toz formları steril distile su ile sulandırılarak stok çözeltileri sırası ile 2560 mg/L, 16000 mg/L konsantrasyonlarında hazırlandı. Levofloksasinin (BD, France) standart toz formları 0,1 mol/L NaOH ile çözüldükten sonra steril distile su ile sulandırılarak stok çözeltisi 5120 mg/L konsantrasyonunda hazırlandı. Stok solüsyonlar -86°C'de testler yapılmaya kadar saklandı.

3.4.2. Maya süspansiyonları

Açılan suşlar iki kere pasajlandı. Saf maya kolonilerinden serum fizyolojik ile süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar ELx800 (Bio-Tek Instruments, INC) cihazı kullanılarak 530nm’de okutuldu ve %80 OD değeri olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan süspansiyonlar plaklarda son inokulum konsantrasyonu 5×10^2 - $2,5 \times 10^3$ CFU/ml olacak şekilde RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı.

3.4.3. Plakların Hazırlanması

Besiyeri olarak duyarlılık testlerinde olduğu gibi MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce stok ilaç çözeltileri dirençli ve duyarlı suşlar için farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde bu besiyeri ile sulandırıldı. Standart protokole uygun olarak hazırlanan ilaç sulandırılmaları 96 kuyucuklu U tabanlı mikrolaklarda kombine edildi. Hazırlanan kombinasyonlar 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6.no’lu tablolarda verildi.

A1 kuyucuğu üreme kontrol, H12 kuyucuğu ise sterilite kontrol olarak bırakıldı. Plaklar parafinlenip 37°C etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından OD değerleri ELx800 spektrofotometre cihazında 405 nm’de okutuldu.

Tablo 3.1. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Siprofloksasin konsantrasyonları

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
ÜK	S 0,03	S0,06	S0,125	S0,25	S0,5	S1	S2	S4	S8	S16	S32
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
F0,06	F0,06+ S 0,03	F0,06+ S0,06	F0,06+ S0,125	F0,06+ S0,25	F0,06+ S0,5	F0,06+ S1	F0,06+ S2	F0,06+ S4	F0,06+ S8	F0,06+ S16	F0,06+ S32
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
F0,125	F0,12+ S 0,03	F0,12+ S0,06	F0,12+ S0,125	F0,12+ S0,25	F0,12+ S0,5	F0,12+ S1	F0,12+ S2	F0,12+ S4	F0,12+ S8	F0,12+ S16	F0,12+ S32
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
F0,25	F0,25+ S 0,03	F0,25+ S0,06	F0,25+ S0,125	F0,25+ S0,25	F0,25+ S0,5	F0,25+ S1	F0,25+ S2	F0,25+ S4	F0,25+ S8	F0,25+ S16	F0,25+ S32
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F0,5	F0,5+ S 0,03	F0,5+ S0,06	F0,5+ S0,125	F0,5+ S0,25	F0,5+ S0,5	F0,5+ S1	F0,5+ S2	F0,5+ S4	F0,5+ S8	F0,5+ S16	F0,5+ S32
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
F1	F1+ S 0,03	F1+ S0,06	F1+ S0,125	F1+ S0,25	F1+ S0,5	F1+ S1	F1+ S2	F1+ S4	F1+ S8	F1+ S16	F1+ S32
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
F2	F2+ S 0,03	F2+ S0,06	F2+ S0,125	F2+ S0,25	F2+ S0,5	F2+ S1	F2+ S2	F2+ S4	F2+ S8	F2+ S16	F2+ S32
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
F4	F4+ S 0,03	F4+ S0,06	F4+ S0,125	F4+ S0,25	F4+ S0,5	F4+ S1	F4+ S2	F4+ S4	F4+ S8	F4+ S16	SK

F: Flukonazol S: Siprofloksasin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F0,06=0,06 mg/L flukonazol, S 0,03=0,03 mg/L siprofloksasin içermektedir.

Tablo 3.2. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Levofloksasin konsantrasyonları

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
ÜK	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
F0,06	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
F0,125	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
F0,25	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F0,5	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
F1	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+
	L,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
F2	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
F4	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	SK
	L0,03	L0,06	L0,125	L0,25	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	

F: Flukonazol L: Levofloksasin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F0,06=0,06 mg/L flukonazol, L0,03=0,03 mg/L levofloksasin içermektedir.

Tablo 3.3. Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Doksisisiklin konsantrasyonları

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
ÜK	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
F0,06	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+	F0,06+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
F0,125	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+	F0,12+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
F0,25	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+	F0,25+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F0,5	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+	F0,5+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
F1	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+	F1+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
F2	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+	F2+
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	D32
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
F4	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	SK
	D0,03	D0,06	D0,125	D0,25	D0,5	D1	D2	D4	D8	D16	

F: Flukonazol D: Doksisisiklin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F0,06=0,06 mg/L flukonazol, D0,03=0,03 mg/L doksisisiklin içermektedir.

Tablo 3.4. Dirençli suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Siprofloksasin konsantrasyonları

A1 ÜK	A2 S 0,06	A3 S0,125	A4 S0,5	A5 S1	A6 S2	A7 S4	A8 S8	A9 S16	A10 S32	A11 S64	A12 S128
B1 F4	B2 F4+ S 0,06	B3 F4+ S0,125	B4 F4+ S0,5	B5 F4+ S1	B6 F4+ S2	B7 F4+ S4	B8 F4+ S8	B9 F4+ S16	B10 F4+ S32	B11 F4+ S64	B12 F4+ S128
C1 F8	C2 F8+ S 0,06	C3 F8+ S0,125	C4 F8+ S0,5	C5 F8+ S1	C6 F8+ S2	C7 F8+ S4	C8 F8+ S8	C9 F8+ S16	C10 F8+ S32	C11 F8+ S64	C12 F8+ S128
D1 F16	D2 F16+ S 0,06	D3 F16+ S0,125	D4 F16+ S0,5	D5 F16+ S1	D6 F16+ S2	D7 F16+ S4	D8 F16+ S8	D9 F16+ S16	D10 F16+ S32	D11 F16+ S64	D12 F16+ S128
E1 F32	E2 F32+ S 0,06	E3 F32+ S0,125	E4 F32+ S0,5	E5 F32+ S1	E6 F32+ S2	E7 F32+ S4	E8 F32+ S8	E9 F32+ S16	E10 F32+ S32	E11 F32+ S64	E12 F32+ S128
F1 F64	F2 F64+ S 0,06	F3 F64+ S0,125	F4 F64+ S0,5	F5 F64+ S1	F6 F64+ S2	F7 F64+ S4	F8 F64+ S8	F9 F64+ S16	F10 F64+ S32	F11 F64+ S64	F12 F64+ S128
G1 F128	G2 F128+ S 0,06	G3 F128+ S0,125	G4 F128+ S0,5	G5 F128+ S1	G6 F128+ S2	G7 F128+ S4	G8 F128+ S8	G9 F128+ S16	G10 F128+ S32	G11 F128+ S64	G12 F128+ S128
H1 F256	H2 F256+ S 0,06	H3 F256+ S0,125	H4 F256+ S0,5	H5 F256+ S1	H6 F256+ S2	H7 F256+ S4	H8 F256+ S8	H9 F256+ S16	H10 F256+ S32	H11 F256+ S64	H12 SK

F: Flukonazol S: Siprofloksasin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F4=4 mg/L flukonazol, S0,06=0,06 mg/L siprofloksasin içermektedir.

Tablo 3.5. Dirençli suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Levofloksasin konsantrasyonları

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
ÜK	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
F4	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+	F4+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
F8	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+	F8+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
F16	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+	F16+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F32	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+	F32+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
F64	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+	F64+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
F128	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+	F128+
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	L128
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
F256	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	F256+	SK
	L 0,06	L0,125	L0,5	L1	L2	L4	L8	L16	L32	L64	

F: Flukonazol L: Levofloksasin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F4=4 mg/L flukonazol, L0,06=0,06 mg/L levofloksasin içermektedir.

Tablo 3.6. Dirençli Duyarlı suşlarda plaklardaki tüm kuyucuklarda Flukonazol ve Doksisisiklin konsantrasyonları

A1 ÜK	A2 D0,5	A3 D1	A4 D2	A5 D4	A6 D8	A7 D16	A8 D32	A9 D64	A10 D128	A11 D256	A12 D512
B1 F4	B2 F4+ D0,5	B3 F4+ D1	B4 F4+ D2	B5 F4+ D4	B6 F4+ D8	B7 F4+ D16	B8 F4+ D32	B9 F4+ D64	B10 F4+ D128	B11 F4+ D256	B12 F4+ D512
C1 F8	C2 F8+ D0,5	C3 F8+ D1	C4 F8+ D2	C5 F8+ D4	C6 F8+ D8	C7 F8+ D16	C8 F8+ D32	C9 F8+ D64	C10 F8+ D128	C11 F8+ D256	C12 F8+ D512
D1 F16	D2 F16+ D0,5	D3 F16+ D1	D4 F16+ D2	D5 F16+ D4	D6 F16+ D8	D7 F16+ D16	D8 F16+ D32	D9 F16+ D64	D10 F16+ D128	D11 F16+ D256	D12 F16+ D512
E1 F32	E2 F32+ D0,5	E3 F32+ D1	E4 F32+ D2	E5 F32+ D4	E6 F32+ D8	E7 F32+ D16	E8 F32+ D32	E9 F32+ D64	E10 F32+ D128	E11 F32+ D256	E12 F32+ D512
F1 F64	F2 F64+ D0,5	F3 F64+ D1	F4 F64+ D2	F5 F64+ D4	F6 F64+ D8	F7 F64+ D16	F8 F64+ D32	F9 F64+ D64	F10 F64+ D128	F11 F64+ D256	F12 F64+ D512
G1 F128	G2 F128+ D0,5	G3 F128+ D1	G4 F128+ D2	G5 F128+ D4	G6 F128+ D8	G7 F128+ D16	G8 F128+ D32	G9 F128+ D64	G10 F128+ D128	G11 F128+ D256	G12 F128+ D512
H1 F256	H2 F256+ D0,5	H3 F256+ D1	H4 F256+ D2	H5 F256+ D4	H6 F256+ D8	H7 F256+ D16	H8 F256+ D32	H9 F256+ D64	H10 F256+ D128	H11 F256+ D256	H12 SK

F: Flukonazol D: Doksisisiklin ÜK: Üreme kontrol SK: Sterilite kontrol

Tüm kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonlarının birimi mg/L'dir. F4=4 mg/L flukonazol, D0,5=0,5 mg/L doksisisiklin içermektedir.

