

KLİNİK ÖRNEKLERDEN PATOJEN ETKEN OLARAK İZOLE EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ SİSTEMİK ETKİLİ ANTİFUNGAL AJANLARA DUYARLILIKLARI

*Hüseyin GÜN**, *Mustafa ÖZYURT***, *Tuncer HAZNEDAROĞLU****, *Mehmet BAYSALLAR****

Anahtar Terimler:Candida, antifungal ajanlar, duyarlılık testleri

Key Words:Candida, antifungal agents, susceptibility

ÖZET

Bu çalışmada; klinik örneklerden patojen etken olarak izole ve identifiye edilen 50 Candida suşunun sistemik etkili antifungal ajanlardan, amfoterisin-B flukonazol, ketakonazol ve mikonazol nitrat'a duyarlılıkları Broth Makro dilüsyon yöntemi ile araştırılmış, sonuçlar literatür verileri ışığında tartışılmıştır.

SUMMARY

Determination of In Vitro Susceptibilities of Candida Strains Isolated From Clinical Specimens as Pathogen to Systemic Antifungal Agents

In this study, susceptibilities of 50 Candida strain isolated and identified from clinical specimens as pathogen to systemic antifungal agents including amphotericin-B, flucanazole, ketocanazole and miconazole nitrate using Macro Dilution method and results were discussed in a view of literature data.

GİRİŞ

Sağlıklı bireylerin vücut floralarında potansiyel patojen olarak bulunan Candida türleri, özellikle immun sistemi herhangi bir nedenle baskılanmış kişilerde Candidiasis adı verilen oportunistik infeksiyonlara neden olurlar (1,2,3).

Son yıllarda kanser kemoterapisindeki gelişmeler ve organ transplantasyonlarındaki sayısal artış sonucu, Candida türleri bir çok intrensek ve ekstresek predispozan faktörlerin de etkisi ile bilhassa immünoşüpresif hastalarda önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaya başlamışlardır (4,5,6,7,8). Ayrıca nozokomiyal infeksiyonlarda Candida'ların rolünün de yaklaşık % 10 civarında olduğu bildirilmiştir (9).

Günümüzde mukokutanöz, kronik mukokutanöz ve sistemik Candidiasis tedavisinde başta amfoterisin-B olmak üzere, ketokonazol, mikonazol,

* GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Bşk. Doç.Dr.

** GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Dr.

*** GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yrd.Doç.Dr.

clotrimazol, bifonazol, flukonazol ve itraconazol gibi polyen ve azol türevi antifungaller kullanılmaktadır(7,10,11,12,13,14).

Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda saptanan fungal infeksiyonların insidansındaki artışa paralel olarak, klinik kullanıma yeni sunulan antifungal ajanların sayısındaki artış ve bu ajanlara karşı direnç gelişiminin bildirilmesi, klinik uygulamalarda in vitro duyarlılık testlerine olan gereksinimi de beraberinde getirmiştir(15,16).

Ancak antibakteriyel duyarlılık testlerinin aksine bu konuda bu güne kadar henüz tam bir standardizasyon sağlanamadığından, antifungal duyarlılık testleri rutin olarak çalışılmamaktadır (13,16,17,18).

Ayrıca antifungal ajanların in vitro duyarlılıklarının belirlenmesiyle ilişkili bir çok çalışmada henüz yöntemsel bir birliktelik sağlanamamış olduğundan zaman zaman aynı antifungal ajanla elde edilen test sonuçları, laboratuvarlar arasında mukayese edildiğinde; en az dört katlık bir farkla, bazan da bir kaç bine kadar çıkan bir farkla karşılaşılabilmektedir (13,17,19,20).

Antifungal duyarlılık test sonuçlarını etkileyen faktörler arasında; inokulum preparasyonu ve miktarı, mediumun kompozisyonu ve pH'sı, enkubasyon ısısı ve süresi en çok bilinenleridir.

Bunların dışında dimorfizm ve yavaş üreme gibi organizmaya spesifik problemler ile eriyebilirlik durumu, kimyasal instabilite, parsiyel inhibisyon ve etki mekanizması gibi antifungal ajana ait diğer faktörler de sonuçları etkileyebilir(3,16,19,20,21).

Antifungal ajanların duyarlılıklarının belirlenmesinde karşılaşılan sorunlar çok iyi tanımlanmış olmasına rağmen bu konudaki standardizasyon eksikliğinden dolayı kolaylıkla çözümlenememektedir(21). Bu duruma bağlı olarak da elde edilen ve tekrarlanabilirliği değişkenlikler gösteren sonuçlar da güvenilir bir şekilde yorumlanamamaktadır(13,18).

