T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

FLUKONAZOLE DİRENÇLİ *CANDIDA SPP.* İZOLATLARINDA, GENTAMİSİNİN FLUKONAZOLÜN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Bahar GENÇ

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

FLUKONAZOLE DİRENÇLİ *CANDIDA SPP.* İZOLATLARINDA, GENTAMİSİNİN FLUKONAZOLÜN ETKİNLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Bahar GENÇ

Destekleyen kurum:

Tez no:

EDİRNE-2019

T. C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Suzan ÖKTEN danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Bahar GENÇ tarafından tez başlığı **"Flukonazole Dirençli *Candida spp.* İzolatlarında, Gentamisinin Flukonazolün Etkinliği Üzerine Etkisi"** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 13/09/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Devrim DÜNDAR
JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ
JÜRİ ÜYESİ

Doç. Dr. Suzan ÖKTEN
JÜRİ ÜYESİ (DANIŞMAN)

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Suzan Ökten'e, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Fatma Kaynak Onurdağ'a, Arş. Gör. Gülcan Kuyucuklu'ya, ayrıca yardım desteklerinden dolayı Biyolog Dr. Melek Tikveşli Taylan'a ve projemizin gerçekleşmesindeki desteklerinden dolayı TÜBAP birimine teşekkür ederim. Ayrıca beni her zaman yüreklendiren tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
- **VİRÜLANS FAKTÖRLERİ** 4
- **KANDİDA ENFEKSİYONLARININ OLUŞUMUNDA ÖNEMLİ OLAN ETKENE AİT FAKTÖRLER** 5
- **ENFEKSİYONLARI** 7
- **ANTİFUNGAL AJANLAR** 8
- **ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ** 9
- **DİLÜSYON YÖNTEMLERİ** 9
- **DAMA TAHTASI TESTİ** 11

GEREÇ VE YÖNTEM 12
BULGULAR 17
TARTIŞMA 32
SONUÇ 34
ÖZET 35
SUMMARY 36
KAYNAKLAR 37
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ATCC : American Type Culture Collection

AmAns: Aminoglikozid antibiyotikleri

CLSI : The Clinical and Laboratory Standards Institute

DBD: Doza Bağlı Duyarlı

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FİK : Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu

FİKİ: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu İndeksi

FLZ: Flukonazol

GM: Gentamisin

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

SDA: Sabouraud dekstroz agar

GİRİŞ VE AMAÇ

Kandidiazis, bağışıklık sistemi zayıf insanlar için önemli bir fırsatçı patojen mantar enfeksiyonudur. *Candida albicans* kandidiazisin en yaygın etiyolojik ajanıdır (1). Son yıllarda kanser ve bağışıklık sistemini zayıflatan diğer hastalıklardan dolayı hastaneye yatan kişi sayısının artması, organ transplantasyon cerrahisindeki artış, antibiyotiklerin kullanımındaki artış, yoğun bakım ünitelerinde kalan hasta sayısının artması ve hastalara uygulanan girişimsel işlemler nedeniyle hastane kandida enfeksiyonlarının insidansı artmıştır (2,3). Kandida türleri, hastane enfeksiyonu etkenleri arasında üst sıralardadır (4).

Mantar enfeksiyonu sıklığının ve buna bağlı mortalite ve morbidite oranlarının yükselmesine bağlı olarak antifungal kullanımının yaygınlaşması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına neden olabilir.

Azol grubu bir antifungal olan flukonazol (FLZ), toksisitesinin ve maliyetinin düşük olması nedeniyle *C. albicans* enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır ve hala kullanılmaktadır. Ancak, yaygın FLZ kullanımı, FLZ direnci veya azol türevlerine çoklu çapraz direnç insidansının artmasına neden olmaktadır (5-8).Bu nedenle, yeni antifungal ajanların geliştirilmesine yeni antifungal yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Maalesef, yeni antifungal ilaç geliştirme süreci oldukça uzun bir süreçtir. Sürecin uzunluğu ve kısa sürede direnç gelişimi göz önüne alındığında yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesinden çok, var olan moleküllerin kombine şekilde kullanımları ile ilaçların tekrar tedaviye kazandırılması gündemdedir. Kombinasyon çalışmaları içerisinde özellikle antifungallerin, antifungal olmayan moleküllerle kombinasyonuna odaklanılmaktadır.

Gentamisin, aminoglikozid grubunda yer alan ve protein sentezini inhibe ederek etki eden antibakteriyel bir antibiyotiktir (9). Ayrıca, gentamisinin (GM), *Fusarium* türlerine karşı

antifungal etki gösterdiği de bildirilmiştir (10). Bununla birlikte, GM'in azol grubu ilaçlarla birlikte kullanıldığında anti-kandidal aktivite gösterebildiği bildirilmiştir (11).

Bu çalışmada, flukonazolün gentamisin ile kombine kullanılmasının, flukonazole dirençli kandida izolatlarının flukonazolün MİK değeri üzerine etkisi saptanarak, flukonazol direncini ortadan kaldıran ideal gentamisin konsantrasyonlarının hesaplanması ve böylece flukonazole dirençli kandida enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif olabilecek bir flukonazol+antibiyotik kombinasyonu belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla,Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen *Candida* izolatlarında, gentamisin ve flukonazolün sinerjik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

M.Ö. dördüncü yüzyılda Hippocrates'ın ağızdaki pamukçuğu tanımlaması ile *Candida'*larla ilgili çalışmaların başladığı kabul edilmektedir (12). Rosen von Rosenstein ağızda oluşan pamukçuğun akciğerlere invaziv olarak yerleşebildiğini 1771'de saptamıştır, Bernard Langenbeck ise1839'da tifolu bir hastanın ağzındaki afttan mantarı izole etmiş ve bu etkenin tifo ile ilişkili olduğunu düşünmüştür. Gruby 1842'de bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğunu bildirmiştir. Berg tarafından 1842'de deneysel olarak oral aft modeli oluşturularak bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmıştır. Frank ve Wilkinson 1849'da oral lezyonun genital organlarda da olabileceğini göstermişlerdir (12,13).

Robin tarafından 1847'de mantarın *Oidium albicans* olarak sınıflanması ile "albicans" ismi ilk kez kullanılmıştır. Roth Berkhout 1923'de eski Roma senatosunda giyilen beyaz cüppe için kullanılan *Candida* terimini önermiştir (12).

Antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940'lı yıllardan itibaren ise *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmış, konu ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (12,13).

Kandidalar, *Deuteromycota*'da *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde yer almaktadır. Üremesi blastosporlar ile meydana gelir. Yalancı hif yapan ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup maya formunda mantardır. Eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığı ile ürerler ve üreme şekilleri baz alınarak sınıflandırılırlar. Bugün için kabul edilmiş 200 kadar türü bulunmaktadır (9,10). Bununla birlikte az kısmı insanda hastalığa neden olabilir. Bilinen bu kandida türleri arasında; *C. albicans, C. dubliniensis, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, C. kefyr*

(pseudotropicalis), C. lusitaniae, C. krusei, C. guillermondii, C. utilis, C. lipolytica, C. famata, C. haemulonii, C. rugosa, C. auris sayılabilir (14).

