

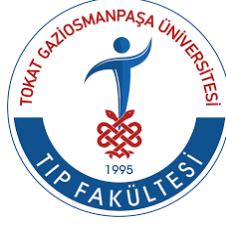
T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* SUŞLARINDA
AZOL DİRENÇ MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ayşe ALICI

UZMANLIK TEZİ

TOKAT
2021



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* SUŞLARINDA
AZOL DİRENÇ MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ayşe ALICI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ

TOKAT
2021

TEŞEKKÜR

Her konuda her zaman yanımda olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, tez çalışmamda her türlü konuda yardımcı olan, çalışkan, güçlü ve kararlı kişiliğini her zaman örnek alacağım değerli hocam sayın Prof. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca desteğini, bilgi ve becerilerini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç.Dr. Umut Safiye ŞAY COŞKUN'a,

Tecrübeleri ve bilgi birikimiyle desteğini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof.Dr. Yunus BULUT'a, çok kısa çalışma fırsatı bulduğum hocam sayın Prof.Dr. Meryem ÇETİN'e,

Bana samimi ve sıcak bir ortam sağlayan, tüm güler yüzlü mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Her zaman her türlü konuda yanımda olan, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim, özellikle tez çalışmam sırasında hayatı bana daha kolay yapmak için uğraşan çok değerli eşim sayın Ertuğrul ALICI'ya

Hayatıma neşe ve renk katan, varlıklarıyla hayatımı anlamlandıran sevgili oğlum Orhan ve küçük kızım Betül'e çok teşekkür ederim.

Dr. Ayşe ALICI

ÖZET

Çalışmamızda kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanması, antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi ve azol direnç mekanizmalarının moleküler olarak tespiti amaçlanmıştır.

Çalışmaya kan kültüründen izole edilen 100 *Candida* suşu dahil edildi. Tür düzeyinde tanımlanma sonucu suşların 41'i *C.albicans*, 22'si *C.parapsilosis*, 14'ü *C.glabrata*, 13'ü *C.tropicalis*, 5'i *C.lusitaniae*, 3'ü *C.guilliermondii*, 1'i *C.krusei*, 1'i *C.kefyr* olarak tanımlandı. Çalışmaya dahil edilen suşların %78'i yoğun bakım'dan, %16'sı dahili servislerden, %6'sı cerrahi servislerden gelen örneklerden izole edildi.

Antifungal duyarlılık testi *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarına yapıldı. Suşların flukonazol, posakonazol, vorikonazol, amfoterisin B, kaspofungin ve mikafungin için *in vitro* antifungal duyarlılıkları belirlendi.

C.albicans suşlarının %2'si flukonazol, %15'i vorikonazol dirençli bulunurken, suşların %5'i vorikonazol, %10'u mikafungin orta duyarlı bulundu. *C.albicans* suşlarının %34'ü amfoterisin B, %7'si posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bulunurken; suşların tamamı kaspofungin duyarlı bulundu.

C.parapsilosis suşlarının %23'ü flukonazol dirençli %23'ü doz bağımlı duyarlı bulundu. *C.parapsilosis* suşlarının %50'si vorikonazol, %14'ü mikafungin orta duyarlı bulunurken suşların tamamı kaspofungin duyarlı bulundu. Suşların %59'u amfoterisin B için, %5'i posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bulundu.

C.glabrata suşlarının %21'i flukonazol dirençli, %79'u flukonazol doz bağımlı duyarlı bulundu. *C.glabrata* suşlarının %7'si mikafungin dirençli bulunurken; suşların %64'ü mikafungin, %7'si kaspofungin orta duyarlı bulundu. *C.glabrata* suşlarının %71'i amfoterisin B, %57'si vorikonazol için vahşi olmayan tip olarak bulunurken, suşların tamamı posakonazol için vahşi tip olarak bulundu.

C.tropicalis suşlarının tamamı flukonazol ve kaspofungin duyarlı bulunurken; suşların %15'i vorikonazol, %15'i mikafungin orta duyarlı bulundu. Suşların %77'si amfoterisin B için, %8'i posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bulundu.

