

Candida* İzolatlarının Antifungal Duyarlılığının Belirlenmesinde Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Methods for Determining the Susceptibilities of *Candida* isolates

Burcu DALYAN CİLO¹, Tuncay TOPAÇ¹, Harun AĞCA¹, Sezcan SAĞLAM¹, Kadir EFE¹, Beyza ENER¹

¹ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

¹ Uludağ University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Bursa, Turkey.

* Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından KUAP (T)-2014/3 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ÖZ

Geliş Tarihi (Received): 21.07.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 08.11.2017

Candida türleri yüksek mortalite ve morbiditeyle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olan ilk 10 etken arasındadır. Birçok yeni antifungal ilacın geliştirilmesine rağmen epidemiyolojik çalışmalar *Candida* izolatlarındaki antifungal direncin ciddi bir problem haline gelmeye başladığını göstermiştir. Antifungal duyarlılığı ölçmek için iki standart yöntem vardır ve bu çalışmada kandan elde edilen *Candida* izolatlarının amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve anidulofungin duyarlılığını belirlemek için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 74 *Candida albicans*, 67 *Candida parapsilosis*, 30 *Candida glabrata* ve 18 *Candida tropicalis*

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Beyza Ener, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Görükle, 16059 Bursa, Türkiye.
Tel (Phone): +90 224 295 4113, E-posta (E-mail): bener@uludag.edu.tr

izolatı kullanılmıştır. Anidulofungin hariç, minimum inhibitör konsantrasyon değerleri, CLSI yönteminde 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra, EUCAST yönteminde sadece 24 saat inkübasyondan sonra belirlenmiştir. Her iki yöntemle elde edilen MİK değerleri ± 2 dilüsyon sınırları içerisinde ise uyumlu olarak kabul edilmiştir. Her antifungal için yöntemler arasındaki kategori uyumunda klinik sınır değerler ve epidemiyolojik eşik değerlerden yararlanılmıştır. Yöntemler arasındaki uyum (± 2 dilüsyonda) tür, ilaç ve inkübasyon zamanına bağımlı olarak bulunmuştur. Yirmi dört saat inkübasyon sonunda amfoterisin B, itraconazol, posaconazol ve anidulofunginde iyi ($> \%90$) kategorisinde uyum bulunurken, flukonazol ve vorikonazolde, özellikle nispeten daha yavaş üreyen *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* izolatlarında daha düşük kategorisinde uyum ($< \%85$) bulunmuştur. Mükemmel kategori uyumu ($\%100$) amfoterisin B/C. *parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve andilofungin/C. *albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ile görülürken en kötü uyum, posaconazol ve *C.albicans* (24 saate $\%71.6$; 48 saatte $\%73$) arasında saptanmıştır. Tedavide sık kullanılan ilaçlar olan flukonazol ve anidulofungine her iki yöntemle tespit edilen direnç *C.albicans* (sırasıyla $\%1.3$; $\%2.7$), *C.glabrata* (sırasıyla 0% , $\%3.3$) ve *C.tropicalis*'de (sırasıyla 0% , $\%5.6$), in vitro azalmış duyarlılık *C.parapsilosis* ve flukonazolde (24 saatte $\%11.9$; 48 saatte $\%17.9$) görülmüştür. Flukonazol ve vorikonazol arasında çapraz direnç üç *C.parapsilosis* izolatında saptanmış ve bir *C.albicans* izolatında ise çok ilaca direnç (flukonazol, itraconazol, posaconazol ve anidulofungin) tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, her iki yöntemin benzer olduğu ve laboratuvarların tercihine göre kullanılabileceği gözlenmiştir. CLSI antifungal duyarlılık sonuçlarının 24 saat inkübasyon sonunda değerlendirilebileceğinin ancak bazen, *C.glabrata* gibi yavaş üreyen türlerde 48 saat inkübasyon sonucunda değerlendirme yapılması gerektiğinin önemli olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida* türleri; antifungal duyarlılık; minimum inhibitör konsantrasyon.

ABSTRACT

Candida species are among the top 10 pathogens causing bloodstream infections associated with high morbidity, mortality. In spite of the development of new antifungal drugs, epidemiological studies have shown that resistance to antifungal drugs among *Candida* isolates is becoming a serious problem. The aim of this study was to compare the antifungal broth microdilution methods of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole and anidulofungin susceptibility of *Candida* blood isolates. The study consisted of 74 *Candida albicans*, 67 *Candida parapsilosis*, 30 *Candida glabrata*, and 18 *Candida tropicalis* isolates. The minimum inhibitory concentrations were determined after 24 and 48 hour of incubation with CLSI method and only 24 hour of incubation with EUCAST method except anidulofungin. The MIC values obtained by both methods were considered to be compatible within ± 2 dilution limits. The categorical agreement between methods for each antifungal agent was assessed using clinical break points and epidemiological cut-off values. The agreement (± 2 dilution) between the methods was found to be species, drug, and incubation time dependent. After 24 hour incubation, good agreement category ($> 90\%$) was detected between amphotericin B, itraconazole, posaconazole and anidulofungin, but was lower category ($< 85\%$) was determined with fluconazole and voriconazole especially for relatively slow growing *C.glabrata* and *C.parapsilosis* isolates. Excellent categorical agreement (100%) was observed for amfoterisin B/C. *parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* and anidulofungin/C. *albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* but least category was determined for posaconazole and *C.albicans* (71.6% at 24 hour; 73% at 48 hour). In vitro resistance of therapeutically used fluconazole and anidulofungin determined by both methods was rare among *C.albicans* (1.3% , 2.7% respectively), *C.glabrata* (0% , 3.3% respectively) and *C.tropicalis* (0% , 5.6% respectively) isolates but, an increase of non-susceptible isolates were observed among *C.parapsilosis* (11.9% at 24 hour of incubation; 17.9% at 48 hour of incubation) for fluconazole. There was also a cross resistance between fluconazole and voriconazole for three *C.parapsilosis* isolates and one multidrug resistant (fluconazole, itraconazole, posaconazole and anidulofungin) *C.albicans* isolate (fluconazole, itraconazole, posaconazole and anidulofungin). As a result in this study, it was determined that both methods were similar and can be used according to preference of laboratories. The CLSI antifungal susceptibility test results can be

assessed at the end of 24 hour incubation, but sometimes it is important that the evaluation should be performed as a result of 48 hour incubation in slow growing species such as *C.glabrata*.