3.5. Sonuçların Değerlendirmesi

Plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra ELx800 spektrofotometre cihazında 405nm de okutuldu. Flukonazol ve doksisisiklin kombinasyonlarının, hem $\Sigma FİK$ (toplam FİK) indeksleri hem de interaksiyon indeks değerleri hesaplandı. Diğer kombinasyonların ise sadece interaksiyon indeks değerleri hesaplandı.

3.5.1. FİK İndeks Analizi

$\Sigma FİK$ indeks değerleri hesaplanmadan önce, flukonazol ve doksisisiklinin ayrı ayrı FİK değerleri hesaplandı ve bu değerler toplandı. FİK indeks değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda verildi (52).

$$FİK F = \frac{\text{Flukonazol'un kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{Flukonazol'un tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK D = \frac{\text{Doksisisiklin'in kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{Doksisisiklin'in tek başına MİK değeri}}$$

$$\Sigma FİK = FİK F + FİK D$$

Sonuçlar $\Sigma FİK \leq 0,5$ = Sinerjistik etki, $0,5 < \Sigma FİK \leq 4$ = etkileşim yok, $\Sigma FİK > 4$ = Antagonistik etki şeklinde değerlendirildi.

Kinolonların inaktif ilaç olması nedeni ile FİK indeksleri hesaplanamadı Ancak MİK değerlerinde iki dilüsyon fazla fark olmasının, sinerji veya antagonizma lehine olduğu düşünüldü.

3.5.2 İsobolografik Analiz

Öncelikle plakların OD değerleri esas alınarak, tüm kombinasyonların yüzde üreme değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Üreme} = \frac{\text{OD değeri} - \text{SK kuyucuğunun OD değeri}}{\text{ÜK kuyucuğunun OD değeri} - \text{SK Kuyucuğunun OD değeri}} \times 100$$

Yapılan bu checkerboard analiz sonuçları, GraphPad Prism 5.0 yazılımı kullanılarak ağırlığa bağlı olmayan, doğrusal olmayan regresyon analizi ile değerlendirildi (8,12).

Regresyon Analizi

Regresyon analizi ile konsantrasyon-etki eğrileri, Emax modelinde tek başına ilaç ve kombine ilaçların sabit oranlarında elde edildi. Tek başına ilaçların eğrileri, checkerboard plaklarının birinci satır ve birinci sütundaki değerlerin girilmesi ile saptandı. İlaç etkileşimleri ise sabit oranlardaki ilaç konsantrasyonlarının toplamı ve buna karşılık gelen yüzde üreme değerleri kullanılarak araştırıldı. Analiz sonucunda R² değerleri >0,8 ve %95 güvenlik aralığında olanlar hesaplamaya dahil edildi.

Suşların EC₅₀ (%50 inhibisyon sağlayan ilaç konsantrasyonunu göstermektedir) değerleri, regresyon analiz eğrilerinden elde edildi. EC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında ilaç konsantrasyonlarına logaritmik transformasyon uygulandı.

İnteraksiyon Analizleri

İsobolografik ilaç etkileşimi analizlerinde temel olarak “Loewe additivity” teorisi kullanıldı. İlaçlar arasında etkileşim olmadığı mantığı savunulan bu teoriye göre aşağıda verilen eşitlikten temel alındı;

$$1 = \frac{C_F}{EC_{50,F}} + \frac{C_S}{EC_{50,S}}$$

Formüldeki C_F ve C_S kombinasyondaki flukonazol ve siprofloksasin konsantrasyonlarını göstermektedir. EC_{50,F} ve EC_{50,S} ise isoeffektif konsantrasyonlar olup regresyon analizinden elde edildi.

İnteraksiyon indeks analizinde temel nokta, isoeffektif teorik additive total konsantrasyon (EC_{50,THE}) ile kombinasyon eğrilerinden regresyon analizi sonucu elde edilen EC_{50mix} değerlerinin karşılaştırılmasıdır (10,11,12).

Öncelikle kombinasyonlardaki P_F değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$P_F = EC_F / EC_{MIX}$$

EC_{50,THE} hesaplaması için, öncelikle ilaçların kombinasyonlardaki konsantrasyon toplamları ve tek başına flukonazol konsantrasyonu kullanıldı. Doksisiklinlerin kandidalar

üzerinde antifungal etkilerinin olması nedeniyle bu değer hesaplanırken, aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EC_{50,THE} = \frac{EC_{50,F}}{\left((P_F + P_D) \times (EC_{50,F} / EC_{50,D})\right)}$$

Kinolonlar için ise direkt antifungal etkinin olmayışı, EC_{50} değerinin hesaplanamayacak kadar yüksek olması nedeniyle $EC_{50,THE}$ değerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EC_{50,THE} = \frac{EC_{50,F}}{P_F}$$

İnteraksiyon indeks sonuçları, EC_{50mix} 'in $EC_{50,THE}$ değerlerine oranlanması ile aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$I = \frac{EC_{50,MIX}}{EC_{50,THE}}$$

3.6. İstatiksel Analiz

Her suşun F-S, F-L, F-D kombinasyonlarındaki interaksiyon değerindeki sapmalar Wilcoxon sıralı işaret testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan interaksiyon indekslerindeki 1 değerinden büyük yönde olan sapmalar sonucu flukonazol ve kombine edildiği ilaçlar arasında antagonizma olduğuna, 1 değerinden küçük yönde sapmalar sonucu ise sinerji olduğuna karar verildi. İstatistiksel olarak anlamsız olan sapmalar ise etkileşim olmadığını gösterdi. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Duyarlılık sonuçlarının türlere göre dağılımı ki-kare (χ^2) testi ve ardından iki oran z testi ile analiz edildi. Türlerle ilişkin MİK değerlerinin dağılımı Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Söz konusu değişkenin normal dağılım göstermediği belirlendiğinden iki gruba ilişkin MİK ortalamaları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar Ortalama \pm standart sapma ($\bar{X} \pm S_x$), Ortanca değer (M), en küçük ve en büyük değerler olarak ifade edildi.

Söz konusu istatistiksel değerlendirmeler SPSS 17.0 ve MİNİTAB 15.0 istatistik yazılımları ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

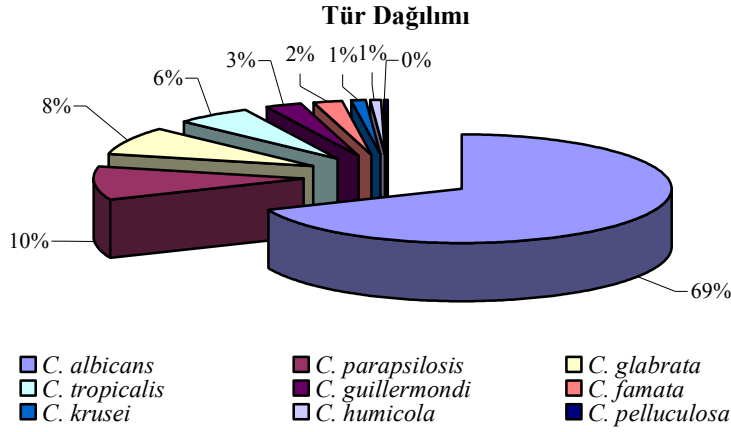
4.1. Kandida İzolatları

Toplam 300 kandida suşu BÜTF Ankara ve Adana hastanesinin çeşitli ünitelerinde yatan kandidemili hastalardan izole edildi. Aynı hastalardan bir aydan kısa sürede kandida üremesi saptanmışsa ve bu kandidalar aynı türden ise çalışmaya dahil edilmedi.

4.1.1. Tür Düzeyinde Dağılım

Kandidaların tür düzeyinde dağılımı şekil 4.1'de verildi. Çalışmaya dahil edilen tüm kandidaların, 206'sını oluşturan *C. albicans* (%69) en sık izole edilen tür oldu.

C. albicans'dan sonra tüm suşların 30'unu *C. parapsilosis* (%10), 25'ini *C. glabrata* (%8) türleri oluşturdu.



Şekil 4.1. Kandidalarda tür dağılımı

4.2. Flukonazol Duyarlılık Sonuçları

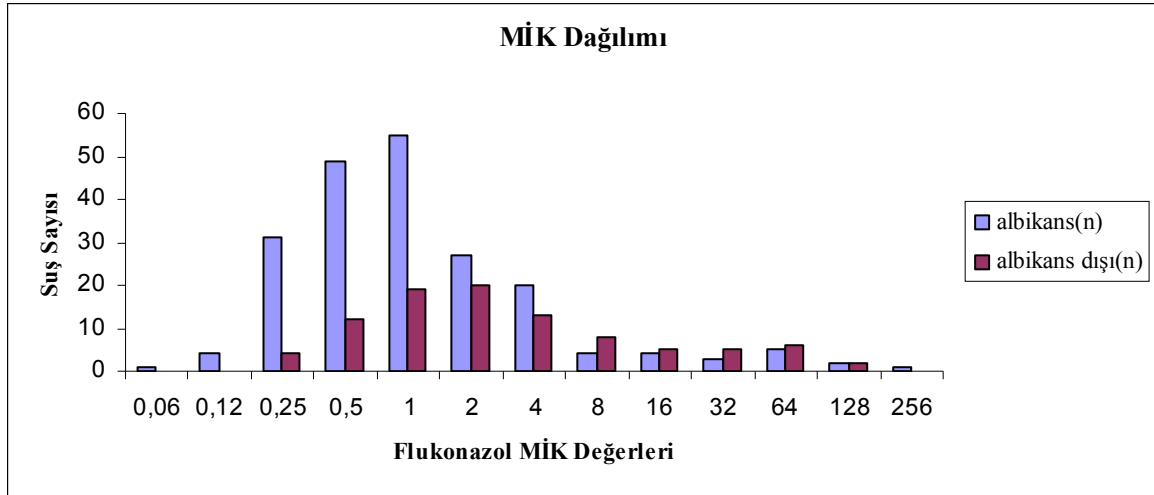
Antifungal duyarlılık testleri, 48 saatlik inkübasyonun sonunda değerlendirildi. Gözle görülebilir azalmanın olduğu kuyucuk MİK değeri olarak alındı ve tüm değerlendirmeler en az iki göz tarafından yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri albicans ve albicans dışı türlerde ayrı ayrı hesaplandı (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Kandida türlerinin MİK₅₀ ve MİK₉₀ dağılımı

Tür (n)	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Ortalama	MİK Aralığı(mg/L)
Tüm kandidalar(300)	1	32	1,57	0,125-256
<i>C. albicans</i> (206)	1	4	3,36	0,125-256
Albikans dışı kandida (94)	2	32	3,71	0,25-256
<i>C. parapsilosis</i> (30)	2	8		0,25-32
<i>C. glabrata</i> (25)	8	64		0,25-128
<i>C. tropicalis</i> (17)	1	64		0,25-64
<i>C. guilliermondi</i> (9)				0,5-2
<i>C. famata</i> (6)				1-16
<i>C. krusei</i> (4)				0,25-64
<i>C. humicola</i> (2)				0,5-4
<i>C. pelliculosa</i> (1)				64

Tüm çalışmalara eklenen standart suşların MİK değerleri, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* standart suşunda CLSI kriterlerinde belirtilen referans değerleri aralığında saptandı.

