

Klinik *Candida lusitaniae* Kökenlerinin Amfoterisin B'ye İn Vitro Duyarlılığı: Çok Merkezli Çalışma[§]

Ayşe KALKANCI*, Kenan HIZEL**, Ali FOUAD*, Nilgün ÇERİKÇİOĞLU***, Işın AKYAR****, Rukiye BERKEM*****, Zayre ERTURAN*****, Semra KUŞTİMUR*

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

*** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**** Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

***** Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

***** İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Amfoterisin B (AmB) invazif mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan poliyen grubu bir antifungaldir. Klinikte *Candida lusitaniae* ile oluşan mantar enfeksiyonlarının AmB tedavisine yanıt vermediği, in vitro duyarlılık testlerinde kökenlerin dirençli bulunduğu bildirilmiştir. AmB ile karşılaşma sonrasında minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin yükseldiği ile ilgili çalışmalar bulunduğu gibi, tersine kökenlerin bütünüyle AmB'ye duyarlı olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *C. lusitaniae* kökenlerinin AmB duyarlılığının gösterilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma kapsamında dört ayrı merkezden tür düzeyinde tanımlanmış 60 *C. lusitaniae* kökeni toplanmıştır. Toplanan kökenlerin tür düzeyinde tanımlanmaları üç merkezde klasik mikolojik yöntemler ile yapılmıştır. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda tür tanımları MALDI-TOF cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda kökenlere in vitro duyarlılık testi uygulanmıştır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile MİK değerleri elde edilmiştir.

Bulgular: Mikrodilüsyon yönteminden elde edilen MİK değerlerine göre MİK aralığı 0.125-2 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak hesaplanmıştır. E-test sonucunda elde edilen MİK değerlerine göre MİK aralığı 0.012-2 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.25 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.75 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarına göre 60 kökenden 8 tanesinden (%13), E-test sonuçlarına göre 6 tanesinden (% 10) ≥ 1 µg/ml MİK değerleri elde edilmiştir. Mikrodilüsyon ile iki, E-test ile bir köken için MİK değeri 2 µg/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bu in vitro çalışma, AmB'ye intrinsek dirençli olduğu ileri sürülen *C. lusitaniae* kökenlerinin in vitro duyarlı olduğunu, bu nedenle *C. lusitaniae* enfeksiyonlarında AmB kullanımı seçeneğinin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Sonuçlarımız in vivo modeller ile desteklendiğinde daha kesin yargılara varılabilecektir.

Anahtar kelimeler: Amfoterisin B, *Candida lusitaniae*, duyarlılık

SUMMARY

In Vitro Susceptibility of Clinical Candida lusitaniae Isolates Against Amphotericin B: A Multicenter Study

Aim: Amphotericin B (AmB) is a wide spectrum antifungal drug which is used for the treatment of invasive fungal infections. Among the fungal pathogens, *Candida lusitaniae* has been reported to be resistant to AmB in-vitro. Therefore, AmB is not recommended for the treatment of *C. lusitaniae* infections. There are conflicting data on this subject in the literature. Some of the studies showed that minimal inhibitory concentration (MIC) values increased following exposure to AmB, while the others indicated that all *C. lusitaniae* were fully susceptible to AmB. The aim of the present study was to evaluate the AmB susceptibility of the *C. lusitaniae* strains.

Materials and Methods: The study included 60 *C. lusitaniae* strains obtained from four different teaching hospitals in Turkey. The strains were identified at species level by using conventional methods in three of the centers and by MALDI-TOF method in one center. In vitro susceptibility testing was performed by E-test and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference microdilution method.

Results: AmB MIC range was found as 0.125-2 µg/ml, MIC₅₀ value was 0.5 µg/ml, and MIC₉₀ value was 1 µg/ml by microdilution method. MIC range, MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 0.012-2 µg/ml, 0.25 µg/ml, and 0.75 µg/ml by E-test method, respectively. The number of isolates with MIC ≥ 1 µg/ml were 8 (13%), and 6 (10%), for microdilution and E-test methods, respectively. MIC value was 2 µg/ml for two strains by microdilution method, and one strain by E-test method.