Keywords: *Candida* species; antifungal susceptibility; minimum inhibitory concentration.

GİRİŞ

İnvaziv mantar enfeksiyonları sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olup en sık karşılaşılan etkenler *Candida* ve *Aspergillus* türleridir. Günümüzde geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve immünsüpresif ilaçların yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren nötropeniler, artan kateter kullanımı ve artan majör kardiyak ve abdominal cerrahi gibi girişimsel işlemler nedeniyle *Candida* türleri fırsatçı hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ön sıralarda yer almaktadırlar¹. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında erken tanı ve tedavi mortalite ve morbiditenin azaltılması açısından önemlidir. Son yıllarda tedavide kullanılabilecek farklı etki mekanizmalarına sahip yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi ve artan antifungal direnç nedeniyle antifungal duyarlılık testlerine olan gereksinim artmış ve geliştirilen yöntemler sayesinde antifungal duyarlılık testleri klinik laboratuvarlarda daha fazla kullanılmaya başlanmıştır^{2,3}.

Antibakteriyel duyarlılık testleri için standart yöntemler uzun yıllardır uygulanmakla birlikte, antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyon nispeten daha yenidir. İlk kez 1982 yılında "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" (önceki adı ile National Committee for Clinical Laboratory Standards) tarafından antifungal duyarlılık testleri için bir alt komite kurulması ile süreç başlamıştır. Uzun ve kompleks bir standardizasyon süreci, çok merkezli çalışma sonuçları ve konsensus dokümanlarından (1992'de M27-P; 1995'te M27-T; 1997'de M27-A; 2002'de M27-A2) sonra yeni antifungaller eklenerek hazırlanan M27-A3 rehberi ve ek bilgi dokümanı, 2008 yılında yayınlanmıştır^{4,5}. Sıvı dilüsyon yöntemi ve 48 saat inkübasyon sonunda minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlenmesinin anlatıldığı bu rehberde *Candida* türleri için genel klinik sınır değerler bulunmakla birlikte, türe özgü klinik sınır değerleri bulunmamaktadır. Daha sonraki yıllarda, CLSI antifungal çalışma grubu ve çeşitli araştırmacılar tarafından antifungal duyarlılık sonuçlarının daha erken (24 saat) değerlendirilme validasyonu, direnci daha iyi gösteren epidemiyolojik eşik ve türe özgü klinik sınır değerlerinin oluşması sağlanmıştır⁶. Bu gelişmeler sonunda ek bilgi dokümanı (M27-S4) 2012 yılında yenilenmiştir⁷.

Bir diğer uluslararası sıvı mikrodilüsyon yöntemi ise "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" tarafından 2002 yılından itibaren çeşitli versiyonlarla (2002'de Discussion document E.Dis. 7.1; 2008'de Definitive Document E.Def 7.1; 2012'de Definitive Document E.Def 7.2) yenilenen ve daha çok Avrupa'da tercih edilen referans (E.Def 7.3) yöntemdir⁸. İki referans yöntem benzer olmakla birlikte, besiyeri içeriği, inokulum miktarı, inkübasyon zamanı ve değerlendirme açısından bazı farklılıklar bulunmaktadır. EUCAST kılavuzu son yıllarda antifungal duyarlılık sonuçlarının daha erken ve daha objektif olarak değerlendirilmesi yönünde değişiklikler yapmıştır⁸.

Ülkemizde uzunca bir süredir antibiyotik duyarlılık testlerinde CLSI rehberi kullanılmakla birlikte, Sağlık Bakanlığı'nın da önerileri ile EUCAST rehberine geçiş başlatılmıştır. Bu geçişin en önemli nedeni ülkemizin Avrupa Birliği'ne giriş süreci ve EUCAST dokümanlarına ücretsiz olarak web sitesinden (www.eucast.org) ulaşılabilesidir. Antifungal duyarlılıkla ilgili henüz belirlenmiş bir süreç olmamakla birlikte, kısa bir süre içinde EUCAST rehberinde önerilen antifungal duyarlılık yönteminin kullanımının artacağı beklenmektedir. Bu çalışmada, hastanemizden kan örneklerinden elde edilen *Candida* izolatlarının antifungal ilaçlara olan duyarlılıklarının CLSI ve EUCAST rehberlerine dayalı yöntemler ile belirlenerek karşılaştırılması ve her iki yöntem ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kan örneklerinden elde edilen ve çimlenme borusu, mısır unu-tween 80 besiyerindeki morfoloji ve API ID32 C (bioMerieux Marcy l'Etoile, Fransa) ile *Candida albicans* (n= 74), *Candida parapsilosis* (n= 67), *Candida glabrata* (n= 30), *Candida tropicalis* (n= 18) olarak tanımlanan 189 *Candida* izolatı kullanıldı. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait stoklarda -80°C'de saklanan izolatlar, Sabouraud Dekstroz agara (SDA) iki kez pasajlanarak canlandırıldı ve saf kültür elde edildi. Ayrıca, *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve *C.krusei* ATCC 6258 suşları kalite kontrolü için her deneyde kullanıldı.

Çalışma izolatları ve kalite kontrol suşlarının flukonazol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, ABD), vorikonazol (Pfizer Central Research, New York, NY, ABD), itrakonazol (Sigma Aldrich, ABD), posakonazol (Sigma Aldrich, ABD), amfoterisin B (Amresco, OH, ABD) ve anidulafungine (Pfizer Central Research, ABD) in vitro duyarlılıkları CLSI M27-A3 ve EUCAST EDef 7.3 rehberlerinde önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi^{4,8}.