Suşların konsantrasyonlara göre MİK dağılımları, albikans ve albikans dışı kandida türleri ayrılarak şekil 4.2.'de verildi. Albikanslarda esas dağılım 1mg/L' de görülürken, albikans dışı kandidalarda 1 mg/L ve 2 mg/L' de en yüksek dağılım görüldü.



Şekil 4.2. Albikans ve albikans dışı kandidaların konsantrasyonlarına göre MİK dağılımı

Suşların MİK değerleri CLSI kriterlerine göre değerlendirildiğinde ≤ 8 mg/L ise duyarlı, 16-32 mg/L ise doza bağlı duyarlı, ≥ 64 mg/L ise dirençli kabul edildi. Bu değerlendirmeler sonucunda, 300 suşun 17'si doza bağlı duyarlı, 16'sı ise dirençli olarak saptandı. Flukonazol duyarlılıklarının türlerine göre dağılımı tablo 4.2.'de verildi. Albikansların (%93), albikans dışı türlere (%81) göre istatistiksel anlamlı şekilde daha duyarlı olduğu

görüldü. Albikans dışı kandidalarda direnç; *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pelluculosa* suşlarında saptandı.

Tablo 4.2. Duyarlılık sonuçlarının türlere göre dağılımı

Tür	Duy (%)	DBD (%)	Dir (%)	Toplam
<i>C. albicans</i>	191(93)*	7(3)	8(4)	206
Albikans dışı kandida	76(81)	10(11)	8(8)	94
<i>C. parapsilosis</i>	27(90)	3(10)	Ø	30
<i>C. glabrata</i>	16(64)	6(24)	3(12)	25
<i>C. tropicalis</i>	14(82)	Ø	3(18)	17
<i>C. guilliermondi</i>	9(100)	Ø	Ø	9
<i>C. famata</i>	5(83)	1(17)	Ø	6
<i>C. krusei</i>	3(75)	Ø	1(25)	4
<i>C. humicola</i>	2(100)	Ø	Ø	2
<i>C. pelluculosa</i>	Ø	Ø	1(100)	1
Tüm Kandidalar	267(89)	17(5,6)	16(5,4)	300

Duy: Duyarlı DBD: Doza Bağlı Duyarlı Dir: Dirençli

*p<0,01

4.3. Checkerboard Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Spektrofotometrik olarak elde edilen checkerboard plaklarının sonuçları iki farklı yöntem ile analiz edildi. Flukonazol-doksisisiklin etkileşimi için, hem FİK analizi hem de isobolografik yöntem kullanılmasına karşın, kinolonların sonuç değerlendirilmesi esas olarak isobolografik analiz ile yapıldı.

4.3.1. FİK İndeks Analizi

Çalışmaya alınan 16 suşun doksisisiklin MİK'lerine bakıldığında flukonazole duyarlı suşlarda 0,5-2 mg/L saptanırken, dirençli suşlarda bu oranın 64-128 mg/L değerlerine çıktığı görüldü. Suş sayısı çok az olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılamadı. Bu nedenle dirençli suşların analizlerinde doksisisiklin konsantrasyonu 512 mg/L'den , duyarlı suşlarda ise 32 mg/L' den başlatıldı.

Her bir kombinasyonda ayrı hesaplanan FİK değerlerinin ortalaması alınarak, FİK indeksleri hesap edildi. Çalışmaya alınan suşların flukonazol ve doksisisiklin MİK değerleri ve FİK indeksleri tablo 4.3.'de verildi. FİK indeks analizlerine göre 41 no'lu duyarlı sušta antagonizm saptandı ($\Sigma FİK > 4$), diğer suşlarda etkileşim görüldü. $\Sigma FİK$ değerlerinde belirgin bir etkileşim görülmemesine karşılık, yüksek doksisisiklin konsantrasyonlarının

bulunduğu kombinasyonlarda antagonizma görüldü. Ancak anlamlı sonuç bulunamadı. Tüm suşların MİK değerleri ve Σ FİK indeks analiz sonuçları tablo 4.3.'de verildi.

Flukonazol'un kinolonlarla kombinasyonlarında, kinolonların etkisiz ajan olması nedeniyle FİK indeks analizi kullanılmadı. Ancak kombinasyonlarda hiçbir suşda bir dilüsyondan fazla MİK değişikliği saptanmadı.

Tablo 4.3. Duyarlı ve dirençli suşlarda FİK indeks analiz sonuçları

Suş no(tür)	F MİK(mg/L)	D MİK(mg/L)	Σ FİK mg/L	Sonuç
Duyarlı				
11(<i>C.albicans</i>)	0,5	0,5	1,74	Etkileşim Yok
41(<i>C.albicans</i>)	1	1	4,93	Antagonizma
98(<i>C.albicans</i>)	2	2	1,36	Etkileşim Yok
102(<i>C.albicans</i>)	1	2	2,36	Etkileşim Yok
<i>C.parapsilosis</i>	4	2	1,36	Etkileşim Yok
Dirençli				
272(<i>C.albicans</i>)	128	128	1,11	Etkileşim Yok
270(<i>C.albicans</i>)	128	128	1,86	Etkileşim Yok
273(<i>C.albicans</i>)	64	64	2,27	Etkileşim Yok
230(<i>C.albicans</i>)	256	64	1,98	Etkileşim Yok
292(<i>C.glabrata</i>)	128	128	1,39	Etkileşim Yok
227(<i>C.glabrata</i>)	64	64	2,14	Etkileşim Yok
110(<i>C.tropicalis</i>)	64	64	2,17	Etkileşim Yok
268(<i>C.tropicalis</i>)	64	64	2,22	Etkileşim Yok
<i>C.krusei</i>	64	64	2,04	Etkileşim Yok

F: Flukonazol D: Doksisisiklin

4.3.2 İsobolografik Analiz

Suşların checkerboard analiz sonuçları yüzde üreme değerleri GraphPad yazılım programına girildikten sonra elde edilen regresyon eğrilerden EC₅₀ değerleri hesaplandı. Buna göre dirençli suşlarda flukonazol'un kombinasyonlardaki EC₅₀ değerlerinin ortancaları ve aralıkları, siprofloksasin ile kombinasyonlarında 33,09 (5,4-69,8) mg/L, levofloksasin ile kombinasyonlarında 33,49 (9,3-81,8) mg/L, doksisiklin ile kombinasyonlarında 49,48 (36-54,8) mg/L olarak belirlendi. Duyarlı suşlarda ise siprofloksasin, levofloksasin ve doksisiklin kombinasyonlarında EC₅₀ değerleri sırası ile; 0,18 (0,12-0,9), 0,24 (0,07-0,8) ve 0,5 (0,2-1,2) mg/L idi. Antifungal etkinliği saptanan doksisiklinin EC_{50,THE} değerleri, kinolonlarda farklı bir formül ile hesaplandı.

Flukonazol ve Doksisiklin Etkileşimi

Duyarlı suşlardan 102 no'lu suşun F+D konsantrasyonlarını içeren tüm kombinasyonlarında interaksiyon indeks değerleri 1'in altında 41 ve *C. parapsilosis*'te ise 1'in üzerinde saptandı. Duyarlı suşların flukonazol-doksisiklin interaksiyon indeksleri ise tablo 4.4.'de verildi.

Tablo 4.4. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Doksisiklin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki interaksiyon değerleri (P _F)								
	1/4 (0,2)	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)	1/0,25 (0,80)	1/0,12 (0,889)	1/0,06 (0,96)	1/0,03 (0,98)	1/0,01 (0,99)
98	2,77	1,34	1,05	1,03	1,10	1,56	1,09	0,03	0,63
102	0,14	0,13	0,13	0,19	0,14	0,11	0,11	0,11	0,11
11	0,0	0,03	0,00	0,7	1,01	0	0,94	0,03	1,60
41	1,19	1,34	1,20	1,75	1,23	2,07	2,33	1,63	3,28
<i>C.parapsilosis</i>	1,10	1,46	1,19	1,43	1,12	0,87	1,03	1,05	1,05

Dirençli suşların beşinde, F+D konsantrasyonlarını içeren tüm kombinasyonlarda interaksiyon indeks değerleri 1'in üzerinde saptandı. Dirençli suşların flukonazol-doksisiklin interaksiyon indeksleri ise tablo 4.5.'de verildi.

Tablo 4.5. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Doksisisiklin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki interaksiyon değerleri (P _F)						
	1/8 (0,11)	1/4 (0,2)	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)	1/0,25 (0,80)	1/0,12 (0,88)
110	1,85	1,59	1,69	1,30	1,67	1,16	1,17
272	1,86	1,57	1,66	1,43	1,00	0,82	0,75
227	2,03	1,90	1,65	1,49	1,58	1,40	1,28
273	2,36	2,60	3,03	2,11	1,55	1,27	1,19
268	2,62	2,60	1,69	1,22	0,96	1,21	1,09
230	2,12	2,19	1,59	1,28	1,41	1,40	1,52
270	1,86	1,57	1,66	1,43	1,00	0,82	0,75
292	1,64	1,64	1,56	1,71	1,25	1,02	1,08
<i>C.krusei</i>	2,16	1,44	1,59	1,11	0,96	0,94	1,07

Tüm suşların flukonazol ve doksisisiklin interaksiyon indekslerinin istatistiksel değerlendirme sonucunda elde edilen veriler tablo 4.6’da verildi. Dirençli suşların beşinde, duyarlı suşların birinde antagonizma görüldü. Dirençli suşlarda sinerji elde edilmezken, duyarlı suşlardan bir tanesinde sinerji saptandı.

Tablo 4.6. Test edilen suşlarda Flukonazol-Doksisisiklin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları

Suş no	I değeri	p değeri	Sonuç
98	1.098	0.1797	Etkileşim Yok
102	0.1323	<0.01	Sinerji
11	0.03484	0.1797	Etkileşim Yok
41	1.633	<0.01	Antagonizma
<i>C.parapsilosis</i>	1.100	<0.05	Antagonizma
110	1.599	<0.05	Antagonizma
272	1.436	0.4531	Etkileşim Yok
227	1.589	<0.05	Antagonizma
273	2.118	<0.05	Antagonizma
268	1.221	0.1250	Etkileşim Yok
230	1.529	<0.05	Antagonizma
270	1.976	0.4531	Etkileşim Yok
292	1.569	<0.05	Antagonizma
<i>C.krusei</i>	1.112	0.4531	Etkileşim Yok

Flukonazol ve Kinolon Etkileşimi

Kandidalar için inaktif olan kinolonların, flukonazol ile etkileşimleri kombinasyonlarda isoeftif teorik aditif total konsantrasyon ile karşılaştırılarak elde edildi. Duyarlı suşların flukonazol-siprofloksasin interaksiyon indeksleri ise tablo 4.7.'de verildi. Duyarlı suşlarda sinerji saptanamamasına rağmen özellikle 98 ve 102 no'lu suşlarda siprofloksasinin düşük oranlarında interaksiyon indekslerinin birin altına indiği görüldü.