Kandidalar 2,0- 7,0 x 3,0- 8,5 µm boyutunda, tek hücreli tomurcuklanarak (blastosporla) çoğalan, yalancı/gerçek hifler oluşturabilen mantarlardır. Kandidalar arasında sadece *C. albicans, C. dubliniensis* ve nadir olarak da *C. tropicalis* gerçek hif oluşturur. Hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidaların bağlanma şekli, Kandida türlerinin identifikasyonunda önemlidir. Bu türler katı besiyerlerinde, oda sıcaklığında veya 37°C'de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli ya da kuru, düzgün veya buruşuk yüzeyli, mat ya da parlak, ekşi kokulu koloniler oluşturur (15).

Kandidalar ökaryotik hücrelerdir. Kandidaların hücre duvar yapısının yaklaşık olarak %80-90 kadarı karbohidrat, %6-25'i protein, %1-7'si lipidlerden oluşur. Karbohidratlar, β-glukan, mannan ve kitindir. β-glukan dallanmış β-1,3 ve β-1,6 glukoz polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β-1,4 N-asetilglukozamin polimerlerinden oluşur. Hücre duvarının en önemli bileşeni, çeşitli yüzeylere tutunmayı sağlayan mannoproteinlerdir. Maya formundan hif formuna değişim sırasında hücre duvar yapısında bulunan kitin içeri değişebilir (16).

Hücre zarı iki tabakalı olup fosfolipid, sfingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. Hücre membranında bulunan sterol, membran lipitlerinin %20'sini oluşturur. Kandidaların hücre membranında; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinozitol gibi fosfolipitler bulunur (15). Sterol içeriğinde ergosterol ve zimosterol mevcuttur, bunlardan ergosterol antifungal ilaçlar için önemli bir hedeftir (17). Sterolün %95'i ergosterol formundadır.

VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

C. albicans, virülans faktörleri ile konak direnç mekanizmalarına karşı koyabilir, yanıltabilir, ağır hasar verebilir veya bu mekanizmaları inaktive edebilir. *C. albicans* 'ın sahip olduğu virülans faktörleri sebep olduğu enfeksiyonun tipi, safhası, enfeksiyon bölgesi ve konak cevabının doğasına göre değişebilir (18).

Tablo 1. *Candida* enfeksiyonlarının oluşumunda önemli olan konağa ait faktörler (18,19)

-Deri ve mukoza bütünlüğü -Epidermal proliferasyon -Fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları -Lizozim -Laktoferrin -Doğal öldürücü (NK) hücreleri -Kompleman sistemi -T hücre bağımlı immunite -Sitokinler -Hümoral immunite İmmünsupresif tedavi -Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı	-Düşük doğum ağırlığı -İntravenöz kateter -Mekanik ventilasyon -Parenteral beslenme -AIDS -Diyabet -Ağır cerrahi girişimler -Maligniteler -İdrar sondası -İntravenöz uyuşturucu kullanımı -Diğer endokrinolojik ve hematolojik Hastalıklar

Kandida türlerinin birçok konakta yaygın enfeksiyona sebep olabilmesini sahip olduğu virülans faktörleri ile açıklamak mümkün olabilir. Kandidoz gelişiminde, konağın bağışıklık sisteminin zayıflamasının etkisi olabildiği gibi etkenin virülans faktörleri de önemli bir faktördür. En sık izole edilen tür olan *C. albicans'ın*, diğer kandidalar ile karşılaştırıldığında enfeksiyon etkeni olarak daha sık izole edilmesini, sadece konağa ait faktörlerle açıklamak yeterli olmamaktadır. Bu durumda *C. albicans*'a ait virülans faktörleri dikkat çekmektedir. Bu virülans faktörleri arasında; morfolojik dimorfizm, fenotipik dönüşüm, çeşitli adezyon molekülleri (aderans), enzimler ve dokuya invazyon, toksinler, biyofilm oluşturma ve sideroforları kullanabilme yeteneği sayılabilir. *C. albicans* dışındaki türlerde virülans faktörleri ile ilgili çalışmaların sayısı da giderek artmaktadır (20,21).

Kandida Enfeksiyonlarının Oluşumunda Önemli Olan Etkene Ait Faktörler

a) Adezyon ve adezinler: Adezyon, mayanın konak ile ilişki kurmasında ilk basamaktır. Maya hücrelerinin konak hücre yüzeyine tutunmasını sağlayan lektin ve benzeri yüzey proteinleri ve kompleman bağlayan reseptörleri vardır. *Candida albicans*, aderansı en yüksek tür olmakla birlikte, aynı tür içinde adezyon yetenekleri farklı kökenler bulunabilir. maya hücresinin konak hücre yüzeyine tutunmasında, konağın hormanal ve immünolojik koşullarının yanı sıra, mantarın yüzey özelliklerinin de önemi vardır. Mannan da adezyonda rol

oynar. Antikor cevabı oluşturur. *C. albicans* epitel hücrelerine, endotel hücrelerine, fibrin, platelet matrikslerine, cam-teflon gibi polistren yüzeylere, nötrofillere adezinleri yardımı ile tutunur (22,23).

b) Dimorfizm: Maya formundan hif formuna geçiş sürecidir. Çevre koşulları etkilidir. Efg1, Cgh1 genleri tarafından regüle edilen ve aktarılan bir özelliktir. *C. albicans* için hif formlarının maya formlarına kıyasla daha invazif enfeksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir (22).

c) Fenotip değişimi: *C. albicans* kolonileri stres altında iken kendiliğinden morfolojik değişim gösterirler (24). Beyaz koloni daha virülandır. Beyaz koloniden opak koloni oluşumu virülansı azaltır. 10^{-2}-10^{-4} sıklıkta koloni değişimi olur (22,25).

d) Yüksek molekül ağırlıklı toksinler:

Glikoprotein yapısındaki toksinler: Mannoz, glukoz gibi glikoproteinlerdir. Hücre duvarında bulunur ve bakteri endotoksinine benzerler. Pirojen etkilidir. İmmun sistemi baskılanmış hastalarda öldürücü olabilirler. Karbonhidrat kısmının toksik, protein kısmının pirojen olduğu gösterilmiştir (22).

Kanditoksin: Fareleri öldürücü, sitotoksik, farmakolojik, immünolojik, enzimatik ve enfeksiyonu artırıcı etkisi gösterilmiştir (23).

e) Düşük molekül ağırlıklı toksinler: Öldürücü ve şok oluşturucu etkili 6 farklı düşük molekül ağırlıklı toksini vardır.

f) Enzimler:

Proteinaz: Proteinleri parçalar. sIgA'nın parçalanmasına neden olup savunmayı önler, böylece adezyon, invazyon kolaylaşır. Asit pH'da aktifleşir. 6 tipi vardır. Mukoza ve deri enfeksiyonlarında 1,2,3, sistemik enfeksiyonlarda 4,5,6 daha sık görülür (23).

Maya ve hifal formdaki kandida kökenlerinin %79'unda fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır özellikle membran fosfolipidlerini parçalayarak epitelyal hücrelere tutunmada bu enzimlerin rolü olduğu ve dolayısıyla virülansa katkıda bulundukları belirtilmektedir (22).