Conclusion: Our results showed that *C. lusitaniae* strains which were considered as intrinsically resistant, were susceptible to AmB. Although, more definite conclusions achieved by in vivo studies are required, this study indicated that AmB could be a good choice for the treatment of infections caused by *C. lusitaniae*.

Key words: Amphotericin B, *Candida lusitaniae*, susceptibility

Alındığı tarih: 22.04.2015

Kabul tarihi: 02.11.2015

Yazışma adresleri: Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara Tel: (0312) 202 46 29 e-posta: kalkanci@gazi.edu.tr

[§]Bu araştırma, 3-7 Kasım 2012 tarihlerinde düzenlenen 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Amfoterisin B (AmB) 1950’li yıllarda Venezuella’nın Orinoco River bölgesinden toplanan toprak aktinomiçeti *Streptomyces nodosus*’un bir kökeninden izole edilmiş poliyen grubu doğal bir antibiyotiktir. İnvazif mantar enfeksiyonlarının tedavisinde 1960’dan beri “altın standart” olarak kullanılmaktadır. Membrandaki ergosterole bağlanarak por görevi yapacak oligodendogramların oluşmasına neden olmaktadır. Porlar membran geçirgenliğini değiştirerek, hücre içinden katyonların ve nükleoprotein gibi makromoleküllerin hücre dışına kaçışına ve hücre ölümüne neden olmaktadır^(1,2).

Candida lusitaniae 1970 yılında tanımlanmış, haploid bir maya mantarıdır. Tam bir eşeyli üreme döngüsü bulunmaktadır. Fenotipik “switching” sonrası 104 hücreden birinde AmB direnci geliştiği bildirilmiştir⁽³⁾. *C. lusitaniae* için AmB direncinin gelişmesinde olası mekanizma membrandaki ergosterol yapısının bozulması, alternatif ergosterol yapımı, biyosentezindeki azalmaya bağlı olarak ergosterol miktarının azalması olabilir⁽⁴⁾. AmB direnci hem intrinsek hem de sekonder olabilir. Direncin gelişimi ile ilgili bilginiz azdır. Ergosterol biyosentezinde görevli enzimleri kodlayan genler *ERG* genleridir. Flukonazol direncinin gelişmesinde en önemli mekanizma olarak *ERG11* genindeki mutasyonlar tanımlanmıştır. Benzer şekilde AmB direnci için de *ERG3* ve *ERG6* genlerindeki mutasyonların AmB direnci ile ilgili olduğu bildirilmiştir^(3,5).

C. lusitaniae enfeksiyonlarının tedavisinde AmB kullanılmasının tedavi başarısızlığı ile sonuçlandığını bildiren yayınlar bulunmaktadır^(6,7). İn vitro duyarlılık çalışmalarında da AmB’nin yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir^(8,9). Ayrıca AmB ile karşılaştıktan sonra bazı *C. lusitaniae* kökenlerinde MİK değerlerinin öncekilere göre

yükseldiğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır⁽¹⁰⁾. Bu bilgilere dayanarak *C. lusitaniae* AmB’ye dirençli bir köken olarak listelenmektedir. Ancak, *C. krusei* ve flukonazol örneğinde olduğu gibi in vitro duyarlılık testlerinde kesin bir direnç elde edilmemektedir. Bu durumda *C. lusitaniae* enfeksiyonlarının AmB ile tedavi edilebilmeleri sorusu net olarak evet veya hayır diye yanıtlandırılmış değildir. Bu nedenle in vitro duyarlılık çalışmalarının yapılmasına devam edilmektedir.