Antifungal duyarlılık testi sonucuna göre flukonazol dirençli 3 *C.glabrata*, 5 *C.parapsilosis*, 1 *C.albicans* ve flukonazol doz bağımlı duyarlı 11 *C.glabrata*, 5 *C.parapsilosis* suşunda *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon seviyeleri hesaplandı. Sonuçlar kontrol ATCC suşları ile kıyaslanarak genlerin kaç kat ekprese edildiği hesaplandı.

Buna göre flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının tamamında *ERG11* ve *CDR1*, %67'sinde *CDR2* geni over ekprese bulundu. Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının tamamında *ERG11* ve *CDR1*, %91'inde *CDR2* genini over ekprese bulundu. Flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının tamamında *MDR1*, %80'inde *ERG11*ve *CDR1* genleri over ekprese bulundu. Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşların %80'inde *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genleri over ekprese bulundu. Flukonazol dirençli *C.albicans* suşunda ise *ERG11* ve *CDR1* genleri over ekprese saptandı.

ABSTRACT

In our study, it was aimed to identify *Candida* species isolated from blood culture, to determine their antifungal susceptibility and molecular determination of azole resistance mechanisms.

A total of 100 *Candida* strains isolated from blood culture were included in the study. As a result of species-level identification, 41 of the strains were *C.albicans*, 22 were *C.parapsilosis*, 14 were *C.glabrata*, 13 were *C.tropicalis*, 5 were *C.lusitaniae*, 3 were *C.guilliermondii*, 1 was *C.krusei*, 1 was identified as *C.kefyr*. Of the strains included in the study, 78% were isolated from the intensive care unit, 16% from the internal services, and 6% from the surgical services

Antifungal susceptibility testing was performed on *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* and *C.tropicalis* strains. *In vitro* antifungal susceptibilities of the strains for fluconazole, posaconazole, voriconazole, amphotericin B, caspofungin and micafungin were determined.

While 2% of the *C.albicans* strains were resistant to fluconazole and 15% to voriconazole, 5% of the strains were found intermediate resistant to voriconazole and 10% to micafungin. While 34% of *C.albicans* strains were found as non-wild type for amphotericin B, 7% for posaconazole; all strains were found susceptible to caspofungin.

Twenty three percent of *C.parapsilosis* strains were resistant to fluconazole and 23% were dose-dependent susceptible. While 50% of the *C.parapsilosis* strains were found intermediate susceptible to voriconazole and 14% to micafungin, all strains were found susceptible to caspofungin. 59% of the strains were found non-wild type for amphotericin B and 5% for posaconazole.

Twenty one percent of the *C.glabrata* strains were found fluconazole resistant, 79% were dose-dependent susceptible to fluconazole. While 7% of *C.glabrata* strains were micafungin resistant; 64% of the strains were found intermediate susceptible to micafungin and 7% to caspofungin. While 71% of the strains were found as non-wild

type for amphotericin B, 57% for voriconazole, all of the strains were wild type for posaconazole.

While all *C.tropicalis* strains were found susceptible to fluconazole and caspofungin; 15% of the strains were found intermediate susceptible to voriconazole and 15% to micafungin. 77% of the strains were found to be non-wild type for amphotericin B and 8% to posaconazole.

According to the antifungal susceptibility test, expression levels of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* genes were calculated in the fluconazole-resistant 3 *C.glabrata*, 5 *C.parapsilosis*, 1 *C.albicans* and fluconazole dose-dependent susceptible 11 *C.glabrata*, 5 *C.parapsilosis* strains. The number of folds the genes were expressed was calculated by comparing the results with the control ATCC strains.