CLSI önerilerine göre; antifungal ilaçlar, %0.2 glikoz içeren RPMI 1640 besiyerinde sulandırılarak U tabanlı mikrodilüsyon plaklarına uygun konsantrasyonda dağıtıldı. İnokulum süspansiyonu son konsantrasyonu 0.5×10^3 - 2.5×10^3 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı ve değişik konsantrasyonlarda antifungal bulunan mikrodilüsyon kuyucuklarına dağıtıldı. Plaklar 35°C'de inkübe edildi. Anidulafungin hariç diğer ilaçların plakları görsel olarak 24 ve 48 saat sonra değerlendirildi. Anidulafungin plakları 24 saat sonra sadece görsel değerlendirildi. Amfoterisin B için kontrol kuyucuğuna göre üremenin tam inhibe edildiği kuyucuk, diğer ilaçlar için ise üremenin belirgin azaldığı kuyucuk MİK olarak belirlendi⁴.

EUCAST önerilerine göre, CLSI önerilerinden farklı olarak düz tabanlı mikrodilüsyon plakları, %2 glikoz içeren RPMI 1640 besiyeri ve daha yüksek inokulum (0.5×10^5 - 2.5×10^5 hücre/ml) içerecek şekilde hazırlandı. Plaklar 35°C'de inkübe edildi ve MİK değerleri 24 saat sonra 530 nm absorbansta spektrofotometrik olarak belirlendi. Amfoterisin B için kontrol kuyucuğuna göre üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuk, diğer ilaçlar için ise %50 azaldığı kuyucuk MİK olarak belirlendi⁸.

Her iki yöntemle elde edilen MİK değerleri ± 2 dilüsyon sınırları içerisinde ise, uyumlu olarak kabul edildi ve iki yöntem arasında uyum oranı yüzde olarak hesaplandı. Kategori uyumunun belirlenmesinde, her iki yöntem için kendi klinik sınır değerleri olduğu zaman klinik sınır değerlerinden, olmadığı zaman her iki yöntemin kendi epidemiyolojik eşik değerlerinden (Tablo I) yararlanıldı⁶⁻⁸. CLSI ve EUCAST önerileri ile belirlenen MİK değerleri \leq eşik/duyarlı klinik sınır değerlerde veya $>$ eşik/ \geq dirençli klinik sınır değerlerde ise uyumlu kategori bulgusu olarak kabul edildi. CLSI önerileri ile belirlenen MİK $>$ eşik/ \geq dirençli klinik sınır değer iken, EUCAST önerileri ile belirlenen MİK \leq eşik/duyarlı klinik sınır değer ise çok büyük hata; CLSI önerileri ile belirlenen MİK \leq eşik/duyarlı klinik sınır değer iken, EUCAST önerileri ile belirlenen MİK $>$ eşik/ \geq dirençli klinik sınır değerde ise büyük hata olarak değerlendirildi. CLSI önerileri doğrultusunda gerçekleştirilen yöntem ile doza bağlı duyarlı/orta duyarlı olan suşlar, EUCAST önerileri ile yapılan yöntem ile duyarlı ya da dirençli olduğu zaman küçük hata olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tablo II'de iki yöntem arasında 24 ve 48. saatlerde elde edilen toplam uyum oranları gösterilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi 24. saatte en düşük uyum oranı ($<$ %85) flukonazol ve vorikonazol için gözlenmiştir. Amfoterisin B, itrakonazol, posakonazol ve anidulafungin için 24. saat uyum oranları $>$ %90 olarak bulunmuştur. Amfoterisin B ve itrakonazol hariç, hem 24 hem de 48 saatlik inkübasyon sonunda uyumsuz izolatların çoğunda EUCAST önerileri ile elde edilen MİK değerleri, CLSI önerileri ile uygulanan yöntemle bulunan MİK değerlerinden daha yüksek saptanmıştır.

Tablo III'te türlerin antifungal ilaçlara karşı her iki yöntemle saptanan MİK aralığı, mod değerleri ve iki yöntem arasındaki esas ve kategori uyumları verilmiştir. En iyi esas uyum (%100) 24. saatte amfoterisin B/*C.tropicalis* ve anidulafungin/*C.glabrata* ve *C.tropicalis* için gözlenmiştir. En kötü uyum ise *C.glabrata*'nın 24. saatte elde edilen flukonazol ve vorikonazol sonuçlarında tespit edilmiştir. Genel olarak 24. saatte gözlenen uyum oranları daha iyi olmakla birlikte, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* izolatları için flukonazol ve vorikonazol açısından 48. saatte daha yüksek uyum saptanmıştır. Kategori uyum değerlendirmesine göre, amfoterisin B ve anidulafunginin üç türde %100 uyum gösterdiği saptanmıştır. En kötü ($<$ %80) uyum ise *C.albicans* izolatlarında posakonazol için gözlenmiştir (Tablo III).

CLSI önerisine göre uygulanan yöntem ile amfoterisin B direnci hiçbir izolatta gözlenmezken; EUCAST önerilerine göre uygulanan yöntem ile dirençli olan bir *C.albicans* izolatı (non wild type; NWT) hariç, diğer tüm izolatlarda direnç saptanmamıştır. Flukonazolde doza bağlı duyarlılık (24 saat)/direnç (48 saat) *C.albicans*'da CLSI ile bir, EUCAST ile iki izolatta saptanmış ve iki yöntemle de dirençli olarak saptanan izolat itrakonazol, posakonazol ve anidulafungine de dirençli olarak tespit edilmiştir. *C.glabrata* ve *C.tropicalis* izolatlarında flukonazol direnci görülmezken, flukonazole en fazla azalmış duyarlılık (doza bağlı duyarlı ve dirençli) hem CLSI (24. saatte 8/67, %11.9; 48. saatte 12/67, %17.9) hem de EUCAST (19/67, %28.4) ile *C.parapsilosis* izolatlarında görülmüştür. Anidulafungine azalmış duyarlılık (orta

Tablo 1. CLSI ve EUCAST Önerilerine Göre Gerçekleştirilen Yöntemlere Göre Antifungal İlaçların *Candida* Türleri İçin Belirlenmiş Epidemiyolojik Eşik ve Klinik Sınır Değerleri