Bu çalışmada, farklı merkezlerden toplanan toplam 60 *C. lusitaniae* kökeninin referans mikrodilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile AmB’ye in vitro olarak duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mantar kökenleri: Çalışma kapsamında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalları ile Sağlık Bakanlığı, Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Kliniği olmak üzere dört ayrı merkezden toplam 60 *C. lusitaniae* kökeni toplanmıştır. Toplanan kökenlerin tür düzeyinde tanımlanmaları üç merkezde klasik mikolojik yöntemler ile yapılmıştır. Bunun için germ tüp negatif kökenler mısır unu-tween 80 agarda maya morfolojileri açısından incelenmiştir. Sonrasında karbonhidratların asimilasyonu temeline dayanan ID32C maya tanımlama kiti (bioMérieux) kullanılmıştır. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda kökenlerin tür tanımı MALDI-TOF cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Antifungal duyarlılık testleri: Tür düzeyinde tanımlanan kökenler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na gönderilmiştir. Deney gününe kadar distile su içinde koloni süspansiyonları hazırlanan kökenler

-80°C’de bekletilmiştir. Duyarlılık testi öncesinde kökenler iki kez pasajlanmış ve Saboraud Dekstroza Agar’da (SDA) yapılan 24 saatlik ikinci pasajlar duyarlılık testi için kullanılmıştır. *C. lusitaniae* kökenlerinin AmB’ye duyarlılıkları mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile araştırılmıştır. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine uygun L-glutaminli RPMI 1640 kullanarak referans mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. AmB konsantrasyon 0.03-16 µg/ml aralığında belirlenmiştir. MİK değerleri 24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirilmiş, kaydedilmiştir⁽¹¹⁾. E-test yöntemi için %1.5 agar ve %2 glukoz eklenmiş antibiyotik medyum 3 (AM3) kullanılmıştır⁽¹²⁾. *C. lusitaniae* kültüründen 0.5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanmış ve eküvyon aracılığıyla AM3 besiyerinin yüzeyine eşit dağılımlı bir şekilde yayılıp AmB E-test şeritleri yerleştirilmiştir. Plakların 24 saat inkübasyonundan sonra sonuçlar değerlendirilmiş ve MİK değerleri kaydedilmiştir. Kalite kontrol kökenleri olarak *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida krusei* ATCC 6258 kullanılmıştır.

BULGULAR

Mikrodilüsyon yönteminden elde edilen MİK

Tablo 1. Mikrodilüsyon ve E-test yöntemlerinden 24 saatte elde edilen MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

	CLSI mikrodilüsyon	E-test
MİK aralığı (µg/ml)	0.125-2	0.012-2
MİK ₅₀ (µg/ml)	0.5	0.25
MİK ₉₀ (µg/ml)	1	0.75

değerlerine göre AmB için MİK aralığı 0.125-2 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.5 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak hesaplanmıştır. E-test sonucunda elde edilen MİK değerlerine göre AmB için MİK aralığı 0.012-2 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0.25 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0.75 µg/ml (1 µg/ml) olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). AmB’ye in vitro dirençli olduğu bildirilen *C. lusitaniae* kökenlerinin AmB için MİK düzeyleri düşük bulunmuştur. Çok az sayıda in vitro dirençli köken elde edilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarına göre 60 kökenden 8’inden (%13), E-test sonuçlarına göre 6’sından (%10) 1 µg/ml ve üzerinde MİK değerleri elde edilmiştir. E-test için 0.38 µg/ml değeri direnç sınırı olarak kabul edilir ise 9 köken (%15) dirençli olarak ayrılmıştır. E-test için sınır değerin 1 µg/ml’den 0.38 µg/ml’ye indirilmesi durumunda 3 köken daha dirençli gruba eklenmiştir. Mikrodilüsyon ile iki kökenin, E-test ile bir kökenin MİK değeri 2 µg/ml olarak bulunmuştur.

CLSI yöntemi referans alındığında E-test için; çok büyük hata (dirençli kökenin duyarlı bulunması) ve büyük hata (duyarlı kökenin dirençli bulunması) oranları hesaplanmıştır⁽¹³⁾. Küçük hata (herhangi bir yöntemle orta duyarlı bulunan kökenin diğer yöntemle duyarlı veya dirençli bulunması) AmB için “orta duyarlı olma” tanımı bulunmadığı için hesaplanmamıştır. Hesaplama mikrodilüsyon için sınır değer 1 ve 2 µg/ml, E-test için 0.38, 1, 2 µg/ml olarak kabul edildiğinde olmak üzere ayrı ayrı hesaplanmış ve tablo hâline getirilmiştir (Tablo 2). Tablodan

Tablo 2. Mikrodilüsyon ve E-test sınır değerlerine göre E-test için çok büyük hata, büyük hata oranları.