Mevcut sorunların minimuma indirilebilmesi ve çalışmalardan arzu edilen güvenilir sonuçların elde edilebilmesi amacıyla 1982 yılında National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) bünyesinde antifungal duyarlılık testleri ile ilgili bir alt komite kurulmuş ve ilk olarak laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliği sağlayan bir metod ve referans medium geliştirme çalışmalarına başlanmıştır(16,19,21,22).

Bu gün için broth makro dilüsyon testi; C.albicans ve diğer mayaların minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum fungusidal konsantrasyon (MFC) değerlerinin saptanmasında NCCLS tarafından önerilen ve en sık kullanılan test olarak kabul edilmektedir(13,16,21,22).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma NCCLS alt komitesinin önerdiği kriterler dikkate alınarak yapılmıştır(15,16,19,22,23,24).

Kültürler:Wickerham asimilasyon ve fermentasyon testleri ile identifiye edilen ve API 20 C Aux (Analytab Product) ile de karşılaştırılan 34 *C.albicans*, (4 *C.parapsilosis*, 3 *C.tropicolis*, 3 *C.kefyr*) 3 *C.glabrata*, 2 *C.guilliermondii* ve 1 *C.krusei* olmak üzere toplam 50 *Candida* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol suşları olarak amfotericin-B için *S.cerevisiae* (Wt-2180-1A), ketokonazol ve flukonazol için *C.kefyr* (GATA 301-M) ve miconazol nitrat için *C.stellatoidea* (GATA CS-1) ve *C.albicans* (ATCC-26555) suşları kullanıldı.

Antifungal ajanlar:Çalışmada kullanılan antifungal ajanlardan, flukonazol (Pfizer), ketokonazol ve mikonazol nitrat (İlsan-İltaş) ilaç firmalarından standart toz şeklinde, amfoterisin-B(Squibb) ise piyasadan I.V.preparat (Fungizon) olarak temin edildi.

Test koşullarına ait kriterler:

1. **Medium:**L. glutaminli RPMI-1640 medium (Sigma R-8755), buffer olarak 3, N-Morpholino Propanesulfonic asid (MOPS) (Sigma M-8899) ile 0,165'lik final molarite ve pH 7.0'a tamponlanarak kullanıldı(16,22,23,24,25).

2. **Maya İnokulumunun hazırlanması:**Teste tabii tutulan maya izolatlarının Saboraud dextroz agar (SDA)'da ve 30°C'deki 24-48 saatlik subkültürleri kullanıldı. Maya hücre süspansiyonları % 0.85'lik NaCl içerisinde hazırlanarak 530 nm'ye ayarlanmış bir spektrofotometrede (Milton roy Spectronic 200) % 75-77'lik bir transmissionda 1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml.lik bir maya konsantrasyonu sağlandı (16,22,23). Test inokulumu için bu süspansiyon 1:100 oranında RPMI-1640 medium ile dilue edilerek, 1×10^4 - 5×10^4 CFU.ml.lik bir final inokulum konsantrasyonu sağlandı(16,22,24).

3. **Antifungal ajanlara ait test dilüsyonlarının hazırlanması:**Amfoterisin-B (Fungizon), kendi çözücüsünde, flukonazol, ketokonazol ve mikonazol nitrat'a ait standart tozlar potensleri dikkate alınarak uygun solventlerinde çözülüp 5 mg/ml.lik stok solusyonları hazırlandı.

Stok solusyonlardan; amfoterisin-B 40-0,625 µg/ml, flukonazol 640-1,25 µg/ml, ketokonazol 40-0,156 µg/ml ve mikonazol nitrat 200-0,19 µg/ml aralığında, ayrı ayrı 10x'lık stok final ilaç konsantrasyonları halinde hazırlandı(16,22,26,27,28).

Testin Uygulanması:Broth makro dilüsyon testi 12x75 mm.lik burgulu kapaklı steril tüplerde çalışıldı(16,22). Hazırlanan 10x stok ilaç dilüsyonlarından her *Candida* suşu için hazırlanan bir seri tüpe 0,1 ml dağıtıldı. Test tüplerinin tümüne ve antifungal ajan içermeyen (+) kontrol tüpüne daha önceden hazırlanmış maya test inokulumundan 0,9'ar ml. hacminde ilave edildi. Böylece tüplerde 1x'lık final ilaç konsantrasyonları oluşturuldu. Son tüpe negatif kontrol

tüpü olarak sadece mediumdan 1 ml. ilave edildi. Buna göre test tüplerindeki final ilaç konsantrasyonları, amfoterisin-B için 4-0,062 $\mu\text{g/ml}$, flukonazol için 64-0,125 $\mu\text{g/ml}$, ketokonazol için 4-0,0156 $\mu\text{g/ml}$ ve mikonazol nitrat için 20-0,019 $\mu\text{g/ml}$ olarak sağlandı.