Fosfolipaz, Lipofosfolipaz: Fosfolipidleri parçalar ve yayılmayı kolaylaştırır.

g) Siderofor oluşumu : Mannan hücre duvarında bulunur ve adezindir. Aynı zamanda hemolotiktir ve eritrositleri eriterek demir salınımına neden olur. Açığa çıkan demiri bağlamak için mantar, demir bağlayan siderofor oluşturur (22).

h) Biyofilm oluşumu: Bir başka önemli virülans faktörü, abiyotik (Kateterler, protezler) veya biyotik (mukozal hücre yüzeyleri) ortamlar üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesidir. non- albicans'larda daha çok görülmesine rağmen katater enfeksiyonunda önemlidir (22).

ı) Kitin: Mantara dayanıklılık sağlar (23).

KANDİDA ENFEKSİYONLARI

Kandida türleri nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan patojenler arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Nazokomiyal enfeksiyonlara en sık neden olan Kandida türü *C.albicans* tır. Tüm mantar enfeksiyonları içinde Kandida türleri en sık izole edilen türlerdir. Kandida türleri deri, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem florasının elemanıdırlar. *C. albicans* en fazla olmak üzere *C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis* ve *C. krusei* florada bulunan türlerdir. Kandida türlerine bağlı gelişen invazif enfeksiyonlar çoğunlukla hastanın kendi florasında kolonize olan Kandida türlerinden köken alır, yani endojendir (24). Bu türlerin insanda neden olduğu enfeksiyon, Kandidiazis olarak isimlendirilir.

Kan kültürü pozitifliğinden sonra uygun antifungal tedaviye başlamada gecikmenin mortalite oranını artıran bir faktör olduğu bilinmektedir (26). Bu nedenle kandidemi etkenlerinin antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi uygun tedavi seçiminde çok önemlidir.

Kandida konakta yerleşip kolonizasyonunu gerçekleştirmek için sıklıkla epitelyal ve endotelyal hücrelere tutunmayı tercih eder ve salgıladığı çeşitli enzimler sayesinde patojenite gösterir (26).

Kandida türleri mukozada ve deride zararsız olarak yaşayan fırsatçı mayalardır. Ancak bu anatomik bölgelerde flora bakterilerinin sayısında bir azalma olduğunda *C. albicans* çoğalarak enfeksiyonlara yol açar. Bu tip lokal enfeksiyonlar, vücudun çoğu iç organlarında yaygın veya sistemik enfeksiyonlar oluşturmak için organizmanın kan dolaşımına karıştığı kaynak odak yeri olabilir (27).

Hücresel bağışıklığın bozulması, derinin nemli kalması, diabetes mellitus, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, kortikosteroid-immunsupressif ilaçlar, sitotoksik ilaçların kullanımı, nötropeni, organ transplantasyonları, kalp ve gastrointestinal sistem

ameliyatları, ciddi yanıklar, katater uygulanması, damardan uyuşturucu kullanımı kandida enfeksiyonlarına zemin hazırlar (25).

Kandida Enfeksiyonları

- Yüzeyel kandidoz
  - Oral kandidoz
  - Genital kandidoz
  - Deri kandidozu
  - Onikomikoz
  - Kronik mukokütanöz kandidoz
- Sistemik kandidoz
- Kronik mukokutanöz kandidoz (23).

ANTİFUNGAL AJANLAR

Antifungal ajanlar sentetik veya antibiyotik maddelerdir. Mantar infeksiyonlarına karşı etkili ajanlardır. Bakterilerin tersine hem insan hem de mantar hücreleri ökaryotik hücreler olduğundan seçici toksisite için hedef bakterilere göre daha azdır. Bu nedenle insan hücrelerine zarar vermeden mantar hücrelerine etki edecek uygun ilaç tasarımını bulmak zordur ve fungal enfeksiyonların tedavisi için çok daha az sayıda ajan vardır (23).

Antifungal İlaçların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

- ❖ Ergesterol biyosentezini inhibe edenler (Polienler, azoller, alilaminler).
- ❖ Nukleus bölünmesini etkileyenler (Griseofulvin).
- ❖ Nükleik asit sentezini inhibe edenler (Flusitozin).
- ❖ Hücre Duvarına etki edenler (Ekinokandinler, polioksinler, pradimisinler).
- ❖ Protein sentezini inhibe edenler (Sordarinler).

Azoller

Sentetik antifungal ajanlardır. Geniş bir etki spektrumuna sahip, poliyenlere kıyasla daha az toksik ilaçlardır ancak fungusit etkili değillerdir. Ergosterol biyosentezini bozarak hücre membranının yapısını bozarlar. İmidazol ve triazoller, sitokrom P-450 14-α-demitilaz enzimini inhibe ederek etki gösterirler. Fungal hücre membranı; sentezi, lanosterolün ergosterole dönüşümünü içeren çok basamaklı bir prosestir. Bu enzim lanosterolün ergosterole

dönüştürülmesinde görev yapar. Böylece ergosterol biyosentezi engellenmiş olur. Aynı zamanda insanda da steroid sentezini engeller (28).

Flukonazol, diğer azoller gibi sitokrom P-450 14-α-demitilaz enzimini inhibe ederek etki gösterir. Memelilerdeki demetilaz aktivitesi flukonazolün etkisine, mantarlarınkinden daha az duyarlıdır (28).

Hem oral hem de parenteral kullanılabilir. Ağızdan alındığında çok kısa sürede emilir. Oral dozun yaklaşık %80'i idrarla atıldığından idrar yolu infeksiyonları için güçlü bir antifungal etkinlik gösterir (28). *C. krusei* ve *C. glabrata* doğal dirençlidir. Sık ve profilaktik kullanıldığından direnç oranı artmıştır (28).

14-α demetilaz enziminde değişiklik olması, 14-α demetilazın sentezinin artması, sterol biyosentez yolunun değiştirilmesi ya da aktif efluks pompaları ile ilacın dışarı atılması ile direnç gelişebilir.

ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Dilüsyon Yöntemleri

Sıvı dilüsyon

Makrodilüsyon: CLSI tarafından belirlenen M27-A3 standartları içerisinde *Candida* türleri için önerilen referans yöntemdir. Bu yöntemde besiyeri olarak son konsantrasyonu 0.165mol/L olacak şekilde MOPS ile oda ısısında tamponlanan L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 sentetik besiyeri kullanılmaktadır (29).

Mikrodilüsyon: Bu yöntemde; U tabanlı 96 çukurlu mikrodilüsyon plakları, RPMI 1640 besiyeri, iki kat konsantrasyonda ilaç ve maya süspansiyonları kullanılır (29). CLSI, 24. ve 48. Saatte gözle ve azoller için spektrofotometrik olarak değerlendirme önermektedir. Buna göre azoller için gözle okumada üreme kontrole göre bulanıklığın belirgin olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon ve de spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %50 oranında azaldığı kuyucuktaki değer MİK değeri olarak kabul edilmektedir (30). Flukonazol için 64 μg/ml ve üzerindeki MİK değeri saptanan izolatlar dirençli (R), 16-32 μg/ml arasındaki MİK değerleri doza bağımlı duyarlı (DBD) ve 8μg/ml ve altı ise duyarlı (D) olarak kabul edilmektedir (31).