Dirençli köken n (%)	E-test					
		9 (%15)		6 (%10)		- (%10)
Direnç sınır değeri		0.38 µg/ml		1 µg/ml		2 µg/ml
Hata tanımı	µg/ml	ÇBH*	BH**	ÇBH*	BH**	ÇBH* BH**
Mikrodilüsyon direnç oranları ve sınır değerler						
8 (%13)	1	-	1 (%2)	2 (%3)	-	7 (%12) -
- (%0)	2	-	7 (%12)	-	4 (%7)	1 (%2) -

*: ÇBH; Çok büyük hata, BH; Büyük hata.

da anlaşılabileceği üzere, CLSI mikrodilüsyon yönteminde sınır değerin 1 µg/ml alındığı koşulda, E-test sınır değeri 0.38 µg/ml ise en iyi uyumluluk elde edilmiştir. Bu durumda E-test çok büyük hata yapmamıştır. Bir kökende (%2) büyük hata yapmıştır. Mikrodilüsyon testinde sınır değeri 2 µg/ml olarak kabul edildi ise, E-test sınır değeri de 2 µg/ml olarak alındığında iki test arasında en iyi uyumluluk elde edilmiştir. Bu koşulda, E-test 1 kökende (% 2) çok büyük hata yapmıştır.

TARTIŞMA

Kandidemi olgularının epidemiyolojik analizlerinin yapıldığı çalışmalara bakıldığında *C. albicans* dışında kalan etkenler arasında, *C. lusitanae* enfeksiyonlarının *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'den sonra beşinci sıklıkta görüldüğü anlaşılmaktadır⁽¹⁴⁾. Çalışmalarda değişik oranlar verilmiş ancak sıralama genellikle değişmemiştir. Pediyatrik grupta *C. lusitanae* ile oluşan kandidemilerde en yüksek mortalite oranı bildirilmiştir^(15,16). Klinikte *C. lusitanae* enfeksiyonları ile karşılaşılması olasılığı çok da düşük değildir. Bu nedenle tedavi seçeneklerinin genişletilmesinin yararlı sonuçları olabilir.

C. lusitanae'da AmB'ye in vitro direncin saptanmasıyla ilgili sorunlar bulunmaktadır. Henüz direnç sınır değerleri saptanmamıştır. İn vitro çalışmalarda dar MİK aralığı elde edilmekte ve dirençli kökenler ayırt edilememektedir. Kullanılan besiyerlerine %2 glukoz eklenmesinin dirençli kökenlerin ayırımına yardım ettiği⁽¹²⁾, E-test için AM3 besiyerinin kullanılmasının mikrokoloni oluşumunu azalttığı bildirilmiştir⁽⁹⁾. Çalışmamızda bu öneriler doğrultusunda %2 glukoz eklenmiş RPMI ve AM3 besiyerleri kullanılmış ve sınır değere göre değişmek üzere, mikrodilüsyon için %13 veya %3, E-test için %15 veya %10 oranında dirençli köken ayrılabilmiştir.

Bu güne kadar yapılmış in vitro çalışmaların çoğunda AmB direnci gösterilememiştir^(4,12,17-19). Bu çalışmalarda, kökenlerin tamamından çok düşük MİK değerleri elde edilmiş ve kökenler duyarlı bulunmuştur. Örneğin 23 kökenin incelendiği bir çalışmada, mikrodilüsyon, E-test ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmış, en düşük MİK değerleri E-test ile elde edilmiştir. AmB ile tedavi edilmemiş yani AmB ile hiç karşılaşmamış kökenler in vitro olarak duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle AmB'nin *C. lusitanae* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği vurgulanmıştır⁽⁴⁾. Aslında böyle bir sonuca ulaşılabilmesi için genişletilmiş klinik çalışmalardan elde edilmiş çok sayıda kökenin test edildiği in vitro çalışmalara gereksinimimiz bulunmaktadır. Çünkü tek başına in vitro sonuçlardan yola çıkarak kesin klinik yargılara varılamaz.