Accordingly, over expression of *ERG11* and *CDR1* was found in all fluconazole-resistant *C.glabrata* strains, and over expression of *CDR2* was found in 67% of them. In all fluconazole dose dependent susceptible *C.glabrata* strains over expressed *ERG11* and *CDR1* genes, while 91% of them over expressed *CDR2* genes. *MDR1* genes were overexpressed in all fluconazole resistant *C.parapsilosis* strains, and *ERG11* and *CDR1* genes were overexpressed in 80% of them. *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genes were overexpressed in 80% of fluconazole dose-dependent susceptible *C.parapsilosis* strains. In fluconazole resistant *C.albicans* strain, *ERG11* and *CDR1* genes were found overexpressed.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ:	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe:	3
2.2.Candida türü mantarların genel özellikleri:	3
2.3.Epidemiyoloji:	4
2.4.Patogenez ve İmmünite:	6
2.5.Virülans Faktörleri:.....	7
2.5.1.Aderans:	8
2.5.2.Slime Faktör ve Biyofilm Oluşturma:.....	8
2.5.3.Proteinaz:	9
2.5.4.Fosfolipaz:.....	9
2.5.5.Maya-hif Dönüşümü:	10
2.5.6.Hücre Yüzey Bileşimi:.....	10
2.5.7.Fenotipik Dönüşüm:.....	10
2.6.Tıbbi Önemi Olan Candida Türleri:	11
2.6.1.Candida albicans:	11
2.6.2.Candida tropicalis:	11
2.6.3.Candida glabrata:	12
2.6.4.Candida parapsilosis:	12
2.6.5.Candida kefyr:.....	13
2.6.6.Candida krusei:	13
2.6.7.Candida guilliermondii:	13
2.6.8.Candida dubliniensis:.....	13
2.6.9.Candida lusitania:.....	14
2.7.Kandida Enfeksiyonları:	16
2.7.1.Kütanoz Kandidiazis:	16
2.7.2.Onikomikoz:	16
2.7.3.Oral Kandidiazis:	16
2.7.4.Gastrointestinal Kandidiazis:	17

2.7.5.Genital Kandidiazis:.....	17
2.7.6.Kronik Mukokütanöz Kandidiazis:	18
2.7.7.Üriner Sistem Kandidiazis:	18
2.7.8.Kandidemi:	18
2.7.9.Kardiyak Kandidiazis:	19
2.7.10.Kandida Menenjit:	19
2.8.Tanı:	19
2.8.1.Direkt Mikroskopik İnceleme:	20
2.8.2.Kültür:	21
2.8.3.İdentifikasyon:	21
2.8.4.Serolojik Testler:.....	24
2.8.5.Moleküler Testler:.....	25
2.9.Antifungal Duyarlılık Testleri:	25
2.10.Antifungal İlaçlar:.....	26
2.10.1.Polienler Grubu Antifungaller:	28
2.10.2.Azol Grubu Antifungaller:	29
2.10.3.Ekinokandinler:.....	32
2.10.4.Antimetabolit Etkili Antifungaller:.....	33
2.10.5.Alliaminler:	33
2.11.Antifungal Direnç Mekanizmaları:.....	34
3.GEREÇ VE YÖNTEM:	36
3.1.İzolatların Toplanması ve Saklanması.....	36
3.2.Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri:	36
3.2.1.İzolatların canlandırılması:	36
3.2.2. Candida İzolatlarının Tanımlanması:.....	36
3.3. Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi:.....	37
3.4. Quantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT).....	40
3.4.1. RNA Eldesi	41
3.4.2. cDNA Sentezi	42
3.4.3.Real time qPCR.....	43
3.4.4. Rölatif Kantitasyon Hesaplama	44
3.5. İstatistiksel Metod:.....	45
4.BULGULAR	46
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7.KAYNAKLAR.....	73

KISALTMALAR VE SİMGELER

5-FU: 5-florourasile

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AIDS: Acquired İmmuno Defiency Sendrom

Anti-Mn: Anti Mannan

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

APGAR: American Pediatric Gross Assesment score

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenozin Trifosfat

BHI: Beyin Kalp İnfüzyon

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute

DNA: Deoksiribonükleik asit

EUCAST: European. Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FUMP: 5-florourasilmonofosfat