Tablo 4.7. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Siprofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki interaksiyon değerleri (P _F)						
	1/32 (0,03)	1/16 (0,05)	1/8 (0,11)	1/4 (0,2)	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)
98	1,35	1,64	0,35	0,38	0,37	1,44	0
102	1,37	1,2	0,91	0,12	0,96	0,52	0,7
11	1,45	1,34	1,13	1,03	1,42	1,24	1,16
41	3,33	HD	1,24	1,31	0,95	1,24	1,32
<i>C.parapsilosis</i>	0,43	4,3	1,42	2,1	1,43	0,69	1,21

HD: Hesaplanamaz değer

Tablo 4.8.'de dirençli suşların flukonazol-siprofloksasin isobolografik analiz sonucunda elde edilen interaksiyon indeksleri, sabit oranlarındaki kombinasyonlara göre verildi. Siprofloksasinin kombinasyonlardaki konsantrasyon oranına göre değerlendirildiğinde düşük veya yüksek oranlarda belirgin bir fark görülmedi.

Tablo 4.8. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Siprofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki interaksiyon indeks değerleri (P _F)								
	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)	1/0,25 (0,80)	1/0,12 (0,88)	1/0,06 (0,94)	1/0,03 (0,96)	1/0,01 (0,98)	1/0,005 (0,99)
110	HD	1,04	1,07	1,05	1,02	1,1	1,05	1,13	1,09
272	HD	1,04	1,06	1,06	0,85	1,06	1	1,05	1,08
227		2,12	1,74	1,7	1,54	1,72	1,66	1,85	1,78
273		2,38	2,08	2,08	2,15	2	1,97	0,26	0,68
268	HD	1,14	1	1,13	0,93	0,03	0,65	0,76	1,45
230		0,81	1,29	1	1,15	1,1	1,31	1,31	1,37
270		0,95	0,6	0,84	1,27	1,02	0,63	0,53	0,88
292		1,64	1,27	1,29	1,88	1,44	1,08	1,31	1,28
<i>C.krusei</i>		1,59	0,76	0,89	0,94	0,13	0,71	0,05	1,23

HD: Hesaplanamaz değer

Tüm suşların flukonazol ve siprofloksasin interaksiyon indekslerinin istatistiksel değerlendirme sonucunda elde edilen veriler tablo 4.9’da verilmiştir. Dirençli suşların dördünde, duyarlı suşların birinde antagonizma görüldü. Hiçbir suşda sinerji saptanmadı.

Tablo 4.9. Test edilen suşlarda Flukonazol-Siprofloksasin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları

Suş no	I değeri	p değeri	Sonuç
98	0,37	1	Etkileşim yok
102	0,9	0,45	Etkileşim yok
11	1,23	<0,05	Antagonizma
41	1,27	0,21	Etkileşim yok
<i>C.parapsilosis</i>	1,42	0,45	Etkileşim yok
110	1,06	<0,01	Antagonizma
272	1,05	0,28	Etkileşim yok
227	1,72	<0,01	Antagonizma
273	2,07	0,17	Etkileşim yok
268	0,96	1	Etkileşim yok
230	1,28	<0,01	Antagonizma
270	0,84	0,17	Etkileşim yok
292	1,29	<0,01	Antagonizma
<i>C.krusei</i>	0,88	0,5	Etkileşim yok

Duyarlı suşların Flukonazol-levofloksasin kombinasyonlarındaki I değerlerine bakıldığında konsantrasyon oranlarına göre fark görülmedi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Duyarlı suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Levofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki interaksiyon değerleri (P _F)						
	1/32 (0,03)	1/16 (0,05)	1/8 (0,11)	1/4 (0,2)	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)
98	0,61	0,4	0,03	0,89	HD	0,66	0,83
102	0	1,03	0,55	2,4	0,7	0,01	3,14
11	1,58	1,53	1,52	1,59	1,57	1,58	1,61
41	6,29	0,78	0,85	1,2	0,71	0,78	1,34
<i>C.parapsilosis</i>	0,36	0,7	0,98	1,13	1,31	1,09	0,87

HD: Hesaplanamaz değer

Dirençli suşların flukonazol, levofloksasin kombinasyonlarında sabit oranlardaki I değerleri tablo 4.11’de verildi. Levofloksasinin kombinasyonlardaki oranına göre bakıldığında belirgin bir fark görülmedi.

Tablo 4.11. Dirençli suşlarda sabit konsantrasyonlarda Flukonazol ve Levofloksasin kombinasyonunun interaksiyon indeksleri

Suş no	Sabit oranlardaki kombinasyonlarda interaksiyon değerleri (P _F)								
	1/2 (0,33)	1/1 (0,5)	1/0,5 (0,66)	1/0,25 (0,80)	1/0,12 (0,88)	1/0,06 (0,94)	1/0,03 (0,96)	1/0,01 (0,98)	1/0,005 (0,99)
110	1,02	1,3	1,05	1,05	0,94	0,9	0,96	1	0,93
272	0,25	0,72	7,05	0,81	0,76	0,81	0,77	0,83	0,84
227	0,55	0,79	0,81	0,61	0,67	0,58	0,72	0,63	0,63
273	0,69	0,93	1,03	0,78	0,8	0,95	1,22	1,09	1,32
268	0,62	1,12	1,1	1,24	1,07	1,12	1,18	1,33	1,85
230	0,31	1,05	HD	0,81	1,03	0,95	0,98	0,92	0,98
270	1,25	1,73	3,89	9,33	0,8	1,42	1,33	1,49	1,93
292	1,08	1,17	1,24	1,09	1,07	1,28	1,1	1,1	1,33
<i>C.krusei</i>	1,27	1,3	1,43	1,44	1,41	1,53	1,38	1,47	1,74

HD: Hesaplanamaz değer

Flukonazol–levofloksasin etkileşim sonuçları tablo 4.12.’de verildi. Dirençli suşların ikisinde sinerji görüldü. Antagonizma ise 3 dirençli, 1 duyarlı suşta saptandı.

Tablo 4.12. Test edilen suşlarda Flukonazol-Levofloksasin kombinasyonlarının etkileşim sonuçları

Suş no	I değeri	p değeri	Sonuç
98	0,65	0,12	Etkileşim yok
102	0,7	1	Etkileşim yok
11	1,5	<0,05	Antagonizma
41	0,84	1	Etkileşim yok
<i>C.parapsilosis</i>	1	0,97	Etkileşim yok
110	1	1	Etkileşim yok
272	0,8	<0,05	Sinerji
227	0,63	<0,01	Sinerji
273	0,95	1	Etkileşim yok
268	1,12	<0,05	Antagonizma
230	0,96	0,28	Etkileşim yok
270	1,49	<0,05	Antagonizma
292	1,1	<0,01	Antagonizma
<i>C.krusei</i>	1,43	0	Etkileşim yok

Yapılan analizlerin ortak etkileşim sonuçları tablo 4.12’de verildi. Buna göre iki suşta hem siprofloksasin hem de levofloksasin ile antagonizma saptandı. FİK indeks ile antogonizma saptanan bir suşta isobolografik analizlede antogonizma saptandı ancak etkileşimin görülmediği 6 suşta antogonizma bir suşta ise sinerji görüldü.

Tablo 4.13. Yapılan tüm analiz sonuçlarının suşlara göre dağılımı

Suş no(tür)	Σ FİK İndeks F-D	İsobolografik Analiz F-D	İsobolografik Analiz F-S	İsobolografik Analiz F-L
Duyarlı				
11(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Antagonizma	Antagonizma
41(<i>C.albicans</i>)	Antagonizma	Antagonizma	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok
98(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok
102(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Sinerji	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok
<i>C.parapsilosis</i>	Etkileşim Yok	Antagonizma	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok
Dirençli				
272(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Sinerji
270(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Antagonizma
273(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Antagonizma	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok
230(<i>C.albicans</i>)	Etkileşim Yok	Antagonizma	Antagonizma	Etkileşim Yok
292(<i>C.glabrata</i>)	Etkileşim Yok	Antagonizma	Antagonizma	Antagonizma
227(<i>C.glabrata</i>)	Etkileşim Yok	Antagonizma	Antagonizma	Sinerji
110(<i>C.tropicalis</i>)	Etkileşim Yok	Antagonizma	Antagonizma	Etkileşim Yok
268(<i>C.tropicalis</i>)	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Antagonizma
<i>C.krusei</i>	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok	Etkileşim Yok

5. TARTIŞMA

Kandidalar normal florada bulunabilen ve fırsatçı mantar enfeksiyonları içinde ilk sırayı alan maya mantarlarıdır. *Candida* türleri hayatı tehdit etmeyen lokal mukokütanöz enfeksiyonların yanı sıra birçok organı tutabilen invaziv enfeksiyonlara da neden olabilir. *Candida* cinsi mayalar ABD’de kan dolaşımı enfeksiyonlarından dördüncü sırada en sık izole edilen mikroorganizmalardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı merkezlerde üçüncü en sık etken olarak karşımıza çıkmaktadır (1). Kandideminin klinik belirtileri hafif bir ateşten ciddi, bakteriyel enfeksiyonlardan ayırt edilemeyen ağır sepsise kadar değişen şekilde olabilir. Kandidemi tanısında “altın standart” kan kültüründe kandidanın üremesidir. Kan kültüründe kandida tespiti kolonizasyon olabileceği gibi invaziv enfeksiyonu da gösterebilir. Artık hemokültürlerde kandida üremesi kolonizasyon enfeksiyon ayırımı yapmadan mutlaka tedavi endikasyonu olarak görülmekte ve yüksek risk grubuna profilaksi önerilmektedir (52).

Yapılan birçok çalışmada kandidemilerin ülkeden ülkeye, aynı ülkede yıllar arasında ve hastaneler arasında gerek insidansının gerek ise etken spektrumunun değiştiği bildirilmiştir (2,14,15). Ülkemizde yapılmış çeşitli çalışmalarda kandidemi sıklığının yıllar içinde artış gösterdiği ve kandidemi görülme sıklığının 5.6-22/10.000 olarak saptandığı görülmüştür (8, 53, 54).