İzolatlar	Antifungal ilaçlar	Yöntem	Epidemiyolojik eşik değer (µg/ml)		Klinik Sınır Değerler (µg/ml)			
			WT ¹	non WT ¹	S ¹	SDD ¹	I ¹	R ¹
<i>C. albicans</i>	Amfoterisin B	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 1	> 1	≤ 1			> 1
	Flukonazol	CLSI	≤ 0.5	> 0.5	≤ 2	4		≥ 8
		EUCAST	≤ 1	> 1	≤ 2	4		≥ 8
	İtrakonazol	CLSI	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125	0.25-0.5		≥ 1
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
	Vorikonazol	CLSI	≤ 0.032	> 0.032	≤ 0.125		0.25-0.5	≥ 1
		EUCAST	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125			> 0.125
	Posakonazol	CLSI	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
	Anidulafungin	CLSI	≤ 0.125	> 0.032	≤ 0.25		0.5	≥ 1
		EUCAST	≤ 0.032	> 0.032	≤ 0.032			> 0.032
<i>C. parapsilosis</i>	Amfoterisin B	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 1	> 1	≤ 1			> 1
	Flukonazol	CLSI	≤ 2	> 2	≤ 2	4		≥ 8
		EUCAST	≤ 2	> 2	≤ 2	4		≥ 8
	İtrakonazol	CLSI	≤ 0.5	> 0.5				
		EUCAST	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125		0.25-0.5	> 0.125
	Vorikonazol	CLSI	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125			≥ 1
		EUCAST	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125			> 0.125
	Posakonazol	CLSI	≤ 0.25	> 0.25				
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
	Anidulafungin	CLSI	≤ 4	> 4	≤ 2		4	≥ 8
		EUCAST	≤ 4	> 4	≤ 0.002 ²			> 4 ²
<i>C. glabrata</i>	Amfoterisin B	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 1	> 1	≤ 1			> 1
	Flukonazol	CLSI	≤ 32	> 32		≤ 32		> 32
		EUCAST	≤ 32	> 32	≤ 0.002 ³			> 32 ³
	İtrakonazol	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 2	> 2				
	Vorikonazol	CLSI	≤ 0.5	> 0.5				
		EUCAST	≤ 1	> 1				
	Posakonazol	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 1	> 1				
	Anidulafungin	CLSI	≤ 0.25	> 0.25	≤ 0.125		0.25	≥ 0.5
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
<i>C. tropicalis</i>	Amfoterisin B	CLSI	≤ 2	> 2				
		EUCAST	≤ 1	> 1	≤ 1			> 1
	Flukonazol	CLSI	≤ 2	> 2	≤ 2	4		≥ 8
		EUCAST	≤ 2	> 2	≤ 2	4		≥ 8
	İtrakonazol	CLSI	≤ 0.5	> 0.5				
		EUCAST	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125		0.25-0.5	> 0.125
	Vorikonazol	CLSI	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.125			≥ 1
		EUCAST	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.125			> 0.125
	Posakonazol	CLSI	≤ 0.125	> 0.125				
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064
	Anidulafungin	CLSI	≤ 0.125	> 0.125	≤ 0.25		0.5	≥ 1
		EUCAST	≤ 0.064	> 0.064	≤ 0.064			> 0.064

¹ WT: Vahşi tip (Wild type), non WT: Vahşi tip olmayan, S: Duyarlı, SSD: Doza bağlı duyarlı, I: Orta dirençli, R: Dirençli.

² EUCAST önerilerine göre *C. parapsilosis*'te anidulafungin için duyarlılık sınırı ≤ 0.002 olup, ≤ 4 µg/ml olan suşların orta duyarlı olarak kabul edilmesi önerilmektedir.

³ EUCAST önerilerine göre *C. glabrata*'nın flukonazol için duyarlılık sınırı ≤ 0.002 olup, ≤ 32 µg/ml olan suşların doza bağlı duyarlı olarak kabul edilmesi önerilmektedir.

Tablo II. İki Yöntem Arasında Elde Edilen Toplam Uyum Oranları ve İki Yöntemle Elde Edilen MİK Değerlerinin Toplam Olarak Karşılaştırılması

Antifungal ilaçlar	% Uyum		Uyumsuz izolat sayısı			
	24 saat	48 saat	EUCAST MİK > CLSI MİK		EUCAST MİK < CLSI MİK	
			24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Amfoterisin B	91.5	80.9	-	-	16	36
Flukonazol	79.9	81.5	35	28	3	7
İtrakonazol	93.1	89.5	4	2	9	19
Vorikonazol	83.1	90.5	30	16	2	2
Posakonazol	92.6	92.1	9	9	5	6
Anidulafungin	91.5		12		4	

duyarlı ve dirençli) *C. tropicalis* izolatlarında %5.6, *C. glabrata* izolatlarında %3.3, *C. albicans* izolatlarında %2.7 olarak hem CLSI hem de EUCAST önerileri ile uygulanan yöntem ile saptanmıştır. *C. parapsilosis* izolatlarının ikisi EUCAST yöntemi ile anidulofungine dirençli tespit edilmesine rağmen, CLSI yöntemi ile duyarlı bulunmuştur (Tablo III).

Tablo IV'te her iki yöntemle azalmış duyarlılık (doza bağlı duyarlı/orta duyarlı ve dirençli) saptanan izolatların sayısı ve yüzdeleri gösterilmiştir. Buna göre; amfoterisin B'ye iki yöntemle de dirençli olarak saptanan herhangi bir izolat bulunmamıştır. Flukonazol dirençli *C. albicans* izolatının itrakonazol, posakonazol ve anidulafungine de dirençli olduğu görülmüştür. Vorikonazole dirençli olan izolat ile anidulafungine dirençli olan diğer izolatın farklı olduğu gözlenmiştir. Flukonazole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının; CLSI yöntemine göre 24. saat inkübasyonu ile bir tanesi (1/1), CLSI yöntemine göre 48. saat inkübasyonu ile üç tanesi (3/5) vorikonazole de dirençli bulunmuştur. CLSI yöntemine göre, 48. saatte vorikonazole dirençli diğer iki izolat ile posakonazole dirençli izolatın farklı olduğu saptanmıştır. CLSI yöntemine göre, 48. saatte *C. glabrata* izolatlarından birer tanesinde itrakonazol, vorikonazol ve anidulafungine direnç saptanmakla birlikte, bu izolatların aynı olmadığı tespit edilmiştir. *C. tropicalis* izolatlarında ise CLSI yöntemine göre hem 24. hem de 48. saatte saptanan vorikonazol ve posakonazole dirençli izolatların aynı olduğu gözlenmiştir.