GMS: Gomori metamin Gümüş

GVDH: Graft versus Host Disease

HIV: Human immunodeficiency Virus

HSCT: Hematopoietik kök hücre nakli

I: İntermediate

ITS: İnternal Transcribed Spacer

IV: Intra Venöz

MALDI-TOF MS: Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry

MIK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

Mn: Mannan

NNIS: National Nasocomial İnfections Surveillance

Non-WT: non wild type

NSG: non-surface growth

PAS: Periyodik Asit-schiff

PMN: Polimorfonükleer Nötrofiller

PNA FISH: Peptide Nucleic Acid Fluorescence İn Situ Hybridisation

qRT-PZT: Quantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi

R: Resistant

rDNA: ribozomal DNA

RNA: Ribonükleik Asit

S: Susceptible

SABHI: Sabouraud Dekstroz ve Beyin Kalp İnfüzyon

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

S-DD: Susceptible-dose dependent

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

WT: Wild type

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1:İnvaziv kandida enfeksiyonları için risk faktörleri(1)	6
Tablo 2:Klinik laboboratuvarda sık karşılaşılan candida türlerinin en yaygın karekteristikleri (22).....	15
Tablo 3:Mantar hastalıklarının tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri(4)	20
Tablo 4:Bazı önemli Candida türlerinin biyokimyasal özellikleri(2)	24
Tablo 5:Çalışmada kullanılan E-Test stripleri, içerikleri ve markaları	38
Tablo 6:C.albicans için kullanılan antifungal sınır MİK değerleri(31,32).....	38
Tablo 7:C.glabrata için kullanılan antifungal sınır MİK değerleri(31,32).....	39
Tablo 8:C.parapsilosis için kullanılan antifungal sınır MİK değerleri(31,32).....	39
Tablo 9:C.tropicalis için kullanılan antifungal sınır MİK değerleri(31,32).....	40
Tablo 10:Moleküler testlere dahil edilen suşlar	40
Tablo 11:cDNA sentezi için kullanılan master miks içerikleri ve volümleri.....	42
Tablo 12:cDNA sentezi için kullanılan revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları.....	43
Tablo 13: Çalışmada kullanılan primerler, primer dizileri ve firma adı	43
Tablo 14:real time qPCR için kullanılan master miks içerikleri.....	44
Tablo 15:Real time qPCR reaksiyon koşulları.....	44
Tablo 16:Kan kültüründen izole edilen Candida türlerinin dağılımı	46
Tablo 17:Kan kültüründen izole edilen Candida türlerinin bölümlere göre dağılımı	46
Tablo 18:Candida albicans suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=41)	47
Tablo 19:Candida parapsilosis suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=22).....	48
Tablo 20:Candida glabrata suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=14).....	48
Tablo 21:Candida tropicalis suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=13).....	49
Tablo 22:Candida albicans izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri.....	50
Tablo 23:Candida parapsilosis izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri.....	50
Tablo 24:Candida glabrata izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri.....	50
Tablo 25:Candida tropicalis izolatları için altı antifungal için E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri.....	51
Tablo 26:C.albicans1 suşu azol grubu antifungal MİK değerleri ve çalışılan genlerin kat değişim sayıları	52

Tablo 27:Flukonazol dirençli <i>C.glabrata</i> suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları.....	53
Tablo 28:Flukonazol dirençli <i>C.glabrata</i> suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları.....	54
Tablo 29:Flukonazol dirençli bulunan <i>C.parapsilosis</i> suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları	56
Tablo 30:Flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunan <i>C.parapsilosis</i> suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları.....	57



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:germ tüp pozif ve negatif �rnekler(24)	22
Şekil 2:C.albicans klamidospor(22)	23
Şekil 3:C.dublinskiensis klamidospor(22)	23
Şekil 4:Antifungallerin ilaçların etki yerleri(4)	27
Şekil 5:Alilamin, azol ve polien antifungallerinin inhibisyon bölgelerini gösteren, ergosterol sentezi için metabolik pathway.. Ac-CoA, Asetil-koenzim A; HMG-CoA, hidroksimetil glutaril-koenzim A.(4)	27
Şekil 6: C.albicans1 su�u ERG11, CDR1, CDR2, MDR1 genleri ekspresyon seviyesi grafiği	52
Şekil 7:C.glabrata su�larının ERG11 geni ekspresyon seviyesi grafiği	54
Şekil 8:C.glabrata su�larının CDR1 geni ekspresyon seviyesi grafiği	55
Şekil 9:C.glabrata su�larının CDR2 geni ekspresyon seviyesi grafiği	55
Şekil 10:C.parapsilosis su�larının ERG11 geni ekspresyon seviyesi grafiği	57
Şekil 11:C.parapsilosis su�larının CDR1 geni ekspresyon seviyesi grafiği	58
Şekil 12:C.parapsilosis su�larının MDR1 geni ekspresyon seviyesi grafiği	58