Agar dilüsyon

Antimikrobiyal madde içeren çözeltilerin uygun dilüsyonları, 45-50°C'ye soğutulmuş katı besiyerine eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra besiyerinin kalınlığı 3-4mm olacak şekilde petri plaklarına dökülür. Agar dilüsyonda 5-8mm bir alan için damlatılan inokulumda 10^4 CFU/mL bakteri olması istenir. En düşük konsantrasyondan başlanarak farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklara inokülasyon yapılır. İnokülasyon damlaları kuruduktan sonra plaklar ters çevrilerek inkübasyona kaldırılır. İnkübasyon süresi sonunda plaklarda üremeyi inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak bildirilir (29).

Difüzyon Yöntemleri

Disk difüzyon

Katı besiyerine inoküle edilen mikroorganizmaların besiyerinin yüzeyine konulan disklerden yayılan antimikrobiyal madde ile birlikte üremeleri esasına dayanır. Maddenin etkinliği üremenin engellendiği zon çaplarıyla belirlenir. McFarland 0,5 yoğunluğu kullanılır (23).

Kuyucuk difüzyon

Kuyucuk difüzyon yönteminde esas, besiyerinin yüzeyine açılan standart çaptaki kuyucuklara konulan etken maddenin değişik sulandırımdaki çözeltilerinin katı besiyerine difüzyonu ve katı besiyeri yüzeyine inoküle edilmiş mikroorganizmaların üremelerine olan etkisinin araştırılmasıdır (23).

Oluk yöntemi

Katı besiyerine açılan uzunca bir oluk içine antimikrobiyal madde çözeltisi konur. Bu yöntem, açılan oluğa farklı noktalardan değecek şekilde çeşitli mikroorganizmaların öze ile çizilerek ekilmesi esasına dayanır. Oluktan difüze olan antimikrobiyal maddenin, çizilen mikroorganizmanın üremesine etkisi saptanır. Diğer iki yöntemden farkı tek antimikrobiyal madde ve çok sayıda mikroorganizma kullanılmasıdır (23).

E test

Gittikçe artan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren şeritlerle yapılır. İnkübasyon sonunda oluşan elips şeklinde inhibisyon zonunun stribi kestiği nokta MİK olarak değerlendirilir. Kantitatif sonuç verir (23,32).

Moleküler Yöntemler

Antifungallere direnç gelişiminin artması nedeniyle, tedavide kombine antifungallerin kullanılması ya da direnci inhibe eden bileşiklerin eklenmesi yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır (33).

Kombinasyon Testleri

Kombine bileşiklerin antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında ise sinerji testleri uygulanır. Dama tahtası testi ve Time-Kill yöntemleri sıklıkla kullanılan sinerji testleridir (34).

Dama tahtası testi

Farklı ilaçlar ve konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaç kombinasyonları ile elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitor konsantrasyonu (FİK) elde edilir. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanıp ve FİK indeksi (FİKİ) hesaplanır. Her antimikrobiyal maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilir (34).

Time-Kill testi

Dama tahtası tekniğinde yalnız inhibisyon verileri elde edildiği halde Time-Kill (öldürme eğrisi tekniği) ile, denenen kombinasyonun bakterisidal aktivitesi ölçülebilir. Bu nedenle bakterisidal amaçlı tedavi takipleri için tercih edilir. Ayrıca dama tahtası yönteminde 16-20 saat sonunda tek ölçüm yapıldığı halde, bu yöntemde zamanla birlikte değişen etki dinamik olarak gösterilebilmektedir (34)

GEREÇ VE YÖNTEM

MİKROORGANİZMALAR

Çalışmamızda CLSI M27-A3 (2015) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EuropeanCommittee on AntimicrobialSusceptibilityTesting - EUCAST) tarafından önerilen kalite kontrol suşları olarak; *Candida albicans* Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection-ATCC) 10231 ve Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50 *Candida spp.* izolatı kullanılmıştır. *C. albicans* oldukları germ tüp testi ile doğrulanan 33 izolat boncuklu kriyoviallerde stoklanarak, -80ºC'de saklanmıştır.

GEREÇLER

Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

- Gentamisin (Sigma)
- RPMI (Sigma)
- SDA (Merck)
- SLM (Merck)
- MOPS (Sigma)
- Flukonazol (Sigma)

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- 96 kuyucuklumikroplate (LpItaliana Spa)
- Boncuklu Bakteri Saklama Tüpü (Or- Bak)

- Çok kanallı otomatik mikropipetler(Eppendorf)
- Densitometre Cihazı (Biosan)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Etüv (Redlinebybinder)
- Manyetik Karıştırıcı (VELP)
- Milipor filtre (Milipore®)
- Otoklav (DaihanScientificMaxterile 47 lt)
- Pipet ucu (Axygen)
- Tek kanallı otomatik mikropipetler (Eppendorf)
- Terazi (Ohaus)
- Vortex (VELP)

YÖNTEM

Germ Tüp Testi

*C. albicans'*ın tanısında kullanılan hızlı bir testtir. *C. albicans*'ların %95-97'sinde olumludur. Germ tüp preparatının mikroskobik incelenmesinde, *C. albicans*'ın oluşturduğu kısa hiflerin baş tarafının, blaskonidiyum ile germ tüpün kesiştiği yerde boğumlanma oluşmadığı görülür (Şekil 1).

Germ Tüp Testinin Yapılışı:

1. Öze ile saf koloniye hafifçe dokunularak maya hücresi alınır.
2. İnokulum insan serumunda,0.5 ml süspanse edilir.
3. 37 ºC de 3 saat inkübe edilir.
4. Serum kültüründen bir damla alınarak lam üzerine konulur ve üzeri lamelle kapatılır. Mikroskopta önce küçük büyütme, daha sonra immersiyon objektifi ile germ tüp oluşumu açısından incelenir (23).



Şekil 1. Candida albicans'ın germ tüp oluşumu (35)

Mikrodilüsyon Yöntemi

Gentamisin ve Flukonazolün stok solüsyonları distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Çalışmada RPMI, SDA ve SLM besiyerleri kullanılmıştır (CLSI M27-A3 (2015). RPMI besiyeri MOPS ile tamponlanarak hazırlandıktan sonra milipor filtre ile süzülerek steril edilmiştir. SDA ve SLMbesiyerleriise 121°C'de 15 dakika otoklavlanaraksteril edilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi; CLSI M27-A3 önerileri doğrultusunda yapılmıştır. SDA plaklarında üretilmiş olan maya kolonilerinden SLM besiyerlerine pasaj yapılıp sıvı besiyerleri 35ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve kültürün bulanıklığı, 0.5McFarland standardına uygun bulanıklığa ulaşıncaya kadar üzerine sıvı besiyeri eklenerek ayarlanmıştır. Maya süspansiyonu McFarland0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan önce 1:50 sonra 1:20 oranında dilüe edilerek $2,5x10^3$ CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır.