Çalışmamızda üniversitemize bağlı iki ayrı merkezden (Ankara-Adana) hemokültürde üreyen 300 kandida izolatu dahil edilmiştir. Duyarlılık profili araştırılacağı için aynı hastadan üreyen suşlar ancak farklı yatış zamanlarında veya farklı türlerde olduğu zaman çalışmaya dâhil edilmiştir. Tüm hastaların klinik verilerine ulaşılammış ve epidemiyolojik bilgileri verilememiştir.

Kandidemiler tür düzeyinde değerlendirildiğinde *C. albicans* hemokültürden ensik izole edilen kandida türüdür. Fakat albicans dışı kandidaların *C. albicans*’ların daha fazla oranda saptandığı çalışmalarda yapılmıştır. Nace ve arkadaşları (55) tarafından ABD’de yapılan dört merkezli çalışmada 81 kandida izolatının %66.7’sinin albicans dışı kandidalar tarafından oluştuğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, kandidemili hastalardan izole edilen kandidalardan 300'ü tür düzeyinde identifiye edilmiştir. *C.albicans* %69 oranı ile birinci sırada yer almıştır.

Tüm ülkelerde kan kültürlerinden izole edilen kandida türlerinde *C. albicans*'dan sonra ikinci ve üçüncü sırada yer alan kandidalar bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Özellikle 1990'lı yıllardan sonra yapılan çalışmalarda kandidemilerde albicans dışı kandida türlerinin oranının arttığı görülmektedir (56). Flukonazol profilaksisinin yaygın kullanılmasının albicans dışı kandida türlerinin artışına neden olduğu düşünülmektedir.

İnsanda hastalık yapan albicans dışı kandida türleri 17'den fazla olmakla birlikte kandidemilerin büyük kısmından sorumlu özellikle dört tür vardır: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*. Albicans dışı kandida türlerinin görülme sıklığı, yaş, coğrafi bölge, altta yatan hastalık, enfeksiyon bölgesi gibi bir çok faktörlerden etkilenmektedir. Bu türlerin artan sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak saptanması, hem epidemiyolojik verilerin değişmesi hem de tedavi açısından büyük önem taşımaktadır (56, 14).

Orta Asyada ve Amerika'da yapılan çalışmalarda, *C. parapsilosis* albikanstan sonra ikinci etken olarak izole edilmiştir. Avrupa'da yapılan bazı çalışmalarda ise *C. glabrata* ikinci, *C. parapsilosis* üçüncü sırada yer almıştır. Brezilya'da ve diğer bazı Avrupa ülkelerinde ise *C. tropicalis* ikinci sıklıkta etken olarak saptanmıştır (16, 57, 58, 59, 60). Ülkemizde yapılan çalışmalarda hemokültürlerden izole edilen albicans dışı kandida türleri oranları %35-68 arasında değişmekte ve *C. parapsilosis* en sık albicans dışı tür olarak karşımıza çıkmaktadır (53, 61). İzmir'den gelen iki çalışma, *C. tropicalis*'in ikinci sırada kandidemi etkeni olarak saptanması ile diğer çalışmalardan farklılık göstermiştir. *C. glabrata*, genel olarak kandidemi etkeni olarak değişen oranlarda görülürken, Kayseri'de yapılan bir çalışmada albicans dışı türlerde birinci sırada yer almıştır (53).

Bizim çalışmamızda albicans dışı kandida sıklığı %31 oranı ile albikanlara göre daha düşük oranda saptanmıştır. Albicans dışı kandidalardan *C. parapsilosis* (%10) ikinci, *C. glabrata* (%8) üçüncü, *C. tropicalis* (%6) dördüncü etken olarak saptanmıştır. Diğer etkenler ise sırası ile *C. guilliermondi* (%3), *C. famata* (%2), *C. krusei* (%1), *C. humicola* (%0.6), *C. pelluculosa* (%0.3)'dan oluşmaktadır. Bu oranlar özellikle ülkemiz verileri ile uyum göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda invaziv kandidiyaza bağlı mortalitenin, tedavinin uygunsuzluğu ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir. Kandidemi tedavisinde antifungal duyarlılık testlerinin yeri giderek artan bir öneme sahiptir. CLSI'nın antifungal testler alt komitesi, sistemik kullanılan flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, flusitozin ve kaspofungin olmak üzere 5 antifungal için duyarlılık-dirençlilik sınırını belirlemiş ve mikrodilüsyon ve disk difüzyon testlerini *Candida* türleri için standardize etmiştir. Flukonazol, 1990 yılında klinik uygulamaya girdiğinden beri kandidiyazda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Oral ve intravenöz preparatlarının olması ve yan etkilerinin az olması, fiyatının fazla olmaması ile avantajlı bir ilaçtır. Ancak flukonazolun *C. krusei* kökenlerine ve *C. glabrata*'ların bir kısmına etkinliği yoktur. Infectious Diseases Society of America (IDSA) tarafından önerilen kandida tedavi rehberinde; kandidemi durumunda daha az kritik veya flukonazol kullanım öyküsü olmayan hastaların tedavisinde flukonazol ilk seçenek olarak yerini korumaktadır. 1990'ların başından itibaren HIV ile enfekte hastaların tekrarlayan orofaringeal kandidiyaz tedavisinde başta ABD olmak üzere hastalığın sık görüldüğü ülkelerde, flukonazolün kullanımının artışı ile kandida türlerinde azollere azalmış duyarlılık ve direnç gelişimi söz konusu olmuştur. Antifungal ilaçların fazla kullanımı doğal dirençli kandida türlerinin seçilmesine yol açtığı gibi daha önce duyarlı olan türlerde genetik mutasyona bağlı dirence neden olmaktadır (52, 62, 57).

Çalışmamızda, tüm kandida suşlarının flukonazol MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Önerilen direnç sınır değerlerine göre her suş için duyarlılık profilleri belirlenmiştir.

Kandidalarda antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Flukonazol duyarlılığı üzerine 1990'lı yıllarda yapılan bir çalışmada suşların %4.2'si doza bağlı duyarlı iken, sadece bir *C. glabrata* suşunda flukonazole direnç saptanmış diğer türlerde dirence rastlanmamıştır (60). Direnç oranlarını düşük bulunduğu bir çalışmada, 1995-2003 yılları arasında hemokültürlerden izole edilen kandidaların flukonazol duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmış ve suşların %0.2'si flukonazole dirençli iken, %1.9'unun doza bağlı duyarlı olduğu saptanmıştır (57). Buna karşılık 2000'li yılların başında yapılan bir çalışmada kandidemili hastalardan izole edilen kandidalarda flukonazol direnç oranı %3.7, doza bağlı duyarlı suş oranı %5.9 oranında saptanmıştır (59).

Yapılan bir çalışmada *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* suşlarında yıllar içinde direnç gelişimi değişiklik göstermezken, *C. glabrata* suşlarında flukonazol direnci 2004-2006 yıllarında %36 oranında arttığı saptanmıştır (16).

Bizim çalışmamızda kullanılan 300 suşun 17'si (%5.6) doza bağlı duyarlı iken, 16'sı (%5.4) dirençli olarak saptanmıştır. Duyarlılık sonuçları tür düzeyinde incelendiğinde *C. albicans*'ların %93'ü flukonazole duyarlı iken, %3'ü doza bağlı duyarlı ve %4'ü dirençli olarak saptanmıştır. Albicans dışı kandidaların %81'i flukonazole duyarlı, %11'i doza bağlı duyarlı iken, %8'inin dirençli olduğu görülmüştür. Albicans dışı türlerde flukonazol duyarlılığının albikanslara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Albicans dışı kandidalarda flukonazol duyarlılık sonuçları tür düzeyinde incelendiğinde; doza bağlı duyarlı suşlar sırası ile *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. famata*, dirençli suşları ise *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pelliculosa*, şeklinde yer almıştır. Suş sayıları yetersiz olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda kandidaların antifungal duyarlılık sonuçları arasında bölgesel farklılık gözlenmektedir. Ülkemizde Erzurum bölgesinden yapılmış bir çalışmada, kan kültüründen izole edilmiş kandida suşlarının %6'sı flukonazole dirençli, %10'u ise doza bağlı duyarlı olarak saptanmıştır. Dirençli suşlardan sadece bir tanesini *C. albicans*, diğerlerini *C. krusei* suşları oluşturmuştur (63). Yapılan diğer çalışmalarda da kandan izole edilen kandida türlerinden sadece *C. krusei* suşlarında flukonazole direnç saptanmıştır (64, 65).

Çalışmamıza dahil edilen *C. albicans* suşlarında flukonazol direnci ülkemiz verilerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunda hasta popülasyonunda proflaktik flukonazol tedavisi gören özellikle transplantasyon hastalarının fazla olmasının etken olduğu düşünülmüştür. Ancak tüm hastaların verilerine ulaşılamadığı için kesin değerlendirme yapılamamıştır.

C. krusei'nin flukonazole intrinsik dirençli olması nedeniyle duyarlılık sonucuna bakılmaksızın bu suşlarda flukonazol, tedavi seçeneği olarak değerlendirilmemektedir (61). Ancak invitro koşullarda çalışmamıza dahil olan dört *C. krusei* suşunun üçü duyarlı gözükmemektedir.

Direnç gelişimi görülmesi bile yıllar içinde flukonazol MİK değerlerinde artış olduğu bilinmektedir. Bunu saptamak için literatürde MİK değerlerinin kıyaslandığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (59,66). 1990'lı yıllarda yapılan bir çalışmada (60) albicansların MİK aralıkları 0,125-32 mg/L iken, 2000'li yıllarda diğer çalışmada (67) 0,125-128 mg/L aralığında olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada tüm kandida türlerinde flukonazol MİK aralıkları 0,25-64 mg/L olarak saptanırken, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 0,5 mg/L, 16 mg/L değerlerinde olduğu belirlenmiştir (59).

Çalışmamıza dahil edilen kandidaların MİK aralıkları 0,125-256 mg/L MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırası ile 1 ve 32 mg/L, olarak belirlenmiştir. Ayrıca albicans ve albicans dışı suşların MİK ortalamaları kıyaslanmış, albicansların MİK ortalaması 3,36 mg/L iken, albicans dışı kandidalarda 3,71 mg/L olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir.

Ülkemizde Kalkancı ve arkadaşları (68) tarafından yapılan bir çalışmada *C. albicans* suşlarında MİK₅₀ - MİK₉₀ değerleri 4 ve 16 mg/L olarak saptanmış, bizim sonuçlarımız ile bir dilüsyon fark bulunmuştur.

Kandidemili hastalara hasta profili açısından bakıldığında, bir çoğunun antifungal tedavinin yanı sıra antibakteriyel tedavi aldığı bilinmektedir. Antibiyotik kullanımı aynı zamanda kandidemi gelişim açısından önemli bir risk faktörüdür. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı antibiyotiklerin kandida enfeksiyonlarında iyileşme sürecini ve başarısını etkilediği klinik olarak görülmektedir.