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Malign hastalıklar ve Human immunodeficiency Virus(HIV)/Acquired immuno Defiency Syndrome(AIDS) için kullanılan tedaviler, yoğun bakım ünitesi (YBÜ) müdahaleleri ve organ naklindeki gelişmeler sonucunda, fırsatçı enfeksiyonlarda ve en önemlisi mantar enfeksiyonlarında bir artışa neden olmuştur. Mantar enfeksiyonları içinde de en sık *Candida* türleri ile patojen olarak karşılaşılmaktadır. *Candida* türleri, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan ilk beş patojen arasındadır ve nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8 ila %10' undan izole edilmektedir. *Candida* enfeksiyonlarının % 95'inden *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* patojen olarak tespit edilmiştir.(1)

Candida türleri fırsatçı mantar enfeksiyonlarının en sık görülenidir. Normalde insan deri ve mukoza florasında bulunurlar. Normal bireylerin %30-50'sinin ağızında ve gastrointestinal kanalında bulunurlar. Bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan yüzeysel, derin, akut veya kronik enfeksiyonlara neden olurlar. Florada bulunmaları nedeniyle enfeksiyonların çoğu endojendir.(2)

Candida türleri, toplumda paronşi, onikomikoz, yüzeysel mikozlara, yenidoğan ya da yaşlı diş protezi kullananlarda oral lezyonlara, doğurganlık çağındaki kadınlarda vaginite, hastanede yatan genel durumu bozuk hastalarda lokal ve sistemik ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler.(2)

Candida albicans invaziv enfeksiyonlardan en fazla izole edilen tür olup, kan dolaşımı enfeksiyonlarının %37-50'sinde etken patojendir. (3) Ancak invaziv enfeksiyonlarda diğer non-albicans *Candida* türlerinin sıklığında da son yıllarda artış saptanmıştır. Bu artış, profilaksi ve tedavide kullanılan antifungal ilaçların duyarlı suşları baskılaması sonucu dirençli suşların ortaya çıkmasına bağlanmıştır.(2)

Candida enfeksiyonlarının önlenmesi ve sağaltımı genellikle uzun dönem ilaç kullanımı gerektirmektedir. Bu amaçla ilk olarak azol grubu antifungaller tercih edilmektedir. Uzun ve tekrarlayan antifungal kullanımı sonucunda da dirençli *Candida* suşlarıyla karşılaşılmaktadır. (3)

Candida suşlarında azol direncinden sorumlu birçok mekanizma öne sürülmüş ve flukonazol direncinde birden fazla mekanizmanın birlikte rol aldığı belirlenmiştir. Bunlar; ilacın hücre içerisinde birikiminde azalma, ilacın hedefi olan lanosterol

demetilazda (Erg11p) değişiklik ve ergosterol biyosentezinde değişikliklerdir.(3). Ekinokandinlere direnç, glukan sentez enzim kompleksinde değişiklik ve böylece ilacın hedef enzimi inhibe edememesi sonucu gelişmektedir.(4)

Mantar enfeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesi için azollerin, özellikle flukonazolün çok sık kullanılması, bu sınıftan antifungal ajanlara karşı direncin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan çoğu *Candida* türü arasında flukonazole primer direnç nadirdir. Enfekte hastaların (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) kanından izole edilen en yaygın beş *Candida* türü arasında, yalnızca *C. krusei* flukonazole doğal olarak dirençli kabul edilir. Kalan türler arasında, *C. glabrata*'nın yaklaşık %10'u ve *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in % 2'sinden flukonazole primer dirençlidir. (4) Flukonazole karşı kazanılmış direnç ise uzun ve tekrarlayan antifungal kullanımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Flukonazol direncinde birçok mekanizma rol oynamaktadır. *Candida* türlerinde flukonazol direncine en sık neden olan mekanizma çoklu atım pompalarının overekspresyonudur. Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset ailesinden *Cdr1p* ve *Cdr2p* ile majör kolaylaştırıcı süper ailesinden (major facilitator superfamily) *Mdr1p* olmak üzere iki gruptur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ilaç atımında rol oynayan hücre membranı ile ilişkili taşıyıcıları kodlamaktadır. *MDR1* flukonazole, *CDR1* ve *CDR2* ise flukonazol, ketokonazol, itrakonazol gibi farklı azollere ve terbinafin, amorolfın gibi diğer bazı ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır.(3)