Ülkemizde yapılmış çalışmalarda da kökenler duyarlı bulunmuştur⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Az sayıdaki çalışmada ise birer köken AmB dirençli bulunmuştur^(20,21). İn vitro çalışmaların büyük kısmından elde edilen sonuçlara göre *C. lusitanae* kökenleri AmB'ye bütünüyle duyarlıdır. Öyle ise *C. lusitanae* kökenlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda AmB kullanımından kaçınılmasının nedeni az sayıdaki klinik yanıtsızlık sunumudur^(10,22, 23).

AmB direnci ile ilgili olgu sunumlarından birinde direncin kazanılabileceğini düşündürür şekilde tedavi başlangıcında AmB MİK değeri 0.25 µg/ml iken, tedavi sonrasında bu değerin 1 µg/ml'ye yükseldiği belirtilmiştir. Bu direnç kazanan köken aynı zamanda fenotipik olarak da değişmiş, başlangıçta mavi koloni oluştururken, tedavi sonrası mor koloniye değişmiştir⁽¹⁰⁾. Direncin UV ile uyarılabildiğinin gösterilmesi bu klinik bulguyu desteklemektedir⁽²⁴⁾.

Son yıllarda yapılmış kapsamlı bir çalışmada, 48 saatte MİK değerlerinin arttığı, 24 saatte test edilen 71 *C. lusitanae* kökeninden 30'unda 1 µg/ml, 12'sinde 2 µg/ml, geri kalan kökenlerde

<1 µg/ml MİK değeri elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, epidemiyolojik “cut off” (ECV) hesaplanmıştır. Bu değer 24 saat için 2 µg/ml, 48 saat için 4 µg/ml olarak hesaplanmıştır. ECV değerlerinin mutasyona veya kazanılmış dirence bağlı olarak gelişen “wild type” (WT) olmayan kökenler ile direnç bulunmayan WT kökenleri ayırmada kullanılabileceği bildirilmiştir. Ancak bunun için fazla sayıda köken bulunmalı ve MİK ve “minimum fungicidal consantrasyon” (MFC) değerleri elde edilmiş olmalıdır. Sınır değer olarak bildirilen 2 µg/ml’nin WT ve non-WT kökenleri ayırmada kullanılabileceği bildirilmiştir. Buna göre MİK değeri 2 µg/ml’den fazla olan kökenlerin AmB ile tedavi edilmelerinin başarısızlık ile sonuçlanabileceği yorumlanmıştır⁽²⁵⁾.

Çalışmamızda, sonuçları direnç sınırı 2 µg/ml olarak kabul edilerek yeniden değerlendirdiğimizde, dirençli köken bulunmamıştır. Direnç sınırını 2 µg/ml olarak kullanılması gerektiği başka çalışmalarda da önerilmiştir⁽²⁶⁾. Zaten Tablo 2’de gösterildiği üzere, E-test ve mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyum açısından her iki test için de 2 µg/ml sınır değeri kabul edilebilir görünmektedir. Yine çalışmamız sonuçlarına göre, CLSI mikrodilüsyon yönteminde sınır değer 1 µg/ml alındığı koşulda, E-test için sınır değerin 0.38 µg/ml olarak kabul edilmesi önerilmiştir. Yalnızca E-test uygulayarak sonuç bildiren bir laboratuvar da sınır değer olarak 0.38 µg/ml kabul edilir ise, referans yöntem ile en yüksek uyum sağlanacak yani en güvenilir sonuçlar verilmiş olacaktır. AmB duyarlılık testi olarak E-test yapılabileceğini bildiren başka çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında direnç sınır değeri olarak 0.38 µg/ml önerilmiştir⁽²⁷⁾.