Kinolonlar antifungal aktivitesi olmayan, bakteriyel DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV üzerinden etkileyerek DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve transkripsiyonunu engelleyerek bakteri ölümüne sebep olan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Patojen mantarlarda topoizomeraz I ve II' nin yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan invivo çalışmalarda kinolonların antifungallerin etkisini artırdığı öne sürülmüştür (69, 70, 71). Sasaki ve ark (50) invivo koşullarda flukonazol-ofloksasin kombinasyonlarının farelerin yaşam sürelerini uzatmadığı fakat böbrek ve dalaktaki kandida sayılarında azalmaya neden olduğu göstermişlerdir. Kinolon grubu antibiyotik olan DU-6859 (sitafloksasin) ile flukonazol kombinasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, saptanan sinerjistik etkinin; DU 6859'un fungal membrandan geçerek

intraselüler konsantrasyonlarının artması veya fungal topoizomeraz II' nin inhibe olması ile açıklanmıştır (69). Shen ve arkadaşları (51) kinolonların tipI ve tipII topoizomeraz enzimleri üzerindeki antifungal etkilerini göstermişlerdir. Bu çalışmada, sinerjistik etki mekanizmasının açıklanmasında ilk hipotez siprofloksasinin fungal DNA replikasyonunu inhibe etmesi olarak açıklanmıştır (6). Diğer hipotez ise antifungallerin fungal membran permeabilitesini değiştirmesi ve siprofloksasinin hücre içi konsantrasyonunu arttırması olarak gösterilmiştir (6).

Çalışmamızda flukonazol duyarlı ve dirençli suşlarda kinolonlardan siprofloksasin ve levofloksasin'in kandidalar üzerindeki tek başlarına etkisi de araştırılmış siprofloksasin ve levofloksasin'nin kandidalar üzerinde antifungal etkisi görülmemiştir. Bu nedenle FİK analizi yapılmadan Checkerboard yöntemi ile elde edilen sonuçlar isobolografik analiz yöntemi ile GraphPad prism 5.0 yazılım programı kullanarak değerlendirilmiştir.

Siprofloksasin etkileşimine bakıldığında flukonazole duyarlı suşlardan sadece bir *C. albicans* suşunda F-S kombinasyonlarında antagonistik etki elde edilirken, diğer suşlarda ilaç etkileşimi saptanmamıştır. Dirençli suşlardaki F-S kombinasyonlarında sinerjistik etki saptanmamış, dört suşta ise antogonizma tespit edilmiştir. Antogonizma saptanan bu dört suştan biri *C. tropicalis* biri *C. albicans* diğer ikisinde *C. glabrata* 'dır. İlginç olan çalışmaya dahil edilen her iki *C. glabrata* suşunda da antogonizma görülmesidir. Suş sayıları yetersiz olduğu için tür farklarına göre istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. Ancak bu suşlardan biri siprofloksasinin aksine levofloksasin ile sinerjistik etkileşim göstermiştir.

Suşların F-L kombinasyonlarına bakıldığında flukonazole duyarlı suşlardan siprofloksasinle antogonizma gösteren *C. albicans* suşu levofloksasin'le de antogonizma göstermiş ve diğer suşlarda etkileşim saptanmamıştır. Ancak dirençli suşlarda siprofloksasinle antogonizma gösteren bir *C. glabrata* suşu ve siprofloksasinle etkileşim göstermeyen bir *C. albicans* suşunda sinerji görülmüştür. Antagonistik etki ise *C. tropicalis*, bir *C. albicans* ve diğer *C. glabrata* suşunda saptanmıştır. Diğer dirençli suşlarda ise ilaç etkileşimi görülmemiştir.

Çalışmamızda elde edilen veriler flukonazol ve kinolon kombinasyonlarındaki ilaç etkileşimi, kombinasyonlardaki antibiyotik konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiştir.

Stergiopoulou ve arkadaşlarının (6) yaptıkları bir çalışmada, siprofloksasin ve flukonazol kombinasyonlarının sinerjistik etkilerini checkerboard yöntemi ile araştırmışlar. Elde edilen sonuçları bizim çalışmamızda olduğu gibi isobolografik analiz yöntemlerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Kinolonların tek başına etkisi olmadığı için FİK indeks ile ilaç etkileşimi saptanamayacağını ancak bir dilüsyondan fazla MİK değişimi olmadığını belirten araştırmacılar, isobolografik analiz yöntemi ile flukonazol ve siprofloksasin konsantrasyon bağımlı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar üç duyarlı kandida suşundan birinde sinerji birinde antagonizma ve birinde de etkileşim olmadığını belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da flukonazol siprofloksasin etkileşimi suşa bağlı görülmüş ancak sinerji saptanmamıştır.

Aynı çalışmada flukonazol dışında AmB ve kaspofungin ile de siprofloksasin kombine edilmiştir. Siprofloksasinin düşük konsantrasyonları ile birlikte AmB kombinasyonlarında sinerjistik etki oluşurken, siprofloksasinin yüksek konsantrasyonlarında ise AmB'nin antifungal aktivitesinin azalması nedeniyle antagonistik etki saptanmıştır (4). Kaspofungin kinolon etkisi ise suşa bağlı bulunmuştur.

Petrou ve Rogers (72) ketakonazol, mikanozol ve itrakonazol ile siprofloksasin ve diğer kinolonları FİK analizi ile karşılaştırmışlar; 4 kattan fazla MİK düşüşünü sinerji olarak kabul etmişlerdir. Araştırmacılar düşük kinolon seviyelerinde sinerji saptarken yüksek konsantrasyonlarda antagonizma tespit etmişlerdir. Ancak çalışmalarında flukonazol yer almamıştır.

Çalışmamızda özellikle duyarlı suşlarda siprofloksasin düşük konsantrasyonlarında interaksiyon değerleri sinerji lehine olsa da istatistiksel anlam elde edilemediği için değerlendirilmemiştir. Ayrıca çalışmamızda FİK analizi açısından değerlendirme yapılmamasına karşılık hiçbir suşta 4 kat dilüsyon farkı görülmemiştir. Bu verimiz Stergiopoulou ve arkadaşlarının (6) yaptıkları çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Stergiopoulou ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada (4), *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus*'ta antifungal ilaçlar (AmB, kaspofungin ve flukonazol) ile siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin arasındaki ilaç etkileşimini isobolografik yöntem araştırmışlardır. Araştırmacılar flukonazol ile siprofloksasin arasında etkileşim bulmazken, levofloksasin ve moksifloksasin ile antagonistik etkileşim saptamışlardır.

C.albicans suşlarında flukonazolün moksifloksasin ile kombinasyonlarında, siprofloksasine göre ile daha yüksek interaksiyon değerleri saptamış ve daha antagonistik olduğunu öne sürmüşlerdir (4). Bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak sadece flukonazole duyarlı suşlarda ilaç kombinasyonlarının etkisi araştırılmış ve sadece albicans türleri test edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise duyarlı suşların yanında flukonazol dirençli suşlarda da ilaç kombinasyonlarının ilaç etkileşimi araştırılmıştır. Her ne kadar dirençli suşlarda antogonizma daha çok saptandıysa da istatistiksel anlam elde edilememiş ve etkileşimin suşa bağlı olduğu gözlenmiştir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, moksifloksasin ve AmB kombinasyonlarının etkisi araştırılmış. Tüm suşlar antifungale duyarlı iken moksifloksasin MİK değerleri >400 mg/L olarak bulunmuştur. Suşların FİK indeksleri hesaplanmış ve iki suşda ilaç etkileşimi saptanmazken, diğerlerinde sinerjistik etki elde edilmiştir (73).

Araştırmacılar tarafından kinolonların fagosite edilmiş kandidalar üzerindeki etki mekanizmalarını incelemek amacıyla da çalışmalar yapılmaktadır. Sasaki ve arkadaşları (50) flukonazol dirençli suşlarda flukonazol-ofloksasin kombinasyonlarındaki ilaç etkileşimini *invivo* ve *invitro* olarak araştırmışlar. *Invitro* çalışmada kombinasyonlarda sinerjistik etki saptanmamış olup kandidaların ofloksasin MİK değerleri >128 mg/L olarak belirlenmiş bizim çalışmamızdakine benzerlik göstermiştir. Sonuç olarak araştırmacılar *invivo* ve *invitro* çalışmalardaki farklı sonuçların mekanizmalarını tam olarak açıklayamamalarına karşılık kinolonların fagosite edilmiş kandidalar üzerindeki inhibe edici etkisininin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Antifungallerle ilaç etkileşimi gösteren bir diğer ajan ise tetrasiklinlerdir. Tetrasiklinler bakterilerin 30S ribozomlarına bağlanmakta olup ökaryot hücreler üzerinde etkisinin olmaması beklenebilir. Antifungal ilaçlar ve tetrasiklinler arasındaki ilaç etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmalar az sayıda olup, etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamıza dahil edilen beş duyarlı suşun doksisiklin MİK değerleri 0,5-2 mg/L arasında değişirken, dirençli dokuz kandida izolatında ise bu oran 64-128 mg/L arasında saptanmıştır. Doksisiklin MİK değerlerinin flukonazol dirençli suşlarda çok daha yüksek düzeyde saptandığının görülmesine karşılık istatistiksel anlam elde edilememiştir.

Tetrasiklinlerin kandidalar üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 30µg minosiklin diskleri kullanılmıştır. Tüm kandida türleri üzerinde aynı inhibitör etki oluşmamıştır. Minosiklin yüksek konsantrasyonlarında *C. albicans* suşlarında inhibitör etki saptanırken, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis* suşlarında ise inhibitör etkisinin daha az olduğu görülmüştür (74). Bu çalışmada suşların flukonazol duyarlılıkları ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Başka bir çalışmada kandida biyofilmleri üzerinde ise doksisisiklinin çok yüksek konsantrasyonlarının (512-2048 mg/l) etkili olabileceği bildirilmiştir (5).

Çalışmamızda flukonazol- doksisisiklin kombinasyonlarında ilaç etkileşimi hem FİK indeksi hemde isobolografik analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. FİK indeks sonuçlarına göre 41 numaralı flukonazol duyarlı *C. albicans* suşunda antagonistik etki saptanırken; diğer suşlarda yapılan kombinasyonlarda ilaç etkileşimi saptanmamıştır. İsobolografik yöntem ile de bu suşta antogonizma görülmüştür. Bunun dışında etkileşim saptanmayan bir duyarlı *C. albicans*'ta sinerji, *C. parapsilosis* standart suşunda ise antagonizma görülmüştür. Dirençli suşların ise dördünde antagonizma saptanırken diğer suşlarda etkileşim görülmemiştir. Antagonizma saptanan bu suşların ikisini çalışmaya dahil edilen iki *C. glabrata* suşu diğerlerini ise *C. albicans* türleri oluşturmaktadır.