İşlemleri tamamlanan test tüpleri 35°C'ta 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı(16,22,23,24).

Değerlendirme:Önce pozitif ve negatif kontroller incelendi. Kontrollerin uygun olduğu saptandıktan sonra her suş için antifungallerin MIC değerleri NCCLS alt komitesinin önerdiği skorlama kriterlerine göre saptandı(16,22,23). Özellikle azol grubu antifungallerden ketokonazol'de karşılaştığımız "parşiel inhibisyon" olayında MIC değeri olarak "1+" bulanıklık veya üremenin görüldüğü tüp dikkate alındı.

Test çalışmasına aldığımız her Candida izolatına ait MIC değerleri, saptandıktan sonra Candida türleri için MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerleri ayrı ayrı belirlendi. Bu işlemi takiben üremenin görülmediği test tüplerinden SDA plaklarına pasajlar yapıldı. 30°C'de 24-48 saat veya üreme görülene kadar inkubasyona devam edildi. İnkubasyon sonrasında SDA'da üremenin görülmediği en küçük dilüsyon MFC olarak belirlendi.

Çalışmamızda, aynı türden izolatların MIC değerlerinde varyasyonları asgariye indirebilmek için her suşu aynı test koşullarında çalıştık.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 50 Candida izolatına karşı testte kullandığımız antifungallerin MIC ve MFC değerleri Şekil-1,2,3 ve 4'te, türlere spesifik olarak saptadığımız MIC₅₀, MIC₉₀, MIC aralığı ve MFC aralıkları da Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo I: Bazı Polyen ve Azol Grubu Antifungallerin Candida Türlerine Karşı İn Vitro Aktiviteleri.

Candida türleri (sayısı)	Aranan değerler ($\mu\text{g/ml}$)	Amfoterisin-B ($\mu\text{g/ml}$)	Flukonazol ($\mu\text{g/ml}$)	Ketokonazol ($\mu\text{g/ml}$)	Mikonazol ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C.albicans</i> (34)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/0.125 (0.062-0.025 0.25-0.50	0.5/1 0.125-1 ≥ 16	0.125/0.25 0.015-0.5 ≥ 0.125	0.31/1.25 0.31-2.5 >20
<i>C.parapsilosis</i> (4)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/9.25 0.125/0.25 ≥ 2	1/2 1/2 ≥ 4	0.125/0.125 0.031-0.125 0.062-0.5	0.125/2.5 0.62-2.5 >20
<i>C.tropicalis</i> (3)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/0.25 0.125-0.25 0.25-0.50	1/1 0.5-1 ≥ 16	0.125/0.25 0.125-0.25 >4	1.25/2.5 1.25-2.5 >20
<i>C.kefyr</i> (3)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/0.125 0.125 0.25-0.50	0.25/0.50 0.25-0.50 >64	0.031/0.062 0.031-0.062 >2	(0.019/0.03 (0.019-0.03 2.5-10
<i>C.glabrata</i> (3)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/0.125 0.125 0.5-1	4/4 0.25-4 >64	1/2 0.25-2 >4	2.5/10 1.25-10 >20
<i>C.guilliermondii</i> (2)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.062/0.125 0.062-0.125 2	0.5/4 0.5-4 ≥ 32	0.015/0.015 0.0156 ≥ 4	0.625/2.5 0.625-2.5 >20
<i>C.krusei</i> (1)	MIC 50/90 MIC aralığı MFC aralığı	0.125/0.125 0.125 2	32/32 32 >64	1/1 1 >4	5/5 5 >20
KONTROL SUŞLARI					
<i>S.cerevisiae</i> (1) (Wt-2180-1A)	MIC MFC	0.25 1			
<i>C.kefyr</i> (1) (GATA 301 M)	MIC MFC		0.5 >64	0.0625 >4	
<i>C.stellatoidea</i> (1) (GATA CS-1)	MIC MFC				0.312 >20
<i>C.albicans</i> (1) (ATCC-26555)	MIC MFC	0.125 0.25	0.25 >64	0.125 >4	0.312 >20