Mikroplakların tüm kuyucuklarına 100 µL MOPS ile pH7'ye tamponlanmış olan L-glutamin eklenmiş, sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 sıvı besiyeri eklenmiştir. Daha sonra stok solüsyonları hazırlanan flukonazol ve gentamisin mikrodilüsyon plaklarının ilk sıradaki kuyucuklarına 100 µL hacimde eklenerek, stok solüsyondaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmıştır.

Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Sonuç olarak mikroplarda gentamisin ve flukonazolün 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4,2,1,0.5,0.25 µg/mL konsantrasyonları elde edilmiştir.

Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10µL inokülasyon yapılmıştır. Her mikrodilüsyon plağında sadece besiyeri ve mikroorganizma içeren, sadece besiyeri içeren kontrol kuyucukları

eklenmiştir. Ayrıca çözücü olarak kullanılan distile suyunda antimikrobiyal etkileri kontrol edilmiştir. Maya inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 35ºC'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda MİK, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini %50 ve tamamen inhibe eden kuyucuklar değerlendirilmiş en düşük madde konsantrasyonu olarak saptanmıştır. Böylece izolatların gentamisine ve flukonazole olan duyarlılıkları ve MİK değerleri belirlenmiştir.

Dama Tahtası Yöntemi

Flukonazol ve gentamisinin birlikte etkisininin belirlenmesi için dama tahtası testi yapılmıştır. Doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikroplaklarda gerçekleştirilecek olan dama tahtası yönteminde; mikroplakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna flukonazol seri sulandırımları, bir başka mikroplağın yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise gentamisinin seri sulandırımları dağıtılacak ve bu iki plağın içerikleri başka bir mikroplakta birleştirilmiştir (Şekil 3). İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitor konsantrasyonu (FİK) bulunur. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanır ve fraksiyonel inhibitor konsantrasyonu indeksi (FİKİ) hesaplanır. (Şekil 2). Dama tahtası yöntemi uygulanarak flukonazol ve gentamisin konsantrasyon oranlarının farklı birçok kombinasyonu denenmiştir. Birlikte etkili oldukları en uygun konsantrasyon kombinasyonu tespit edilmiştir (34,36).

FİK A = $MİKA_{kombinasyon}$/MİKA

FİK B = $MİKB_{kombinasyon}$/MİKB

FİK indeksi = FİK A + FİK B

FİK indeksi $\leq$ 0,5 ise sinerjik etki

0,5 < FİK indeksi $\leq$ 4 ise aditif etki

FİK indeksi > 4 ise antagonistik etki

Şekil 2. Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) ve raksiyonel inhibitor konsantrasyonu indeksi (FİKİ) Değerlerinin Hesaplanması

Sinerjik Etki; İki ilaç birbirinin etkilerini güçlendirir.

Aditif Etki; İlaçların etkisi tek tek kullanıldıklarında gözlenen etkilerin toplamına eşittir.

Antagonistik Etki; İlaçların etkisi tek tek kullanıldıklarında gözlenen etkilerinden daha düşüktür (34,36).



Şekil 3. Flukonazol ve Gentamisinin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 96 kuyucuklu mikroplakta üremiş *C.albicans* izolatı.

BULGULAR

MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ SONUÇLARI

Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri EUCAST ve CLSI sınır değerleri dikkate alınarak incelenmiş ve MİK sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. EUCAST önerileri doğrultusunda incelendiğinde 33 *C. albicans* izolatının 14 tanesinin flukonazole dirençli olduğu, tespit edilmiştir.

Tablo 2. *C. albicans*'ın EUCAST ve CLSI ya göre Flukonazol MİK sınır değerleri ve duyarlı ve dirençli izolat sayıları (29,37)

	EUCAST				CLSI			
	MİK sınır değeri (µg/mL)		İzolat Sayısı		MİK sınır değeri (µg/mL)		İzolat Sayısı	
	Duyarlı (S)	Dirençli (R)	S	R	Duyarlı (S)	Dirençli (R)	S	R
Flukonazol	≤2	>4	20	14	≤ 8	≥ 64	23	11

Gentamisin'in etkisi araştırılmış ve gentamisinin *C. albicans* izolatları üzerinde antimikrobiyal bir etkisi gözlemlenmemiştir. *C. albicans* izolatlarının flukonazole ve gentamisine duyarlılık sonuçları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. *C. albicans* izolatlarının flukonazol ve gentamisin duyarlılık sonuçları

İzolat No:	**Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) (µg/mL)**	
	Flukonazol	**Gentamisin**
1	≤ 0,25	>512
2	≤ 0,25	>512
3	256	>512
4	≤ 0,25	>512
5	≤ 0,25	>512
7	≤ 0,25	>512
8	128	>512
9	32	>512
10	512	>512
11	≤ 0,25	>512
13	≤ 0,25	>512
15	≤ 0,25	>512
16	≤ 0,25	>512
17	128	>512
18	≤ 0,25	>512
20	32	>512
21	≤ 0,25	>512
22	≤ 0,25	>512
23	32	>512
27	≤ 0,25	>512
28	64	>512
29	64	>512
30	64	>512
31	≤ 0,25	>512
48	8	>512
49	128	>512
51	64	>512
53	≤ 0,25	>512
56	≤ 0,25	>512
59	≤ 0,25	>512
61	≤ 0,25	>512
63	128	>512
64	≤ 0,25	>512
C.albicans ATCC10231	1	>512

Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) değerleri Şekil 1'e göre hesaplanmış ve izolatlar için flukonazol ve gentamisin kombinasyonunun MİK değerleri Tablo 4-14' de verilmiştir.

FİK G = MİKGkombinasyon/MİKG
FİK F = MİKFkombinasyon/MİKF
FİK indeksi = FİK G+ FİK F
FİK indeksi ≤ 0,5 İSE SİNERJİK ETKİ
0,5 < FİK indeksi≤ 4 İSE ADİTİF ETKİ
FİK indeksi > 4 İSE ANTAGONİSTİK ETKİ

Tablo 4. 49 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

Üremenin %100 olduğu kuyucuklar

Üremenin %50 azaldığı kuyucuklar

Aditif etkinin görüldüğü kuyucuklar

Sinerjik etkinin görüldüğü kuyucuklar

FİK gen = MİK $_{GM}$kombinasyon/MİK $_{GM}$

FİK $_{FLZ}$ = MİK $_{FLZ}$kombinasyon/MİK $_{FLZ}$

FİK =512/1024+64/128= 1 ≤4 Aditif Etki

FİK $_{GM}$ = MİK $_{GM}$kombinasyon/MİK $_{GM}$

FİK $_{FLZ}$ = MİK $_{FLZ}$kombinasyon/MİK $_{FLZ}$

FİK =256/1024+64/128= 0,75 ≤4 Aditif Etki

FİK $_{GM}$ = MİK $_{GM}$kombinasyon/MİK $_{GM}$

FİK $_{FLZ}$ = MİK $_{FLZ}$kombinasyon/MİK $_{FLZ}$

FİK =128/1024+64/128= 0.625≤4 Aditif Etki

FİK $_{GM}$ = MİK $_{GM}$kombinasyon/MİK $_{GM}$

FİK $_{FLZ}$ = MİK $_{FLZ}$kombinasyon/MİK $_{FLZ}$

FİK =32/1024+64/128= 0,53125≤4 Aditif Etki

Tablo 5. 8 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =512/1024+64/128= 1 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =256/1024+64/128= 0,75 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =128/1024+64/128= 0,625 ≤4 Aditif Etki