Yapılan bir çalışmada *C.albicans* biyofilm hücreleri üzerinde flukonazol ve AmB ile doksisisiklin arasındaki ilaç etkileşimi etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada kombinasyonlarda her bir grup arasındaki ilaç etkileşimi bizim çalışmamızda olduğu gibi GraphPad prism 5.0 yazılım programı ile değerlendirilmiştir (5). Doksisisiklinin yüksek konsantrasyonları ile flukonazolün biyofilmler üzerinde sinerjistik etki gösterdiği (256 mg/L) ve gerekli flukonazol dozunun düştüğünü belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca doksiklin dozunun 128 mg/L nin altına düştüğü durumlarda benzer etkinin görülmediğini saptamışlardır (5). Bizim çalışmamızda hem planktonik hücrelerde çalışılmış hemde bu kadar yüksek konsantrasyonlara çıkılmamıştır.

Oliver ve ark yaptıkları çalışmada 300 mg/L'ye kadar tetrasiklin dozların ile flukonazol etkileşimini araştırmışlar ve çalışmamızla uygun şekilde flukonazol direncinin arttığını gözlemlemişlerdir (75).

Yapılan çalışmalarda sadece flukonazol ile değil AmB ile de doksisiklin kombinasyonu araştırılmıştır. Yüksek doz doksisiklinin biyofilmlere etkili AmB konsantrasyonunu düşürdüğünü göstermişlerdir.

Miceli ve arkadaşları (5), *C. albicans* suşlarında doksisiklinin 512 mg/L konsantrasyonu ile AmB'nin antifungal aktivitesinin %30-35 oranında arttığını ve sinerjistik etki oluştuğunu saptamışlar. Başka bir çalışmada *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* türlerinde AmB-doksisiklin kombinasyonlarının etkinliği araştırılmış. Doksisiklin 8mg/L konsantrasyonlarında kullanıldığında tüm suşlarda sinerjistik etki elde edilmiştir (49). Her iki çalışmada elde edilen sonuçlara göre albikanslarda yüksek doz doksisiklin etkili iken albikans dışı kandidalarda bu antibiyotığın düşük konsantrasyonlarının sinerjistik etki oluşturduğu görülmüştür. Çalışmamızda doksisiklinin AmB etkileşimine bakılmamış ayrıca sayılar çok az olduğu için türler arasında fark değerlendirilmesi yapılamamıştır.

Birçok bakteriyel veya fungal enfeksiyonlarda klinik gözlemler bazı ilaç kombinasyonlarının tedavi başarısını etkilediğini göstermektedir. İlaç etkileşimlerinin araştırılmasında en sıklık ile checkerboard analizi ile FİK indeks hesaplanması veya time-kill deneyleri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin her ikisi de MİK değeri bilinen suşlar arasında yani iki aktif ilaçta ve tek bir üreme inhibisyonu üzerinden yapılmaktadır. İlaç etkileşimlerinde isobolografik analizin kullanılması farmakodinamik etkileşimi görmek için yıllardır farklı ilaç gruplarında uygulanmaktadır. Bu analiz yöntemi antifungal ajanlarda azollerin ve polyenlerin etkileşiminde checkerboard plakları üzerinden kullanılmış ve sonuçlar daha duyarlı bulunmuştur. Bu yöntem tek bir kuyucuktaki üreme temeline dayanan FİK analizine göre tüm kuyucuklardaki üremeyi değerlendiren konsantrasyon inhibisyon eğrilerinden hesaplama yaptığı için daha hassastır.

Bu yöntemin doğru sonuç vermesi için checkerboard plakları çok dikkatli hazırlanmalı ve tüm kuyucuklarda üreme yüzdeleri hesaplanmalıdır. Birden fazla kuyucukta sapma görülmesi sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle suşların bazen tekrar tekrar çalışılması gerekmektedir. Sonuçların güvenilirliği için en az üç tekrardaki sonuçların ortalamasının alınması gerekmektedir. Buda rutin uygulama ile bağdaşmayacaktır.

Ancak tek ilacın aktif olduğu durumlarda, FİK indeks satndartları uyumsuz kalmakta dolayısı ile isobografik yöntem ilk tercih olarak gözükmektedir. Suşların EC₅₀ değerleri ile

MİK sonuçlarının karşılaştırılması flukonazol gibi MİK değerinin %50 inhibisyon temeline dayandığı kandidalarda yol gösterici olmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen tüm suşların isobogramlardan elde edilen EC₅₀ değerleri ile MİK değerleri yakın bulunmuştur.

Regresyon analizlerinin birçok istatistik programında yapılabiliyor olması yöntemin bir başka artısıdır. Ancak bu yöntemin antimikrobiyal ajanlar için standardize edilmesine ve sinerji antagonizma sınırlarının, hatta aditif etki olasılığında hesaplanabilir hale gelmesi için *invivo* ve *invitro* çalışmalar ile desteklenerek çalışılmasına gerek vardır.

SONUÇ

Bu çalışmada, hemokültürlerden izole edilen kandida suşları tiplendirilmiş ve flukonazol duyarlılıklar mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Flukonazole dirençli ve duyarlı olan toplam 12 izolat ve 2 standart suшта flukonazol; levofloksasin, siprofloksasin ve doksisiklin ile kombine edilmiştir. Flukonazol ile kombine edilen antibiyotiklerin hem tek başlarına hem de kombinasyonlardaki etkileri invitro olarak araştırılmıştır. Sonuçlar FİK indeksi ve isobolografik analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgularımız;

1. Tüm suşların tür düzeyinde dağılımı incelendiğinde, *C. albicans* en sık izole edilen tür olmuştur. *C. albicans*'dan sonra *C. parasilosis* ve *C. glabrata*'nın hemokültürlerden izole edilen kandidalar arasında ilk iki sırada yer aldığı gösterilmiştir.
2. Flukonazol duyarlılık test sonuçlarına göre, albikansların MİK değerleri, albikans dışı kandidalara göre istatistiksel anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur. Flukonazol direnci tüm kandidaların %5.4'ünde saptanmış ve %5.6'sının doza bağlı duyarlı olduğu görülmüştür. Flukonazol direncinin ve doza bağlı duyarlılığın daha yüksek bulunduğu albikans dışı kandidalarda (toplam %18) özellikle *C. glabrata* suşları bu oranı yükseltmiştir.
3. Antibiyotiklerin tek başına kandidalar üzerinde etkisi incelendiğinde, doksisiklinde 0,5-128 mg/L arasında MİK aralığı saptanmış, siprofloksasin ve levofloksasinin ise tek başına etkin olmadıkları görülmüştür. Flukonazole duyarlı suşların doksisiklin MİK değerleri (0,5–2 mg/L), dirençli suşlara (64-128 mg/L) göre belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur.
4. Flukonazol ve doksisiklin kombinasyonlarında FİK indeks analizi sonucuna göre, duyarlı suşlardan bir tanesinde antagonistik etki saptanmıştır. İsobolografik analiz yöntemi ile de aynı suшта antagonistik etki görülmüştür.
5. Flukonazol ve doksisiklin kombinasyonlarında interaksiyon indeks analizi sonucuna göre dirençli ve duyarlı suşlarda etkileşim farkı görülmemiş suşların yaklaşık yarısında antagonizma saptanırken bir suшта sinerji saptanmıştır.

6. Siprofloksasin ile flukonazol kombinasyonlarının duyarlı suşlardan sadece bir tanesinde dirençli suşlardan ise dört tanesinde antagonistik etki tespit edilmiştir. Beklenenin aksine hiçbir suшта sinerji görülmemiştir.
7. Levofloksasin ile flukonazol kombinasyonlarından elde edilen isobolografik analiz sonuçlarına göre, duyarlı ve dirençli suşlar arasında fark görülmemiştir. İki suшта sinerji saptanırken suşların yaklaşık 1/3'ünde antagonizma görülmüştür. Suşlardan bir tanesinde sinerji elde edilmiştir.
8. Az sayıda suş dahil edildiği için tür düzeyinde anlam bakılmamış ancak çalışmaya dahil edilen iki *C. glabrata* suşunun ikisinde de hem doksisisiklin hemde siprofloksasin ile antagonizma birinde levofloksasin ile antagonizma görülürken diğerinde sinerji görülmüştür. Sonuç olarak; flukonazol ve kinolon kombinasyonlarındaki ilaç etkileşimi kombinasyonlardaki antibiyotik konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiştir.
9. Antifungallerin ilaç etkileşiminde kullanılan isobolografik analiz yönteminin FİK analizine göre daha hassas olduğu ancak pratik uygulama zorluklarının bulunduğu görülmüştür. Yinede bu yöntem aktif ve aktif olmayan ajanların kombinasyonunda alternatifsizdir.

Fırsatçı mantarlardan olan kandidaların özellikle immünsüprese hastalarda yaptığı enfeksiyonlar bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte görülmekte veya hastalar çoğu zaman antifungal ajanla birlikte antibiyotikte kullanılmaktadırlar. Klinik olarak antifungaller ile bazı antibiyotiklerin kombine kullanımının tedavi başarısını arttırdığı bildirilmektedir. Ancak klinik olarak elde edilen sonuçların invitro çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamız; en çok kullanılan antifungal olan flukonazol ile antibiyotik etkileşiminin genellikle antagonizma lehine ve antibiyotik konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bulgularımız; özellikle kinolon kullanımı ile antifungal etkinliğin artmasını, kinolonların kandidalar üzerine direkt etkisinden çok makrofajlar üzerine gösterdiği etki gibi ikincil nedenlere bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Klinik çalışmalar hastanede yatan immünosüprese hastaların tedavisinde antifungallerin kinolonlar ve tetrasiklinler ile birlikte kullanımı ile sinerjistik etki varmış gibi gözüksede bizim çalışmamızda invitro ortamda antagonistik etki saptandı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, invivo ve invitro ortamda antifungal ilaçlar ve antibiyotikler arasında uyumsuzluk olduğunu göstermektedir. Bu konuda daha fazla sayıda çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Kombinasyonlardaki etki mekanizmalarının belirlenmesi, doğru ilaçların bir arada kullanılmasını sağlayacak, bu da enfeksiyonların daha kısa sürede tedavi edilmesinde, daha az toksik etkilerin oluşmasında ve hastanede yatış sürelerinin kısalmasında yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Tümbay E. Candida, Cryptococcus ve tıbbi önemi olan diğer mayalar, Klinik Mikrobiyoloji, (Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M), 9. baskı, Ankara, Atlas kitapçılık, Cilt 2, 1762-1764, 2009.
2. Diekema DJ, Michael A. Pfaller MD. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect. Control Hosp Epidemiol* 25: 624-626, 2004.
3. Vanden Bossche H. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14(2): 44-49, 1973.
4. Stergiopoulou T, Joseph Meletiadis, Sein T. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 63: 343- 348, 2009.
5. Miceli MH. In vitro analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Agents* 34(4): 326-32, 2009.
6. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioanni P. Isobolographic Analysis of Pharmacodynamic Interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *AAC* 52(6): 2196–2204, 2008.
7. Shen L, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, and Lartey P. A. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. *AAC* 36: 2778–2784, 1992.
8. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them *J Antimicrob Chemother* 52: 1, 2003.
9. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA and Ghannoum MA. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Review* 18: 163-194, 2005.
10. Warner H, Ulrich G. Synergy research: Approaching a new generation phytopharmaceuticals research. *Phytomedicine* 16: 97-100, 2009.
11. Tallarida RJ. An Overview of Drug Combination Analysis with Isobolograms. *Pharmacology* 319: 1, 2006.
12. Motulsky H, Christopoulos A. GraphPad Prism Version 4.0 Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression
13. Danial JM, Jonkera B, Sandra AG, Piet H. Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug–drug interactions in vivo. *Pharmacology & Therapeutics* 106: 1–18, 2005.