Tablo V'te CLSI ve EUCAST yöntemleriyle çalışmamızda saptanan hata oranları gösterilmiştir. Çok büyük hata, yalnız *C. albicans* izolatlarının posakonazol duyarlılığı için saptanmış, diğer ilaçlar ve türlerde çok büyük hata tespit edilmemiştir. Büyük hataların çoğunluğu *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* izolatlarının azol grubu ilaçlarda gözlenen sonuçlarında görülmüştür.

Tablo III. Türlerin Antifungal İlaçlara Karşı Her İki Yöntemle Saptanan MİK Aralığı ve Mod Verileri ve İki Yöntem Arasında Esas ve Kategori Uyumları

Türler	Antifungal ilaçlar	Yöntem	MİK (µg/ml)		Esas Uyum (%)	Kategoriye göre izolat sayısı (%)			Kategori uyumu
			Aralık	Mod		S/WT ¹	SDD/1 ²	R/non WT ³	
<i>C. albicans</i> (74)	Amfoterisin B	CLSI 24	0.25-1	1	87.8	74 (100)	-	-	98.6
		CLSI 48	0.5-2	1	75.7	74 (100)	-	-	98.6
		EUCAST	0.06-2	0.5		73 (98.6)	-	1 (1.3)	
	Flukonazol	CLSI 24	≤ 0.125-4	0.25	95.9	73 (98.6)	1 (1.3)	-	98.6
		CLSI 48	≤ 0.125-8	0.25	90.5	73 (98.6)	-	1 (1.3)	98.6
		EUCAST	≤ 0.125-16	≤ 0.125		72 (97.3)	-	2 (2.7)	
	İtrakonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.25	0.06	98.6	73 (98.6)	-	1 (1.3)	100
		CLSI 48	≤ 0.03-0.25	≤ 0.125	97.3	71 (95.9)	-	3 (4.1)	97.3
		EUCAST	≤ 0.03-0.125	≤ 0.03		73 (98.6)	-	1 (1.3)	
	Vorikonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.25	≤ 0.03	95.9	71 (95.9)	3 (4)	-	97.3
		CLSI 48	≤ 0.03-0.25	≤ 0.03	94.6	71 (95.9)	3 (4)	-	97.3
		EUCAST	≤ 0.03-> 16	≤ 0.03		73 (98.6)	-	1 (1.3)	
	Posakonazol	CLSI 24	≤ 0.03-2	0.06	91.9	53 (71.6)	-	21 (28.4)	71.6
		CLSI 48	≤ 0.03-2	0.06	90.5	52 (70.3)	-	22 (29.2)	73
EUCAST		≤ 0.03-> 16	≤ 0.03		70 (94.6)	-	4 (5.4)		
Anidulafungin	CLSI 24	≤ 0.015-0.5	≤ 0.015	94	72 (97.3)	2 (2.7)	-	100	
	EUCAST	≤ 0.015-1	≤ 0.015		72 (97.3)	-	2 (2.7)		
<i>C. parapsilosis</i> (67)	Amfoterisin B	CLSI 24	0.25-2	0.5	94	67 (100)	-	-	100
		CLSI 48	0.25-2	1	83.6	67 (100)	-	-	100
		EUCAST	0.06-1	0.5		67 (100)	-	-	
	Flukonazol	CLSI 24	≤ 0.125-32	0.5	85.1	59 (88.1)	1 (1.5)	7 (10.4)	83.6
		CLSI 48	0.25-64	0.5	88.1	55 (82.1)	5 (7.5)	7 (10.4)	89.5
		EUCAST	0.25-64	0.5		48 (71.6)	4 (6)	15 (22.4)	
	İtrakonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.5	0.125	92.5	67 (100)	-	-	95.5
		CLSI 48	0.06-0.5	0.125	79.1	67 (100)	-	-	95.5
		EUCAST	≤ 0.03-0.25	≤ 0.03		64 (95.5)	-	3 (4.5)	
	Vorikonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.5	≤ 0.03	95.5	65 (97)	2 (3)	-	86.6
		CLSI 48	≤ 0.03-1	≤ 0.03	97	60 (89.5)	5 (7.5)	1 (1.5)	94
		EUCAST	≤ 0.03-2	≤ 0.03		57 (85.1)	-	10 (14.9)	
	Posakonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.5	0.06	98.5	66 (98.5)	-	1 (1.5)	83.6
		CLSI 48	≤ 0.03-1	0.06	92.5	65 (97)	-	2 (3)	82.1
EUCAST		≤ 0.03-0.25	≤ 0.03		55 (82.1)	-	12 (17.9)		
Anidulafungin	CLSI 24	0.03-2	0.5	80.6	67 (100)	-	-	97	
	EUCAST	≤ 0.015-8	1		-	65 (97) ⁴	2 (3)		
<i>C. glabrata</i> (30)	Amfoterisin B	CLSI 24	0.5-1	1	90	30 (100)	-	-	100
		CLSI 48	0.5-2	1	80	30 (100)	-	-	100
		EUCAST	0.125-1	0.25		30 (100)	-	-	
	Flukonazol	CLSI 24	0.5-32	1	20	-	30 (100) ⁵	-	100
		CLSI 48	0.5-32	1	33.3	-	30 (100) ⁵	-	100
		EUCAST	2-32	16		-	30 (100) ⁵	-	
	İtrakonazol	CLSI 24	0.06-1	0.25	86.7	30 (100)	-	-	90
		CLSI 48	0.06-16	0.25	93.3	29 (96.7)	-	1 (3.3)	93.3
		EUCAST	≤ 0.03-16	0.5		27 (90)	-	3 (10)	
	Vorikonazol	CLSI 24	≤ 0.03-0.5	≤ 0.03	20	30 (100)	-	-	90
		CLSI 48	≤ 0.03-0.1	0.125	63.3	29 (96.7)	-	1 (3.3)	93.3
		EUCAST	0.06-8	0.25		27 (90)	-	3 (10)	
	Posakonazol	CLSI 24	0.06-0.5	0.25/0.25	80	30 (100)	-	-	90
		CLSI 48	0.06-1	0.25	90	30 (100)	-	-	90
EUCAST		≤ 0.03-4	1		27 (90)	-	3 (10)		
Anidulafungin	CLSI 24	0.03-0.5	0.06	100	29 (96.7)	-	1 (3.3)	100	
	EUCAST	≤ 0.015-1	≤ 0.015		29 (96.7)	-	1 (3.3)		