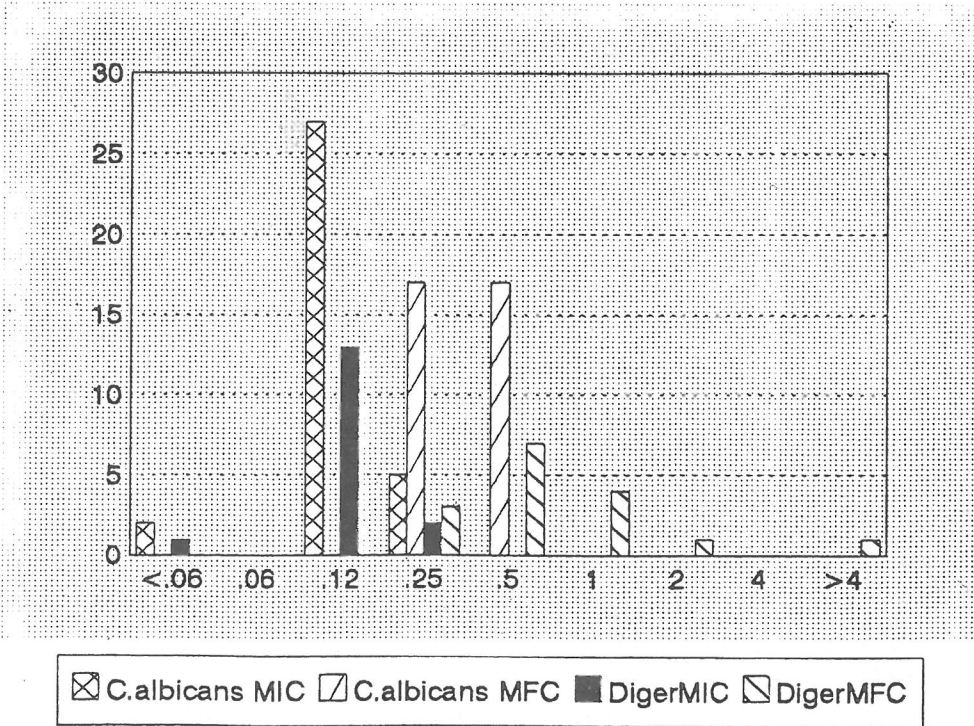
Amfoterisin-B'nin etki spektrumu 0.062 -4 $\mu\text{g/ml}$ olup *C.albicans* için $\text{MIC}_{50}/\text{MIC}_{90}$ değerlerinin her ikisi de 0.125 $\mu\text{g/ml}$, MIC aralığı $\langle 0,062-0,25 \mu\text{g/ml}$ ve MFC aralığı 0.25-0.50 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi(Şekil 1).

Flukonazol'ün etki spektrumu 0,125- $\times 64 \mu\text{g/ml}$ arasında olup *C.albicans* için $\text{MIC}_{50}/\text{MIC}_{90}$ değerleri sırasıyla 0,5/1,0 $\mu\text{g/ml}$, MIC aralığı 0,125-1 $\mu\text{g/ml}$, MFC aralığı da 16- $\times 64 \mu\text{g/ml}$ olarak saptandı(Şekil 2).

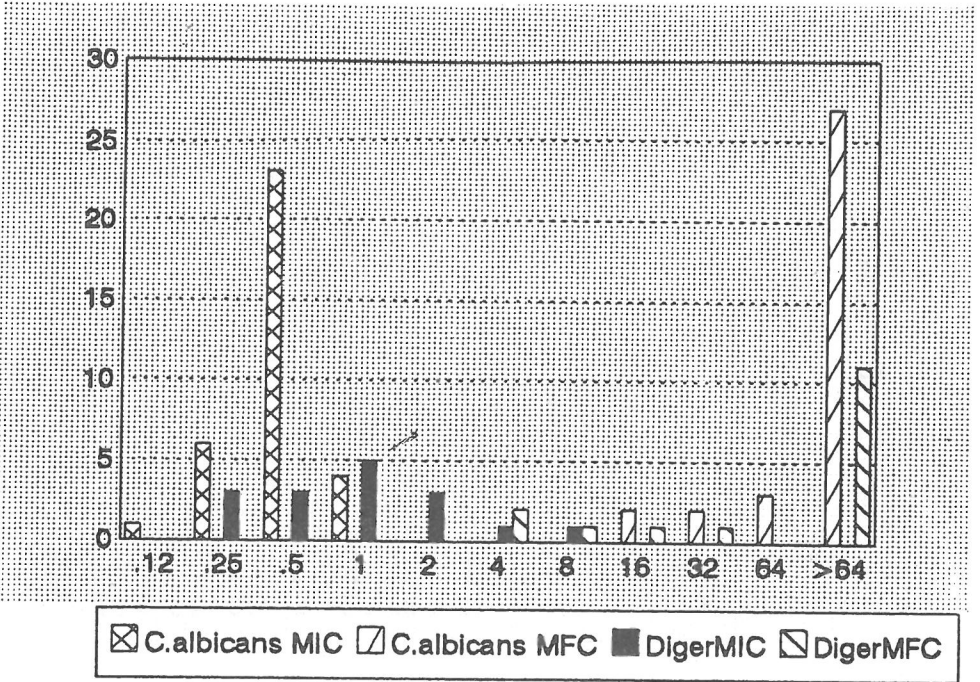
Ketokonazol'ün etki spektrumu 0.015- $\times 4 \mu\text{g/ml}$ arasında olup *C.albicans* için $\text{MIC}_{50}/\text{MIC}_{90}$ değerleri sırasıyla 0,125/0.25 $\mu\text{g/ml}$, MIC aralığı 0.015-0,5 $\mu\text{g/ml}$, MFC aralığında 0,125-4 $\mu\text{g/ml}$ olduğu saptandı (Şekil 3).