14. Pfaller MA, and Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a Persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 133-163, 2007.
15. Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micology* 17: 73-81, 2000.
16. Metwally L, Waker MJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey BV, O'Neill H. J, Webb C. H, McMullan R. Trends in candidemia and antifungal susceptibility inauniversity hospital in Nothern Ireland 2001-2006. *Journal of Infection* 55: 174-178, 2007.
17. Yeğenoğlu Yıldız. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İst. Tıp Fakültesi Dergisi* 70: 23-38, 2007.
18. Winn Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Mycology, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition, New York, Chapter 21, 1218-1219, 2006.
19. Murray M, P, Zinchuk R, and Larone D. H. CHROMagar candida as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid-assimilation-of-trehalose test. *JCM* 43: 1210-1212, 2005.
20. Ellepola Arjuna NB. Morrison J. C. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *JM* 43: 65-84, 2005.
21. Kantarcıoğlu AS. Yücel A. Mannoproteins, adherence, hydrophobicity, hemolysis, anti- phafocytosis feature. *Cerrahpaşa J. Med.* 35, 2004.
22. Michael Weig and Alistair J.P. Brown. Genomics and the development of new and anti-*Candida* drug. *Trends in Microbiology* 15: 310-317, 2007.
23. Hsiue HC. Huang YT. Kuo YL. Liao CH. Chang TC. Hsueh PR. Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. *Clin. Microbiol. Infect* 19: 493-500, 2009.
24. Guy St-Germain BS, Michel L, Rene P, Pierre R, Anne-Marie B, Claude L, Michael L. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec:Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Infect Dis Med Microbiol* 19(1): 55-62, 2008.
25. Joachim M. The genetic basis of fluconazole resistancx development in *Candida albicans*. *BBA Review* 240-248, 2002.
26. Thyagarajan S, Anthony R. Borneman, Karla J. Danicls. TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans* *EC* 5(10): 1674-1687, 2006.
27. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. *Eur. J. Biochem* 9: 2669-2677, 2001.

28. Canton E, Espinel-Ingroff A and Peman J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev. Anti Infect. Ther* 7(1): 107-119, 2009.
29. Ernst EJ, Klepser ME, and Pfaller MA. Postantifungal effect of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *AAC* 44: 1108-1111, 2000.
30. Arıkan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology* 45, 569-587, 2007.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Proved Standard. NCCLS document M27-P, 1992
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Proved Standard. NCCLS document M27-T, 1995
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard. NCCLS document M27-A 17(9), 1997.
34. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2, Wayne, 2002.
35. Bourgeois. Antifungal susceptibility of 205 *Candida spp.* isolated primarily during invasive Candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *JCM* 48: 154-161, 2010.
36. Phaller MA, Diekema DJ, Boyken L. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *JCM* 41: 1875-1880, 2003.
37. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *EC* 3(2): 536-545, 2004.
38. Johnson MD, MacDougall CJ, Ostrosky-Zeichner L, John R, John H. Combination antifungal therapy. *AAC* 48(3): 693-715, 2004.
39. Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince RA. Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an invitro model of *Candida* catheter- related bloodstream infection. *AAC* 46: 3499-3505, 2002.
40. Pappas PG, Karchmer AW, Sobel J, Edwards JE, Hadley S. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin. Infect. Dis* 36: 1221-1228, 2003.

41. Barchiesi F, Caggiano G, Maracci M, Arzeni D, Scalise G, Montagna MT. Antifungal susceptibility patterns of yeast isolates causing bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother* 41: 59-65, 1998.
42. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D and Scalise G. Caspofungin in Combination with Amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *AAC* 51: 941-945, 2007.
43. Gil-Lamaignere C, Müller FM. Differential effect of the combination of caspofungin and terbinafine against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. *JAA* 23(5): 520-3, 2004.
44. Radriduez MM, Ruiz M, Pastor FJ, Quindos G, Carillo A, Guarro J. In vitro interaction of micafungin and fluconazole against *Candida*. *J Antimicrob Chemotherapy* 60(1): 188-190, 2007.
45. Nishi I, Sunada A, Toyokawa M, Asari S, Iwatani Y. In vitro antifungal combination effect of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *J. Infect Chemother* 15;1-5. 2009.
46. Krishna G, Moton A, Savant I, Martinho M, Seiberling M, McLeod J. Effect of oral posaconazole on the pharmacokinetic properties of oral and intravenous midazolam: a phase I, randomized, open-label, crossover study in healthy volunteers. *Clinical Therapeutics* 31(2), 286-289, 2009.
47. Yücesoy M, Oktem IM, Gülay Z. In vitro synergistic effect of fluconazole with nonsteroidal antiinflammatory agents against *Candida albicans* strains *J Chemother* 12(5): 385-9, 2000.
48. Guo Q, Sun S, Yu J, Li Y, Cao L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. *J Med Microbiol* 57; 457-462, 2008.
49. Muhamed El-Azizi. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *J Med Microbiol* 56: 645-649, 2007.
50. Sasaki E, Maesaki S, Miyazaki Y, Yanagihara K, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole resistant *Candida albicans*. *J. Infect Chemother* 6: 151-154, 2000.
51. Cozzarelli, NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207: 953-960, 1980.
52. WILLKE A. Kandidemi: nasıl değerlendirilmeli ne yapmalı. *İnfeksiyon dergisi*, Cilt 21, Ek 117-122, 2007.
53. Ener B. *Candida* enfeksiyonlarında epidemiyoloji ve laboratuvar tanı. *ANKEM derg* 22: 264-269, 2008.

54. Hobson RP. The global epidemiology of invasive candida infections-is the tide turning? JHI 55:159-168, 2003.
55. Nace LH, Horn D, Neofytos D. Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. Diagn Microbiol Infect Dis. 64: 289-294, 2009.
56. Perlroth J, Chon B, Spellberg B. Nosocomial fungal infection: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med Mycol 45: 321-346, 2007.
57. Matta DA, Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusana EJU, Travassos NF, Salomao R, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 100 candida bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in sao paulo, Brazil, 1995-2003. Diagn Microbiol Infect Dis 57: 399-404, 2007.
58. Hope W, Morton A, Eisen DP. Increase in prevalence of nosocomial non-Candida albicans candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. JHI 50: 56-65, 2002.
59. Zepelin MB, Kunz L, Ruchel R, Reichard U, Weig M, and GroB U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of Candida spp. To six antifungal agents: results from a surveillance study on fungemia in Germany from July 2004 to August 2005. J Antimicrob Chemother 60: 424-428, 2007.
60. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Distribution and antifungal susceptibility of Candida species causing candidemia from 1996 to 1999. Diagn Microbiol Infect Dis 48: 33-37, 2004.
61. Quindos G, Vargas LOS, Vidal MV, Eraso E, Alkorta M, Almaraz JLH. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14 year study in a Spanish tertiary medical centre. IJAA 31: 266-271, 2008.
62. Akam AE. ukurova niversitesi tıp fakültesi hastanesinde izlenen kandidemi olgularının epidemiyolojik, klinik ve antifungal duyarlılık yönünden incelenmesi. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2009.
63. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH. Çeşitli Candida türlerinin iki farklı triazole duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması The Eurasian Journal of Medicine 39: 173-177, 2007.
64. Toprak NU, Erdođan S, Celik C, Johansson C. Kan kültürlerinden soyutlanan Candida suşlarında amfoterisin B ve flukonazol invitro duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg 33: 252-256, 2003.
65. Bakır M, Cerikiođlu, Barton R, and Yağcı A. Epidemiology of Candidemia in a Turkish tertiary care hospital . APMIS 114: 601-610, 2006.

66. Pinto PM, Oliveira RCB.W, Lyon JP, Cury VF, Arantes RR, Koga-Ito CY, Resende MA. Invitro antifungal suscetibility of clinical isolates of *Candida* spp. Obtained from patient with different predisposing factor to candidosis. *Microbiological Research* 163: 579-585, 2008.
67. Chen Y, Chang S, Hsieh W, Luh K. Invitro antifungal susceptibiities of candida species isolated from the blood. *IJAA* 7: 217-222, 1996.
68. Kalkancı A, Berk E, Aykan B, Çağlar K, Hizel K, Arman D, Kustimur S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patient. *Journal de Mycologie Medicale* 17: 16-20, 2007.
69. Nakajima RA. Kitamura K, Tanaka SM, and Sato K. Invitro and in vivo antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *AAC* 39: 1517–1521, 1995.
70. Sasaki E, Maesaki S, Y. Miyazaki K, Yanagihara K, Tashiro TT. and Kohno S.. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *J Infect. Chemother* 6: 151–154, 2000.
71. Sugar AM, Liu XP, and Chen RJ. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. *AAC* 41: 2518–2521, 1997.
72. Petrou MA and Rogers TR. In-vitro activity of antifungal agentsin combination with four quinolones. *Drugs Exp. Clin. Res* 14: 9–18, 1988.
73. Yalçın B, Kalkancı A, Gürelik F, Fidan I, Kuştimur S. Moksifloksasin ve amfoterisin B kombinasyonunun *Candida* türleri üzerine invitro sinerjistik etkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 44: 65-70, 2010.
74. Waterworth PM. The effect of minocycline on *Candida albicans* *J. Clin. Path* 27: 269-272, 1974.
75. Lew MA, Beckett KM, Levin MS. Antifungal activity of four tetracycline analogues in vitro: potentiation by amphotericin B. *J. Infect Dis* 136: 263–270, 1977.