Tablo III. Türlerin Antifungal İlaçlara Karşı Her İki Yöntemle Saptanan MİK Aralığı ve Mod Verileri ve İki Yöntem Arasında Esas Ve Kategori Uyumluları (Devamı)

Türler	Antifungal ilaçlar	Yöntem	MİK (µg/ml)			Kategoriye göre izolat sayısı (%)				
			Aralık	Mod	Esas Uyum (%)	S/WT ¹	SDD/I ²	R/non WT ³	Kategori uyumu	
<i>C. tropicalis</i> (18)	Amfoterisin B	CLSI 24	0.25-1	1	100	18 (100)	-	-	-	100
		CLSI 48	0.5-2	1	94.4	18 (100)	-	-	-	100
	Flukonazol	EUCAST	0.062-2	0.25	94.4	18 (100)	-	-	-	100
		CLSI 24	≤ 0.125-1	0.5	88.9	18 (100)	-	-	-	100
		CLSI 48	0.25-1	0.5	77.8	18 (100)	-	-	-	88.9
		EUCAST	≤ 0.125-2	0.5	72.2	18	-	-	-	88.9
	İtrakonazol	CLSI 24	0.06-0.25	0.25	72.2	18	-	-	-	88.9
		CLSI 48	0.06-0.25	0.25	72.2	18	-	-	-	88.9
	Vorikonazol	EUCAST	≤ 0.03-1	≤ 0.03	94.4	16 (88.9)	-	-	2 (11.1)	94.4
		CLSI 24	≤ 0.03-0.25	≤ 0.03/0.06	94.4	17 (94.4)	1 (5.6)	-	-	100
	Posakonazol	CLSI 48	≤ 0.03-0.25	0.06	94.4	16 (88.9)	2 (11.1)	-	-	83.3
		EUCAST	≤ 0.03-16	0.125	77.8	16 (88.9)	-	-	2 (11.1)	88.9
CLSI 24		0.06-0.25	0.06	77.8	14 (77.8)	-	-	4 (22.2)	88.9	
CLSI 48		0.06-0.25	0.125	100	17 (94.4)	1 (5.6)	-	-	100	
Anidulofungin	EUCAST	≤ 0.03-4	≤ 0.03	100	17 (94.4)	-	-	-	100	
	CLSI 24	≤ 0.015-0.5	≤ 0.015	100	17 (94.4)	1 (5.6)	-	-	100	
		EUCAST	≤ 0.015-1	≤ 0.015	100	17 (94.4)	-	-	1 (5.6)	

¹ S: Duyarlı; WT: Vahşi tip (wild type).

² SSD: Doza bağlı duyarlı; I: Orta dirençli (Intermediate).

³ R: Dirençli; non-WT: Vahşi tip (wild type) olmayan.

⁴ EUCAST rehberinde : parapsilosis anidulofungin için duyarlı sınırları ≤ 4 µg/ml olan suşların orta duyarlı olarak kabul edilmesi önerilmektedir.

⁵ EUCAST rehberinde C.glabrata flukonazol için duyarlı sınırları ≤ 0.002 olup, ≤ 32 µg/ml olan suşların doza bağlı duyarlı olarak kabul edilmesi önerilmektedir.

Tablo IV. Her İki Yöntemle (EUCAST Ve CLSI 24/EUCAST ve CLSI 48) Azalmış Duyarlılığı (Doza Bağlı Duyarlı/Orta Duyarlı ve Dirençli) Olan İzolatların Sayı ve Yüzdesi

	Amfoterisin B		Flukonazol		İtrakonazol		Vorikonazol		Posakonazol		Anidulofungin
	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI	CLSI
	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s	48 s	24 s
<i>C.albicans</i>	-	-	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)	2 (2.7)	3 (4)	2 (2.7)
<i>C.parapsilosis</i>	-	-	8 (11.9)	12 (17.9)	-	-	1 (1.5)	5 (7.5)	1 (1.5)	1 (1.5)	-
<i>C.glabrata</i>	-	-	-	-	-	1 (3.3)	-	1 (3.3)	-	-	1 (3.3)
<i>C.tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	1 (5.6)	2 (11.1)	1 (5.6)	2 (11.1)	1 (5.6)

TARTIŞMA

Antifungal direnç gelişimini takip edebilmek için ulusal ve/veya uluslararası sürveyans çalışmalarının yanı sıra bölgesel merkezlerin antifungal duyarlılık durumunu bilmek ampirik tedaviye yol göstermek açısından önemlidir⁹. CLSI ve EUCAST rehberleri antifungal direnç gelişimini takipte kabul edilen iki referans yöntemdir^{4,8}. Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan *Candida* izolatlarının in vitro duyarlılığı CLSI ve EUCAST yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Genel olarak her iki yöntem arasındaki esas ve kategori uyumu 24. saatte daha iyi bulunmuştur ve bu durum CLSI yönteminin son yıllarda yapılan 24. saat validasyonu ile uyumlu olarak gözlenmiştir⁶. Özellikle, *C.albicans* ve *C.tropicalis* gibi hızlı üreyen türlerde 24 saatlik inkübasyonun yeterli olduğu ve çalışmamızda da *C.albicans* ve *C.tropicalis* izolatları açısından 24. saatte iki yöntem arası uyum sorunu olmadığı saptanmıştır. Ancak, yavaş üreyen *C.glabrata* izolatları ve bazı *C.parapsilosis* izolatlarında iki yöntem arasındaki uyum özellikle flukonazol ve vorikonazol için 24. saatte düşük bulunmuştur. Bu gibi durumlarda inkübasyonu 48. saate uzatmanın yararlı olabileceği düşünülmüştür. Uyumsuz izolatların çoğunlukla EUCAST yöntemiyle saptanan Mik'leri daha yüksek bulunmuştur. Bu olasılıkla iki yöntem arasındaki farklılıktan özellikle inokulum farklılığından kaynaklanmaktadır¹⁰.