Mikonazol nitratın etki spektrumu 0.019-20 $\mu\text{g/ml}$ olup *C.albicans* için $\text{MIC}_{50}/\text{MIC}_{90}$ değerleri 0,312/1,25 $\mu\text{g/ml}$, MIC aralığı 0.312-2,5 $\mu\text{g/ml}$, MFC değerlerinin $\times 20 \mu\text{g/ml}$ olduğu saptandı (Şekil 4).

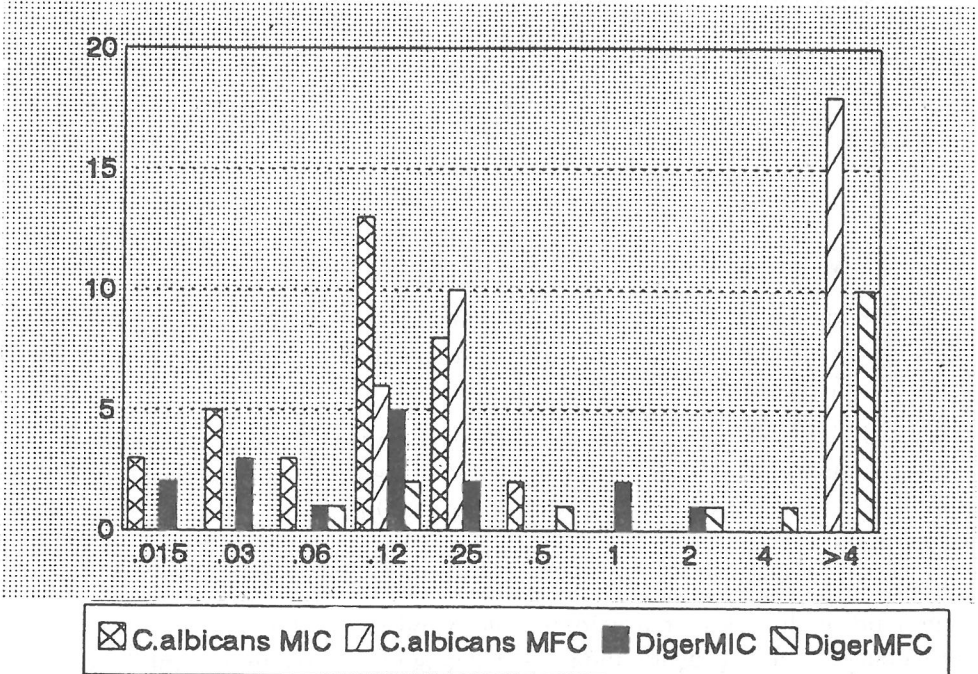
Çalışmadaki *C.albicans* ve diğer *Candida* türlerine ait antifungal duyarlılık test sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.



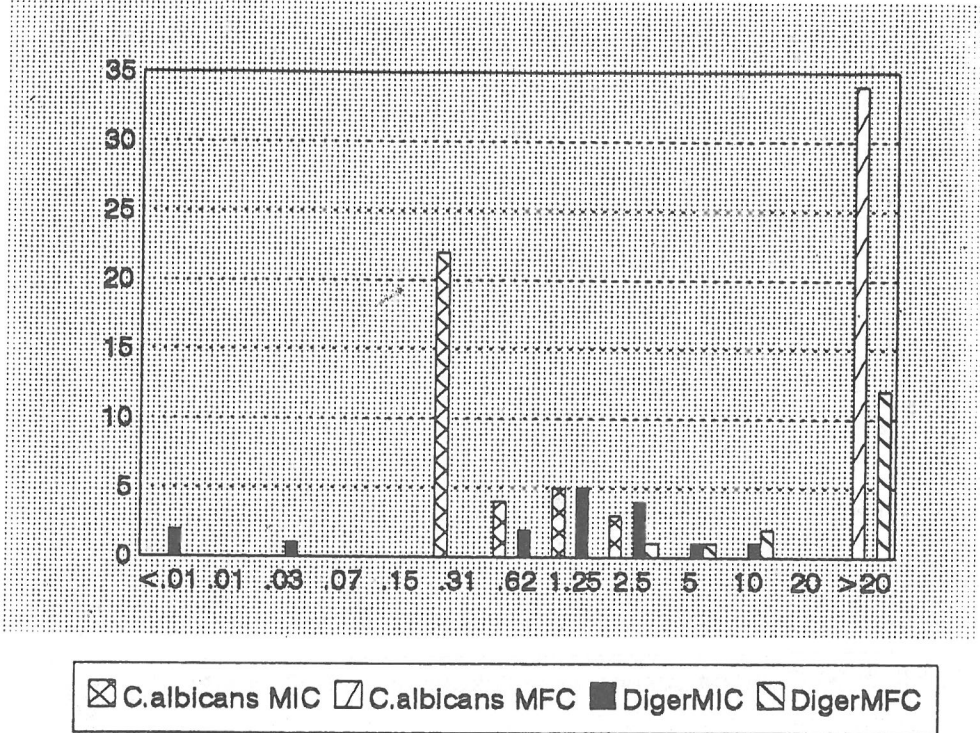
SEKIL-1: 50 *Candida* susuna karşı amfoterisin-B MIC ve MFC durumları