Tablo 6. 17 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =16/1024+512/256= 2,0156≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =8/1024+512/256= 2,0078≤4 Aditif Etki

Tablo 7. 20 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM kombinasyon}/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =256/1024+16/32= 0,75 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM kombinasyon}/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =32/1024+32/32= 1,03125 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM kombinasyon}/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =128/1024+32/32= 1,125 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM kombinasyon}/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =16/1024+32/32= 1,015625 ≤4 Aditif Etki

Tablo 8. 23 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =128/1024+8/16= 0.625 <4 Aditif

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =64/1024+16/16= 1,0625≤4 Aditif Etki

Tablo 9. 29 numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =256/1024+16/32= 0,75 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =8/1024+32/32= 1,0078125 ≤4 Aditif Etki

Tablo 70. 30 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

Üremenin %100 olduğu kuyucuklar

Üremenin %50 azaldığı kuyucuklar

Aditif etkinin görüldüğü kuyucuklar

Sinerjik etkinin görüldüğü kuyucuklar

$FİK_{GM} = MİK_{GM kombinasyon}/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =8/1024+16/64= 0,25781≤ 4 sinerjik Etki

FİK gen = MİK gen kombinasyon/MİK gen

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ kombinasyon}/MİK_{FLZ}$

FİKİ =16/1024+16/64= 0,26562 ≤ 4 sinerjik Etki

Tablo 11. 28 Numaralı izolat için gentamisin veflukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =256/1024+8/32= 0,5 ≤4 sinerjik Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =128/1024+16/32= 0,625 ≤4 Aditif Etki

Tablo 12. 9 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =8/1024+32/32= 1,00781 ≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =16/1024+32/32= 31,01562≤4 Aditif Etki

Tablo 13. 63 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =512/1024+256/256= 1,5≤4 Aditif Etki

Tablo 14. 48 numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	512/0	256/0	128/0	64/0	32/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0
B	0/512	512/512	256/512	128/512	64/512	32/512	16/512	8/512	4/512	2/512	1/512	0,5/512
C	0/256	512/256	256/256	128/256	64/256	32/256	16/256	8/256	4/256	2/256	1/256	0,5/256
D	0/128	512/128	256/128	128/128	64/128	32/128	16/128	8/128	4/128	2/128	1/128	0,5/128
E	0/64	512/64	256/64	128/64	64/64	32/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64
F	0/32	512/32	256/32	128/32	64/32	32/32	16/32	8/32	4/32	2/32	1/32	0,5/32
G	0/16	512/16	256/16	128/16	64/16	32/16	16/16	8/16	4/16	2/16	1/16	0,5/16
H	0/8	512/8	256/8	128/8	64/8	32/8	16/8	8/8	4/8	2/8	1/8	0,5/8

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =8/1024+4/8= 0,5078125≤4 Aditif Etki

$FİK_{GM} = MİK_{GM}kombinasyon/MİK_{GM}$

$FİK_{FLZ} = MİK_{FLZ}kombinasyon/MİK_{FLZ}$

FİKİ =16/1024+4/8= 0,515625≤4 Aditif Etki

Çalışmaya dahil edilen flukonazole dirençli 14 izolata dama tahtası yöntemi uygulanarak flukonazol ve gentamisin konsantrasyon oranlarının farklı birçok kombinasyonu denenmiş olup flukonazol ve gentamisinin MİK değerleri, dama tahtası sonuçları , FİK değerleri ve etkileşim türü Tablo 15 te verilmiştir. Bu sonuçlara göre 2 adet sinerjik etki 11 adet aditif etki tespit edilmiştir.

Tablo 85. FLZ ve GM'nin MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

İzolat numarası	FLZ MİK (µg/mL)	GM MİK (µg/mL)	Kombinasyon FLZ/GM konsantrasyonu	FİKİ	Etkileşim türü
3	512	1024	512/8	1,0078125	aditif
8	128	1024	64/128	0,625	aditif
9	32	1024	32/8	1,00781	aditif
17	256	1024	512/8	2,0078	aditif
20	32	1024	32/16	1,015625	aditif
23	16	1024	16/64	1,0625	aditif
28	32	1024	8/256	0,5	**sinerjik**
29	32	1024	32/8	1,0078125	aditif
30	64	1024	16/8	0,25781	**sinerjik**
48	8	1024	4/8	0,5078125	aditif
49	128	1024	64/32	0,53125	aditif
51	128	1024	128/8	1,0078125	aditif
63	256	1024	256/512	1,5	aditif

TARTIŞMA

Bağışıklık sistemi zayıf hastaları tehdit eden kandidiyazis, son zamanlarda artış göstermektedir. Bununla birlikte, piyasadaki antifungal ilaçların sayısı, mevcut antibakteriyel ilaçların sayısına kıyasla sınırlıdır. Bu durum aynı zamanda dirençli mantarların neden olduğu enfeksiyonların artmasından dolayı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılar. Kombine ilaç tedavisi bu sorunu çözmeye yönelik kullanılan en yaygın ve etkili stratejilerden biridir (1).

Azol grubu antifungallerden olan flukonazol, *Candida albicans* enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde, maliyetinin düşük olması ve toksisitesinin az olması nedeni ile oldukça sık kullanılmıştır ve kullanılmaktadır (38). Ancak, yaygın flukonazol kullanımı, flukonazol direnci veya çoklu azol türevlerine çapraz direnç insidansının artmasına neden olmuştur. Diğer gruplara ait antifungal ilaçlar mevcuttur ancak hala sınırlı sayıdadır ve bu nedenle toksisite, bakım maliyeti ve direnç klinikte ciddi problem olmaya devam etmektedir. (1).

Çalışmamıza dahil edilen 33 adet *C.albicans* izolatının 14'nün (%42) flukonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Flukonazol direnci tespit edilen *C.albicans* izolatları üzerinde ayrıca gentamisinin etkisi araştırılmış ve herhangi bir etki gözlenmemiştir. Ancak gentamisin ve flukonazol birlikte kullanıldığında aditif ve sinerjik etkiler gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonunda 14 izolattan 2 tanesinde sinerjik etki 11 tanesinde aditif etki tespit edilmiştir. İlaçların, çalışmaya alınan izolatlar üzerine herhangi bir antagonistik etkisi saptanmamıştır.

Antifungal ilaç keşfi ve gelişimi antibakteriyel ilaçlara nazaran daha yavaştır. Antifungal ilaçlara karşı gelişen direnç nedeni ile antifungallerin etkinliği azalır (39). Bu nedenle

kullanılmakta olan ilaçların başka moleküller ile kombine kullanımları, yeni ilaç keşfine kıyasla daha gerçekçi bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Liu ve arkadaşları (2016) dirençli *C. albicans*'lar üzerine flukonazol ve kalsiyum kanal blokörlerinin sinerjik etkilerini araştırmışlardır (1). Yapılan çalışma bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Tek başına kalsiyum kanal blokörlerinin MİK değerleri > 512 µg / mL olarak tespit edilmiştir ve antifungal etkisi olmadığı belirtilmiştir. Ancak iki ilaç beraber kullanıldığında sinerjik etki gözlemlemişlerdir.