Kategori uyumunda en düşük seviye *C.albicans* izolatlarının posakonazol duyarlılık sonuçlarında gözlenmiştir. Lipofilik özelliği nedeniyle, bu ilacın çözünürlüğünün düşük olması ve bu nedenle iki yöntemin karşılaştırılmasında zorluk olduğu başka çalışmalarda da bildirilmiştir. Benzer durum, itrakonazol duyarlılık sonuçları için vurgulanmış olsa da, bu çalışmada itrakonazol kategorik uyumu açısından sorun tespit edilmemiştir^{11,12}.

Flukonazol ve ekinokandinler kandidemi ve invaziv kandidozlarda ilk sırada tercih edilen ilaçlardır^{13,14}. Bu çalışmada kandidemi olgularından en sık izole edilen dört türe ait

Tablo V. İCLSI ve EUCAST Yöntemlerindeki Hata Oranları

Türler	Antifungal ilaçlar	Çok Büyük Hata	Büyük Hata	Küçük Hata
<i>C.albicans</i> (74)	Amfoterisin B (24 s)	-	1 (1.3)	-
	Amfoterisin B (48 s)	-	1 (1.3)	-
	Flukonazol (24 s)	-	1 (1.3)	1 (1.3)
	Flukonazol (48 s)	-	1 (1.3)	-
	İtrakonazol (24 s)	-	-	1 (1.3)
	İtrakonazol (48 s)	-	-	3 (4)
	Vorikonazol (24 s)	-	-	3 (4)
	Vorikonazol (48 s)	-	-	3 (4)
	Posakonazol (24 s)	19 (25.7)	1 (1.3)	-
	Posakonazol (48 s)	19 (25.7)	-	-
Anidulofungin (24 s)	-	-	2 (2.7)	
<i>C.parapsilosis</i> (67)	Amfoterisin B (24 s)	-	-	-
	Amfoterisin B (48 s)	-	-	-
	Flukonazol (24 s)	-	7 (10.4)	1 (1.3)
	Flukonazol (48 s)	-	7 (10.4)	1 (1.3)
	İtrakonazol (24 s)	-	3 (4)	-
	İtrakonazol (48 s)	-	3 (4)	-
	Vorikonazol (24 s)	-	9 (13.4)	2 (3)
	Vorikonazol (48 s)	-	4 (6)	6 (8.9)
	Posakonazol (24 s)	-	11 (16.4)	-
	Posakonazol (48 s)	-	10 (14.9)	-
Anidulofungin (24 s)	-	2 (3)	-	
<i>C.glabrata</i> (30)	Amfoterisin B (24 s)	-	-	-
	Amfoterisin B (48 s)	-	-	-
	Flukonazol (24 s)	-	-	-
	Flukonazol (48 s)	-	-	-
	İtrakonazol (24 s)	-	1 (3.3)	-
	İtrakonazol (48 s)	-	3 (10)	-
	Vorikonazol (24 s)	-	1 (3.3)	-
	Vorikonazol (48 s)	-	3 (10)	-
	Posakonazol (24 s)	-	-	-
	Posakonazol (48 s)	-	3 (10)	-
Anidulofungin (24 s)	-	-	-	
<i>C.tropicalis</i> (18)	Amfoterisin B (24 s)	-	-	-
	Amfoterisin B (48 s)	-	-	-
	Flukonazol (24 s)	-	-	-
	Flukonazol (48 s)	-	-	-
	İtrakonazol (24 s)	-	2 (11.1)	-
	İtrakonazol (48 s)	-	2 (11.1)	-
	Vorikonazol (24 s)	-	1 (3.3)	1 (3.3)
	Vorikonazol (48 s)	-	-	2 (11.1)
	Posakonazol (24 s)	-	3 (16.7)	-
	Posakonazol (48 s)	-	3 (16.7)	-
Anidulofungin (24 s)	-	-	1 (3.3)	

izolatlarda anidulofungin direnci yüksek bulunmamıştır. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde %10'lara varan ve giderek artma eğiliminde olan *C.glabrata* izolatlarında görülen ekinokandin direnci bu çalışmada önemli bir sorun olarak saptanmamıştır^{15,16}. Ülkemizde kan kültürlerinden *C.glabrata* izolasyonu diğer ülkelere göre daha azdır¹⁷⁻²¹. Bu açıdan izolasyonun düşük olması ile direncin düşük olmasının paralel olduğu düşünülebilir. Ancak, zaman içinde izolasyonun ve direncin de artabileceği unutulmamalıdır. Merkezimizde farklı iki dönemde yapılan kandidemi süveyans çalışmalarında her ne kadar *C.glabrata* izolasyon oranları düşük olsa da yakın zamanı kapsayan ikinci çalışmada izolasyonda anlamlı artış olduğu saptanmıştır^{22,23}.

C.glabrata türlerindeki flukonazol direnci önemli bir diğer konudur. Birçok çalışmada yüksek dirençten bahsedilmesine rağmen, bu çalışmada *C.parapsilosis* hariç bütün diğer türlerde flukonazol direnci yüksek seviyede bulunmamıştır^{24,25}. Bu durum yine, *C.glabrata*'nın kan kültürlerinden çok fazla izole edilmemesi ile ilişkili olabilir. *C.parapsilosis* en fazla sağlık çalışanlarının ellerinde bulunmakta ve kateteri olan kritik hastalarda önem taşımaktadır²⁴. Flukonazol, *C.parapsilosis* türlerine iyi etki eden bir antifungaldir ve genellikle bu etkene karşı yüksek direnç bildirilmemiştir. Bununla birlikte, Brezilya ve İspanya'da yapılan bazı çalışmalar, bizim çalışmamıza benzer şekilde *C.parapsilosis* izolatlarında saptanan flukonazol direncini bildirmiştir^{26,27}. *C.parapsilosis* izolatlarının nozokomiyal enfeksiyona yol açmaları nedeniyle, dirençli izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi saptamak epidemiyolojik açıdan önemli olmaktadır.