SEKIL-2: 50 Candida susuna karşı flukonazol'ün MIC ve MFC durumları



SEKIL-3: 50 Candida susuna karşı ketokonazol'ün MIC ve MFC durumları



SEKIL-4: 50 Candida suşuna karşı mikonazol nitrat'ın MIC ve MFC durumları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada amfoterisin-B, flukonazol, ketokonazol ve mikonazol nitrat gibi dört ayrı antifungal ajana karşı 50 Candida suşunun duyarlılıkları broth makro dilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Çalışma NCCLS alt komitesince önerilen test koşullarında; pH 7.0'de ve MOPS ile tamponlanmış L-glutaminli RPMI-1640 medium ile spektrofotometrik yöntemle hazırlanmış 1×10^4 - 5×10^4 CFU/ml.lik final maya inokulum konsantrasyonu ve 35°C 'ta 24 saatlik inkubasyonda gerçekleştirilmiştir(23,22, 16).

Değerlendirmeler skorlama yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem sayesinde ketokonazol ile çalışıldığında karşılaştığımız "parsiyel inhibisyon"u yorumlamada kolaylık sağlanmıştır(16,22).

Candida türlerine karşı saptadığımız antifungal ajanların in vitro aktiviteleri Tablo 1'de özetlenmiştir

RPMI-1640 medium kullanılarak yapılan bir çalışmada amfoterisin-B'nin MIC değerleri *C.albicans* için 0,12-0,25 µg/ml ve diğer Candida türleri için 0,12-0,5 µg/ml olarak, ketokonazol'un MIC değerleri 0,25-4 µg/ml ve 0,12-4 µg/ml olarak, flukonazol'e ait MIC değerleri de 1-64 µg/ml ve 0,5-64 µg/ml olarak rapor edilmiştir(22).

Virginia Üniversitesinde yapılan bir başka çalışmada amfoterisin-B'nin MIC değerleri *C.albicans* için, 0,2-0,78 µg/ml ve diğer Candida türleri için 0,2-1,56 µg/ml olarak, ketokonazol için; sırasıyla (0,1-128 µg/ml ve (0,1-64 µg/ml olarak, mikonazol nitrat için; 0,1-2 µg/ml ve 0,1-10 µg/ml olarak belirlenmiştir.

SDB kullanılarak yapılan çalışmalardan birinde ise amfoterisin-B'nin MIC değerleri *C.albicans* için 0,156-2.5 µg/ml ve diğer Candida türleri için 0,18-0,78 µg/ml olarak saptanmıştır. Aynı çalışmadan mikonazol nitrat'a ait MIC değerleri tüm Candida türleri için 1,56-25 µg/ml arasında bulunmuştur(29).

Antibiyotik Medium-20 (M20-Difco) ile yapılan bir başka çalışmada MIC aralığı *C.albicans* için 0.09-0,18 µg/ml ve diğer Candida türlerinde 0,18-0,78 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Yeast nitrojen Base (YNB-difco)'ün kullanıldığı bir çalışmada ise ketokonazol'un MIC değerleri *C.albicans* için 6,3 µg/ml ve diğer Candida türleri için 6,3-25 µg/ml olarak saptanmıştır(30).

Doku kültür mediumu kullanılarak yapılan bir çalışmada amfoterisin-B'nin geometrik MIC değerlerinin *C.albicans* için 0,15 µg/ml, diğer Candida türleri için 0,03-0,4 µg/ml arasında değiştiği ve ketokonazolün geometrik MIC değerlerinin de *C.albicans* için 0,008 µg/ml diğer Candida'lar için 0,04-0,49 µg/ml olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada flukonazol'e ait değerler sırasıyla 0,39 µg/ml ve 0,19-25 µg/ml olarak bulunmuştur(21).

Sentetik amino asit medium sıvısı (SAAM-F) kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ketokonazol'un MIC değerleri *C.albicans* için 0,008-0,125 µg/ml, MIC₅₀/MIC₉₀ değerleri de sırasıyla 0,016 µg/ml ve 0,031 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada flukonazole ait MIC değerleri 0,063-4 µg/ml arasında ve MIC₅₀/MIC₉₀ değerlerinin her ikisi de 0,25 µg/ml olarak saptanmıştır(28).