Lu ve arkadaşları (2018) azol direnci olan kandidalar üzerine gentamisinin sinerjik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan tüm suşlara karşı gentamisin'in MİK'leri > 512 µg / mL olarak tespit edilmiştir (11). Bizim çalışmamızda da çalışmaya dahil edilen tüm izolatların gentamisin MİK değerleri > 512 µg / mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar gentamisinin herhangibir antifungal etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak, gentamisin ile flukonazol kombinasyon halinde kullanıldığında *C. albicans* (28 ve 30) izolatları üzerinde sinerjik etkileri olduğu ($FİK_{28}$=0,5 ve $FİK_{30}$=0,25781) gözlemlenmiştir, GM anlamlı derecede dirençli *C. albicans*'ın flukonazolün duyarlılığını arttırmıştır.

Kantarcıoğlu ve Yücel'in yapmış oldukları çalışmada Terbinafin ve flukonazol kombinasyonunun klinik *C. albicans* izolatları üzerine in vitro şartlarda denenmiştir. İki ilacın etkinlikleri karşılaştırıldığında tek başlarına göstermiş oldukları etkinliğe kıyasla birlikte göstermiş oldukları etkide bir artış gözlemlenmiştir (40). Bizim çalışmamızda da gentamisin ve flukonazolun tek başına etkinliklerine oranla beraber kullanıldıklarında bir artış saptanmıştır. Bu iki ilaç, *C. albicans* karşısında birbirinin in vitro aktivitesini artırmaktadır diyebiliriz.

Bu çalışma invitro şartlarda antifungal ve antimikrobiyal ajanların birlikte kullanılmasının olumlu sonuçlar göstereceğini ön görmektedir. Bununla birlikte, Amerikan Sağlık Sistemi Eczacıları Birliği, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve diğer in vitro duyarlılık test sonuçlarının, azollere klinik yanıtın bir göstergesi olmadığını savunmaktadır (41). Flukonazolün ve diğer azollerin in vitro ortam pH'sı, besiyerinin içeriği, mantarın spor, maya veya miçel döneminde olması, inkübasyon süresi ve inokulum büyüklüğü gibi faktörlerden dolayı in vitro etki düzeyinin, diğer azollerde olduğu gibi, *in vivo* etkisiyle paralellik göstermeyebileceğini bildirmişlerdir. Buna dayanarak *in vitro* şartlarda yapılan çalışmaların *in vivo* olarak da desteklenmesi önerilmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, flukonazole dirençli *Candida albicans* izolatlarında, gentamisinin flukonazolün etkinliği üzerine etkisinin belirlenerek, flukonazole duyarlılığı artıracak uygun gentamisin konsantrasyonları hesaplanmış ve alternatif olabilecek gentamisin + flukonazol kombinasyonları belirlenmiştir. Dirençli mantar enfeksiyonlarına karşı tedavide alternatif olarak çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanılmasının uygun olabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir. Bu bulgular cesaret verici olmakla beraber çok daha fazla izolat ile çalışmanın tekrar edildikten sonra sonuçların in vivo ve in vitro uyumunun klinik olarak araştırılması gerekmektedir. Flukonazole dirençli olan ve gentamisin ile MİK değeri azalan izolatlarda direncin kaynağının araştırılması için moleküler çalışmaların yapılması önerilmektedir.

ÖZET

Güncel çalışmalar antifungal ilaç keşfi ve gelişimi antibakteriyel ilaçlara nazaran daha yavaş olduğunu göstermektedir. Antifungal ilaçlara karşı gelişen direnç antifungallerin etkinliğinin azalmasına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle kullanılmakta olan ilaçların başka moleküller ile kombine kullanımları, yeni ilaç keşfine kıyasla daha gerçekçi bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, flukonazolün gentamisin ile kombine kullanılmasının, flukonazole dirençli kandida izolatlarının flukonazolün MİK değeri üzerine etkisi saptanarak, flukonazol direncini ortadan kaldıran ideal gentamisin konsantrasyonlarının hesaplanması ve böylece flukonazole dirençli kandida enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif olabilecek bir flukonazol+antibiyotik kombinasyonu belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen 33 adet *C.albicans* izolatının 14'nün (%42) flukonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Flukonazol dirençli *C.albicans* izolatları üzerinde gentamisinin tek başına etkili olmadığı gözlenmemiştir. Ancak gentamisin ve flukonazol birlikte kullanıldığında aditif ve sinerjik etkiler gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonunda 14 örnekten 2 tanesinde sinerjik etki, 11 tanesinde aditif etki tespit edilmiştir. İlaçların, çalışmaya alınan izolatlar üzerine herhangi bir antagonistik etkisi saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: flukonazol, gentamisin, dama tahtası yöntemi, *Candida spp.*

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GENTAMICIN TO FLUCONAZOLE IN FLUCONAZOLE RESISTANT ISOLATES OF *CANDIDA SPP.*

SUMMARY

Recent studies show that antifungal drug discovery and development is slower than antibacterial drugs. Resistance to antifungal drugs contributes to the decrease in the effectiveness of antifungals. Therefore, the combined use of drugs in use with other molecules is considered to be a more realistic method than the discovery of new drugs. In this study, the effect of the combined use of fluconazole with gentamicin on the MIC value of fluconazole resistant candida isolates of fluconazole was determined, and an ideal combination of fluconazole for the treatment of fluconazole-resistant candida infections was determined. Of the 33 *C.albicans* isolates included in our study, 14 (42%) were found to be resistant to fluconazole. Gentamicin alone was not observed on fluconazole-resistant *C.albicans* isolates. However, when gentamicin and fluconazole were used together, additive and synergistic effects were observed. At the end of this study, synergistic effect was detected in 2 of 14 samples and additive effect in 11 of them. No antagonistic effect of the drugs on the study isolates was detected.

Keywords: fluconazole, gentamicin, checker board assay, *Candida spp.*

KAYNAKLAR

1. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. PLoS One 2016;11(3):1-12.

2. Karabıçak N, Alem N. *Candida* türlerinin triazol antifungal duyarlılık profilleri: Antifungal direncin belirlenmesinde yeni CLSI türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerlerinin uygulanması. Mikrobiyol Bul 2016;50.1:122-32.

3. Pfaller MA, Andes D R, Diekema DJ, Horn D L, Reboli A C, Rotstein C, Azie NE. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of Candida in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. PloS one 2004;9(7):e101510.

4. Pfaller MA, Diekema D J, Jones R N, Sader HS, Fluit A C, Hollis, RJ,Messer SA. International surveillance of bloodstream ınfections due tocandida species: frequency of occurrence and ın vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of ısolates collected from 1997through 1999 in the sentry antimicrobial surveillance program. Journal of Clinical Microbiology 2001;39(9):3254-3259.

5. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. Diagnostic microbiology and infectious disease 2015;82(4):303-313.

6. Chen TC, Chen YH, Chen YC, Lu PL. Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of Candida glabrata with cross-resistance to triazole antifungal agents. The Kaohsiung journal of medical sciences 2012;28(6):306-315.