Literatürde, azol grubu ilaçlar arasındaki çapraz dirençten ve diğer bütün antifungallerde direnç gelişmesi ile oluşan panfungal dirençli izolatların saptandığı yayınlar bulunmaktadır^{28,29}. Bu çalışmada da, *C.parapsilosis* izolatlarının bir kısmında çapraz olarak vorikonazole de direnç olduğu görülmüştür. Bunun dışında bir *C.albicans* izolatında çoklu antifungal direnç (flukonazol, itrakonazol, posakonazol ve anidulofungin) saptanmıştır.

CLSI ve EUCAST yöntemleri antifungal duyarlılıkta referans olarak kabul edilen iki yöntemdir ve son yıllarda CLSI, klinik sınır değerleri düşürerek ve 24 saatlik inkübasyonu valide ederek iki yöntemin uyumunu arttırmaya çalışmıştır⁶. *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* türlerinde flukonazol ile tamamen, vorikonazol ile kısmen [direnç sınırı iki yöntemde farklıdır (CLSI $\geq 1 \mu\text{g/ml}$; EUCAST $\geq 0.25 \mu\text{g/ml}$)] bu uyumu sağlamıştır. Bu iki referans yöntemin uluslararası önemi nedeniyle uyumu artırma çabalarının diğer ilaçlar ve türler için de devam etmesi önemlidir^{30,31}.

Tek merkezli olması, izolat sayısının nispeten azlığı ve dirençli izolatlarda direnç analizlerinin yapılamaması bu çalışmanın en önemli eksiklikleridir. Ancak, kandidemilerde en sık izole edilen dört tür ile çalışılmıştır ve lokal veri olarak hem hastanemize hem de ülkemize bu konuda katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, CLSI ve EUCAST rehberlerine göre değerlendirilen antifungal duyarlılık sonuçlarının 24 saatlik inkübasyon sonunda genellikle uyumlu olduğu, CLSI rehberine göre uygulanan yöntemle 24 saat inkübasyonla, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* gibi daha

yavaş üreyen türlerde özellikle vorikonazol ve flukonazol antifungalleri için bazen yeterli sonuç alınmadığı ve inkübasyonun uzatılması gerektiği, flukonazol ve ekinokandin direnci açısından sıkıntılı bir tür olan *C.glabrata*'da şu an için önemli bir sorun olmadığı, en önemli sorunun *C.parapsilosis* izolatlarında tespit edilen flukonazol direncinin tespitinde yaşandığı belirlenmiştir.

Merkezler iki referans yöntemden kendileri için uygun olanı seçerek antifungal duyarlılık çalışabilir. Ancak sonuçları doğru okumak ve yorumlamak için çaba sarf edilmelidir. Dirençli bir izolat ile karşılaşıldığında farklı bir yöntemle tekrar test edilerek direncin doğrulanması ve direnç mekanizmasının araştırılması konunun aydınlatılması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52(3):197-205.
2. Farina C, Manso E, Sanna S, et al. Management of antifungal susceptibility testing in Italy: comparative results of 2 nationwide surveys (1999 and 2004) in 102 Italian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(2): 225-7.
3. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(Suppl 1): i13-8.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition. CLSI document (M27-A3), 2008. CLSI, Wayne, PA.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 3rd informational supplement (M27-S3), 2008. CLSI, Wayne, PA.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9): 2846-56.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 4th informational supplement. 2012. CLSI, Wayne, PA.
8. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document E.Def 7.3: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for yeasts. 2015.
9. Rodloff C, Koch D, Schaumann R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res* 2011; 16(4): 187-95.
10. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 525-32.
11. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 718-21.
12. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4577-80.
13. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Executive Summary: Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62(4): 409-17.
14. Ullmann AJ, Cornely OA, Donnelly JP, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(Suppl 7): 1-8.

15. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1199-203.
16. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clin Infect Dis 2013; 56(12): 1724-32.
17. Yapar N, Pullukçu H, Oğuz VA, et al. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. Med Mycol 2011; 49(1): 26-31.
18. Aydın F, Bayramoğlu G, Güler NC, Kaklıkaya N, Tosun İ. Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey. Med Mycol 2011; 49(3): 316-9.
19. Alp Ş, Arkan-Akdağlı S, Gülmez D, Aşcıoğlu S, Uzun Ö, Akova M. Epidemiology of Candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 Candidaemia episodes between 2001 and 2010. Mycoses 2015; 58(8): 498-505.
20. Horasan EŞ, Ersöz G, Göksoy M, et al. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. Mycopathologia 2010; 170(4): 263-8.
21. Erdem İ, Oğuzoğlu N, Öztürk Engin D, et al. Incidence, etiology and risk factors associated with mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey. Med Princ Pract 2010; 19(6): 463-7.
22. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalın H, et al. Epidemiology of nosocomial Candidaemia in a university hospital: a 12-year study. Epidemiol Infect 2010; 138(9): 1328-35.
23. Kazak E, Akin H, Ener B, et al. An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. Mycoses 2014; 57(10): 623-9.
24. 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. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 82 (4) : 303-13.
25. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 85 (2): 200-4.
26. da Costa VG, Quesada RMB, Abe ATS, Maria LF, Furlaneto MC. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. Mycopathologia 2014; 178(3-4): 243-50.
27. Peman J, Canton E, Quindos G, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. J Antimicrob Chemother 2012; 67(5): 1181-7.
28. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact Mycoses 2015; 58 (Suppl. 2): 2-13.
29. Pfaller M. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med 2012; 125(1 Suppl): S3-13.
30. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Canton E. EUCAST and CLSI: working together towards a harmonized method for antifungal susceptibility testing. Curr Fungal Infect Rep 2013; 7(1): 59-67.
31. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Updat 2010; 13(6): 180-95.