Bu veriler göz önüne alınıp antifungal test çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçları literatürdeki benzer çalışmalarla kıyasladığımızda birbirine yakın değerlerin yanı sıra oldukça farklı sonuçlarla da karşılaşılmaktadır. Ancak dikkatimizi çeken en önemli husus, kullanılan yöntem ve test koşullarına bağlı olarak sonuçların da değişkenlik gösterebileceğidir. Sonuçlarımızın RPMI-1640

medium ve benzer test koşulları uygulanmış çalışmaların bir çoğunda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Yine literatürde de görüldüğü gibi MIC değerlerindeki varyasyonlar laboratuvarlar arasında olduğu kadar aynı türler arasında da gözlenebilmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız antifungallerin hiç birine karşı dirençli suş'a rastlanmadığı ve Candida türleri için amfoterisin-B ve ketokonazol'un in vitro olarak en etkili antifungaller olduğunu test sonucunda gözlemledik.

Literatürlerde (12,28,31) in vitro olarak flukonazolden 16 kat daha etkili olduğu bildirilen ketokonazol, bizim çalışmada da 4-16 kat daha etkili bulunmuştur.

Antifungal duyarlılık testleriyle ilgili bir çok problem iyi tanımlanmış olmasına rağmen bu konudaki standardizasyon eksikliğinden dolayı kolayca çözümlenememektedir.

Bu sorunların ancak çeşitli kurum ve laboratuvarların uyguladıkları in vitro yöntem ve test koşullarının raporlarında detaylı olarak açıklanması ve çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirleriyle ve in vivo çalışmalarla korelasyonu ile düzeleceği kanısındayız.

Bu konuda klinisyenlerin de in vitro testlerde tam bir standardizasyon sağlanana kadar, özellikle geniş spektrumlu ve sistemik kullanımı olmasına rağmen in vivo korelasyon eksikliği bulunan, laboratuvarlar arası test sonuçları değişkenlikler gösteren azol grubu antifungaller için rutin olarak duyarlılık testi istemekten kaçınmaları gerekmektedir.

Sonuç olarak, antifungal duyarlılık testlerinin; ancak tam olarak standardize edildiğinde ve tekrarlanabilir in vitro sonuçlar klinik yanıtlarla korele edildiğinde hastalar için güvenilir olabileceği ve klinisyeni doğru yönlendirebileceği inancındayız. Böyle bir standardizasyonun gerçekleşmesi ile toksik etkileri dikkate alınarak hangi antifungalın, hangi koşullarda ne kadar dozda ve ne kadar süreyle kullanılması gerektiği sorusuna da uygun bir yanıt beraberinde getireceğini umuyoruz.

KAYNAKLAR

- 1- Freeman BA.:Medical Mycology the Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. Burrows Textbook of Microbiology 22 th ed. W.B. Saunders Company, 1985. 874-937.
- 2- Kasımoğlu Ö., Aktan G.:1990-91 Döneminde Çeşitli Muayene Maddelerinden İnfeksiyon Etkeni Olarak İzole Edilen Mayalar. Ankem Dergisi, 6:(No.2), 1992 (80)(7.Türk Ankem Kongre Bildirisi).
- 3- Pfizer International Inc.:Candida, The Growing Problem. New York, 1987, 1-34.
- 4- Bodey GP.:Candidiasis in Cancer Patients. Am.J. Med.77:(Suppl.4D), 13-19, 1984.
- 5- Bodey GP., Anaissie EJ:Opportunistic Fungal Infections;A major Problem in Immunocompromised Patients. The Am.Journal of Medicine, 1984, 1-16.
- 6- Gold JWM.:Opportunistic Fungal Infections in Patients with Neoplastic Disease. The Am. Journal of Medicine, 76:458-463, March 1984.
- 7- Tümbay E., İnci R.:Antifungal Kemoterapi Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları, No:17, 16-35,

1992.