Bu çalışma, *C. lusitaniae* kökenlerinin büyük oranda AmB’ye in vitro duyarlılık gösterdiğini, uygun besiyerleri kullanıldığında dirençli kökenlerin ayrılabilmesini göstermiş ve bu nedenler ile

in vitro duyarlılık testlerinde AmB’nin de test edilmesinin klinik uygulamaları yönlendirebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Akova M. Sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde amfoterisin B ve liposomal amfoterisin B kullanımı. *ANKEM Derg* 1993; 7:179-84.
2. Anır G. Amfoterisin B. *J Ped Infect Dis* 2011; 5(Suppl 1):119-25.
3. Young LY, Hull CM, Heitman J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2717-24. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.9.2717-2724.2003>
4. Singh J, Rimek D, Kappe R. Intrinsic in vitro susceptibility of primary clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* and *Candida lusitaniae* against amphotericin B. *mycoses* 2006; 49:96-103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01197.x>
5. Zhang J, Silao FGS, Bigol UG, et al. Calcineurin is required for pseudohyphal growth, virulence and drug resistance in *Candida lusitaniae*. *PLoS One* 2012; 7:e44192. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044192>
6. Guinet R, Chanas J, Goullier A, Bonnefoy G, Ambroise-Thomas P. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitaniae*. *J Clin Microbiol* 1983; 18:443-4.
7. Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitaniae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16:123-6. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.16.2.123>
8. Ernst JE, Yodoi K, Roling EE, Klepser ME. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitaniae* determined by microdilution, Etest and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:578-81. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.2.578-581.2002>
9. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmström A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitaniae* by E test. *J Clin Microbiol* 2001; 39:339-42. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.1.339-342.2001>
10. McClenny NB, Fei H, Baron EJ, et al. Change in colony morphology of *Candida lusitaniae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1325-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1325-1328.2002>
11. Clinical Laboratory Standards Institution. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Wayne, Pa: 2008.
12. Alp Ş, Sancak B, Arıkan S. *Candida* türlerinin amfoterisin B’ye duyarlılığının E test ve iki farklı besiyeri ile önerilmiş olan direnç sınır değerlerine göre araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:293-300.

13. Yücesoy M, Mutlu E, Yuluğ N. Antifungal duyarlılığın saptanmasında E test yönteminin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2001; 15:670-7.
14. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, et al. 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* 2014; 9:e101510. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101510>
15. Chan S, Baley ED, Hossain J, Di Pentima MC. *Candida species* bloodstream infections in hospitalised children: A 10-year experience. *J Paediatr Child Health* 2015; 51:857-60. <http://dx.doi.org/10.1111/jpc.12905>
16. Dutta A, Palazzi DL. *Candida non-albicans* versus *Candida albicans* fungemia in the non-neonatal pediatric population. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:664-8. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e318213da0f>
17. Kuzucu Ç, Yetkin G, Çalışkan A. Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Erciyes Tıp Derg* 2007; 29:115-9.
18. Evcı C, Ener B, Göral G, Akçağlar S. Comparative evaluation of the antifungal susceptibility of *Candida* isolates from blood specimens: results of a study in a tertiary care hospital in Bursa, Turkey. *Turk J Med Sci* 2010; 40:141-9.
19. Keçeli Özcan S, Mutlu B, DüNDAR D, Willke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile E test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:263-71.
20. Amran F, Aziz MN, Ibrahim HM, et al. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida* isolates from patients with invasive candidiasis in Kuala Lumpur hospital, Malaysia. *J Med Microbiol* 2011; 60:1312-6. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.027631-0>
21. Aydın F, Bayramoğlu G, Güler NC, Kakhkkaya N, Tosun I. Bloodstream yeast infections in a university hospital in northeast Turkey: a 4 year. *Med Mycol* 2011; 49:316-9. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.512023>
22. Merz WG. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *J Clin Microbiol* 1984; 20:1194-5.
23. Blinkhorn RJ, Adelstein D, Spagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:236-40.
24. Yoon SA, Vazquez JA, Steffan PE, Sobel JD, Akins RA. High frequency in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:836-45.
25. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, et al. Wild type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2040-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00248-12>
26. 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; 50:2846-56. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00937-12>
27. Favel A, Michel-Nguyen A, Datry A, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida lusitanae* to five systemic antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:526-9. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh106>