7. Koçoğlu E, Bayram A, Balcı İ. Klinik örneklerden izole edilen kandida türleri ve antifungal duyarlılıkları. Van Tıp Dergisi 2005; *12*(3):195-200.

8. Beyza E. Fungal Hastane enfeksiyonları: Epidemiyoloji ve Kontrol. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 1998;2:150-155.

9. Yücel A, Kantarcıoglu AS. *Candida albicans'ın* taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. Cerrahpasa J Med. 1999;30(3):236-246.

10. Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis. 2011;11:142–151.

11. Lu M, Yu C, Cui X, Shi J, Yuan L, Sun S. Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans.* International Journal of Antimicrobial Agents 2018;51:107-114.

12. Calderone RA, Clancy CJ. *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology Press 2011

13. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mycopathologia. In. Heitman MJ, Mandell J. (eds) Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8 th ed. e Philadelphia:e2000;149(1):47-48.

14. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2015;5(7):a019752.

15. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Uppdate on antifungal drug resistance. Curr Clin Microbiol Rep 2015;2:84-95.

16. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clinical infectious diseases 2008;46(1):120-128.

17. Chauhan ND, Singh PR, Calderone R, Kruppa M. The cell wall of *Candida* spp. *Candida* andCandidiasis 2002;1:159-75.

18. Abacı Ö, Haliki A. *Candida albicans'* ın virulans faktörleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji 2004;2(9):1-8.

19. Gürbüz M. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenlerinin moleküler analizi (tez).Denizli: Pamukkale Üniv; 2008.

20. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen Candida suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2011;45(2):306-17.

21. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in microbiology 2001;9(7):327-335.

22. Mayer FL, Dand W, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 2013;4(2): 119–128.

23. Abbasoğlu U, Çevikbaş A. Farmasotik Mikrobiyoloji. Ankara: 2011;293-294.

24. Çerikçioğlu N. Mantarlarda Virülans Faktörleri.ANKEM Derg 2012;26(Ek 2):261-269.

25. Engelkirk PG, Duben J. Mikrobiyoloji. İstanbul 2017; p.87.

26. Murray PR, Rosenthal KS; Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri Us AD, Başustaoğlu A.) İstanbul: Pelikan yayınları, 2016.

27. Bağış N,Önder C, Kurgan Ş. Ağız içi *Candida* enfeksiyonları ve tedavisi A.Ü. Diş Hek. Fak. Derg. 2014;41(3):191-198.

28. Kayaalp O. Klinik farmakolojinin esasları ve temel düzenlemeler. İstanbul: pelikan yayınları, 2013.

29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeast; approved standard. 2 th ed. CLSI M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne Pennsylvania, USA, 2008;.

30. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clinical microbiology reviews 2001;14(4):643-658.

31. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for flukonazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2006;19:435-447.

32. Bozkurt FY. Nazokomiyal enfeksiyon etkeni olan ve steril vücut sıvılarından izole edilen kandida türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının E Test yöntemi ile belirlenmesi. İstanbul: Haydarpaşa Numune Eği. veArş. Hast; 2008.

33. Aygül A. Antibiyotik Direncinde Dışa Atım Sistemlerinin ve Dirençle Mücadelede Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Önemi. Mikrobiyol Bul 2015;49(2):278-291.

34. Özseven AG, Sesli Çetin E, Özseven L. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu. Mikrobiyol Bul 2012;46(3):410-20.

35. https://www.medicallabtechnologymlt.com. erişim tarihi: 25.07.2019

36. Döşler S, Gürler B. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin tek başına ve kombinasyon halindeki etkilerinin araştırılması. Ankem Derg 2006;20(3):173-179.

37. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 9.0, 2018.

38. Guo F, Yang Y, Kang Y, Zang B, Cui W, Qin B. Invasive candidiasis in intensive care units in China: a multicentre prospective observational study. J Antimicrob Chemother 2013;68:1660-8.

39. Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H and Zhang L. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against Candida albicans. Virulence 2015;6(4):362-371.

40. Kantarcıoğlu S, Yücel A. In Vıtro activity Of Terbinafine in Combination with Fluconazole agaınst Candıda albicans isolates. (Terbinafin ile flukonazol kombinasyonunun Candida albicans kökenlerine karşı in vitro etkisi) Turkish Journal of Infection 2003;17(1):71-75.

41. Öncel S, Keçeli SA. Flukonazol. The Journal of Fungus 2018;9(1):67-75.

ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR

Tablo 1. *Candida* enfeksiyonlarının oluşumunda önemli olan konağa ait faktörler.....5

Tablo 2. *C. albicans'*ın EUCAST ve CLSI'ya göre Flukonazol MİK sınır değerleri ve duyarlı ve dirençli izolat sayıları.....17

Tablo 3. *C. Albicans* izolatlarının flukonazol ve gentamisin duyarlılık sonuçları.....18

Tablo 4. 49 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 20

Tablo 5. Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 21

Tablo 6. 17 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 22

Tablo 7. 20 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 23

Tablo 8. 23 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 24

Tablo 9. 29 numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 25

Tablo 10. 30 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 26

Tablo 11. 28 Numaralı izolat için gentamisin veflukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 27

Tablo 12. 9 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 28

Tablo 13. 63 Numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 29
Tablo 14. 48 numaralı izolat için gentamisin ve flukonazol kombinasyonunun MİK değerleri 30
Tablo 15. İzolatların FİK değer tablosu 31

ŞEKİLLER

Şekil 1. *Candida albicans*'ın germ tüp oluşumu 14
Şekil 2. Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) ve Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu İndeksi (FİKİ) Değerlerinin Hesaplanması 15
Şekil 3. Flukonazol ve Gentamisinin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 96 kuyucuklu mikroplakta üremiş *C.albicans* izolatı. 16

ÖZGEÇMİŞ

Bahar GENÇ

Doğum Tarihi: 21.03.1989

EĞİTİM:

1995-2003 : Arapsuyu 100. Yıl İlköğretim Okulu/ANTALYA

2003-2006 : Konyaaltı Lisesi/ANTALYA

2007-2012 : Ege Üniversitesi Hemşirelik Bölümü/İZMİR

2015- : Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri/EDİRNE

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü

Sayı : 79056779-903.99 -E.206097 16/02/2018
Konu : Bahar GENÇ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
(Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı)

İlgi : 07/02/2018 tarihli ve E.202589 sayılı yazınız.

Tez danışmanlığını Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'in yapmış olduğu, Enstitünüz Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı 1148328104 numaralı öğrencisi Bahar GENÇ'in, "Flukonazole dirençli Candida app. izolatlarında gentamisinin flukonazolün etkinliği üzerine etkisi" konulu yüksek lisans tez çalışmasında yararlanmak üzere, hastanemizden izole edilen Candida izolatlarının kullanılması uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdullah TAŞ
Merkez Müdürü V.

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Balkan Yerleşkesi Edirne 22030
Telefon:(0284) 235 27 31 Faks(0284) 235 27 30
E-Posta:bashekim@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://tuh.trakya.edu.tr/

Bilgi için: Seda BARMAN KUTLU
(Sevdağ GÜNDOĞDU GÜRSES Vekaletiyle)
Unvanı: Memur

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.