- 8- Warren NG., Shadomy HJ.:Yeasts of Medical Importance. Manual of Clinical Microbiology 5 th. Edition, (Eds.) Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., Am.Soc. for Microbiology, Washington D.C., 1991, 617-629.
- 9- Tümbay E.:Sistemik Etkili Yeni Bir Antifungal Kemoterapötik, Flukonazol. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 3:(1), (1989 Ek baskı Seri no.1), 1989.
- 10- Dreizen S.:Oral Candidiasis. The Am.Journal of Medicine, 30:28-33, Oct.1984.
- 11- Nicholas RO., Kerridge D.:Drug Resistance in the Opportunistic Pathogens *C.albicans* and *C.glabrata*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18:Suppl. B,39-49, 1986.
- 12- Saag MS., Dismukes WE.:Minireview. Azole Antifungal Agents, Emphasis on New Triazoles. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 32:(1), 1-8, Jan., 1988.
- 13- Shadomy S., Ingroff EA.:In Vitro and In Vivo Evaluation of Antifungal Agents. Evr.J. Clin. Microbial.Infect.Dis., 8:(4), 352-361, April, 1989.
- 14- Yüce K.:Antibiyotikler ve İnfeksiyon Hastalıklarında Tedavi Prensipleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir, Bornova, 1988.S.87-90.
- 15- Pfaller MA., Burmeister L., Bartlett MS., Rinaldi MG.:Multicenter Evaluation of Four Methods of Yeast Inokulum Preparation. Journal of Clinical Microbiology, 26:1437-1441, Aug., 1988.
- 16- Shadomy S., Pfaller MA.:Laboratory Studies with Antifungal Agents Susceptibility Tests and Quantitation in Body Fluids. Manual of Clinical Microbiology 5 th. Edition, (Eds.) Balows, A., Hausler, W.J., Hermann K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., Am.Soc.for Microbiology, Washington D.C. 1991, 1173-1181.
- 17- Galgiani JN., Reiser J., Brass C., Espinel IA., Gordon MA. and Kerkering TM.:Comparison of Relative Susceptibilities of Candida Species to Three Antifungal Agents as Determined by Unstandardized Methods. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31:(9), 1343-1347, Sept. 1987.
- 18- Merz WG.:Susceptibility Testing of Medically Important Fungi. Adv.Exp. Med.Biol., 202:127-134, 1986.
- 19- Galgiani JN.:Mini Review Antifungal Agents and Chemotherapy, 31:(12), 1867-1870, Des., 1987.
- 20- Galgiani JN., McIntyre KA.:In Vitro Susceptibilities of Yeasts to A New Antifungal Triazole SCH 39304, Effects of Test Conditions and Relation to In Vivo Efficacy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 33:(7), 1095-1100, July 1989.
- 21- Kobayashi GS., Odds FC.:Current Perspectives on Antifungal Susceptibility Testing. Focus on Fluconazole First Printing, Scientific Therapeutics Information, Inc., 1989, 1-26.
- 22- Ingroff AE., Kerkering TM., Goldsan PR., Shadomy S.:Comparison Study of Broth Macrodilution and Microdilution Antifungal Susceptibility Tests. Journal of Clinical Microbiology, 29:1089-1094, June, 1991.
- 23- Anaissie E., Paetanick V. and Bodey GP.:Fluconazole Susceptibility Testing of *C.albicans*: Microtiter Method that is Independent of Inoculum Size, Temperature and Time of Ceading. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35:1641-1646, Aug. 1991.
- 24- Pfaller MA., Rinaldi MG., Galgiani JN., Bartlett MS., Body BA., Inroff EA., Fromtling RA, Hall GS., Hughes CE., Odds FC. and Sugar AM.:Collaborative Investigation of Variables in Susceptibility, Testing of Yeasts. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34:1648-1654, Sept., 1990.
- 25- Galgiani JN., Calhoun DL.:Analysis of pH and Buffer Effects on Flucytosine Activity in Broth Dilution Susceptibility Testing of *Candida albicans* in Two Synthetic Media. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 26:(3), 364-367, Sept. 1984.
- 26- Gordon MA., Lapa EW. and Passero PG.:Improved Method for Azole Antifungal Susceptibility Testing. Journal of Clinical Microbiology, 26:1874-1884, Sept., 1988.

- 27- Radetsky M., Wheeler RC., Roe MH. and Todd JK.:Microtiter Broth Dilution Method for Yeast Susceptibility Testing with Validation by Clinical Outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, 24:600-606, Oct., 1986.
- 28- Rogers TE. and Galgiani JN.:Activity of Fluconazole (UK 49, B 58) and Ketoconazole, Against *C.albicans* In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30:(3), 418-422, Sept., 1986.
- 29- Ghannoum MA., Sharif HF., Charreer H.:Sensitivity of Clinical Yeast Isolates in Kuwait Against a Number of Antifungal Agents. *Mykosen*, 27:(8), 402-410, 1984.
- 30- Ahearn DG., Ghohn Mc.Ms.:In Vitro Susceptibilities of Sucrose-Negative *C.tropicalis*, *C.lusitaniac* and *C.norvegensis* to Amphotericin-B, 5-Fluorocytosine, Miconazole and Ketoconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 19:412-416, March 1984.P.
- 31- Surarit R., Maxwell GS.:The Effects of Azole and Polyene Antifungals on the Plazma Membrane Enzymes of *C.albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25:403-413, 1987.