Çalışmamız Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında kan kültüründen izole edilen *Candida* suşlarını tür düzeyinde tanımladıktan sonra, flukonazol, posakonazol, vorikonazol, mikafungin, kaspofungin, amfoterisin B duyarlılıklarını belirleyip, flukonazol dirençli olan suşlarda azol direncinden sorumlu olan *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve *ERG11* genlerinin ekspresyon düzeylerini tespit etmeyi amaçlamaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe:

Deri, saç ve tırnakta hastalık yapan mantarlar eski çağlardan beri hekimlerin dikkatini çekmiştir. Pamukçuk olarak bilinen oral lezyonlara ait yazılı belgeler Hipokrat ve Galen zamanına kadar dayanmaktadır. Langenbeck, 1839 yılında, bir hastanın ağız lezyonlarında mantar tespit etmiştir. 1841'de Berg, pamukçuğun nedeninin mantar olduğunu kanıtlamış ve Robin, 1843 yılında organizmayı *Oidium albicans* olarak isimlendirmiştir. *Candida albicans* için 100'den fazla farklı isim mevcuttur; bunlardan, 1923'de Berkhout tarafından kullanılan *Monilia albicans* ve 1890'da Zopf tarafından kullanılan *Candida albicans* en yaygın olanlarıdır. İlk kez 1861 yılında Zenker tarafından derin yerleşimli bir Kandida olgusu bildirilmiştir. Kandida kaynaklı ilk endokardit vakası 1940 yılında tanımlanmıştır.(5,6)

Candida enfeksiyonlarının tarihindeki en ilginç dönem antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmaya başlandığı 1940'larda başlamıştır. O zamandan beri, önceden bildirilmemiş *Candida* enfeksiyonları da görülmeye başlamış ve hemen hemen tüm *candida* enfeksiyonlarının sıklığı kısa sürede artmıştır.(5)

2.2.Candida türü mantarların genel özellikleri:

Mantarlar ökaryotik organizmalardır. Çoğu hareketsizdir. Kitin veya selüloz içeren sert bir hücre duvarına sahiptirler. Fotosentez yapmazlar. Mantarların çoğu zorunlu veya fakültatif aeroptur. Kemotrofdurlar ve parçalanmış besin maddelerini pasif absorpsiyon veya aktif transportla ile alırlar. Mantarlar morfolojik görünümlerine göre; mayalar ve küfler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Mayalar değişik şekil(küresel-elipsoid) ve çaplarda (3-15µm) olabilen tek hücreli mantarlardır. Çoğu maya tomurcuklanarak ürer. Tomurcukların kopmadan uzamasıyla oluşan zincire psödo hif denir. Germ tüp, blastospor, klamidospor, artrospor ve kapsül gibi yapılar oluştururlar. Maya hücreleri genellikle yumuşak, opak, 1-3mm boyutlarında ve krem rengi kolonilerdir.(7) Üreme özelliklerine göre iki grupta toplanırlar. Gerçek veya tam mayalar seksüel olarak ürer ve askospor ya da basidiospor

geliştirirler. Kusurlu veya maya benzeri mantarlar ise sadece aseksüel olarak ürerler.(8)

Candida cinsi, bilinen bir seksüel üreme aşaması göstermeyen Deuteromycetes sınıfındadır. *Candida* cinsi, psödohifalar oluşturabilen karakteristik olarak beyaz asporojen (kusurlu) mayaları içerir. Cins içinde türler, öncelikle koloni morfolojisi, karbon kullanımı ve fermentasyon özellikleri ile karakterize edilir(6) Diğer *Candida* türlerinden farklı olarak, *C.albicans* dimorftir; maya hücresi ve psödohiflere ek olarak gerçek hifler de oluşturur. *C.glabrata* psödohif oluşturmaz. *Candida* türleri katı besiyerinde oda ısısı veya 37 °C' de 24 saatte krem rengi yumuşak koloniler oluştururlar. Psödohifler katı yüzeyin altına doğru uzarlar. Gram boyama ile gram pozitif boyanırlar.(7)

Günümüzde 150'den fazla bilinen *Candida* türü vardır. Ancak bu türlerin sadece 15'i bulaşıcı ajan olarak hastalardan izole edilmiştir. Bunlar *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida norgosa* ve *Candida noragosa*'dır.(1)

2.3.Epidemiyoloji:

Candida türleri klinik örneklerden en sık izole edilen mayalardır. Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyonlar Sürveyans (National Nosocomial Infections Surveillance; NNIS) sistemine katılan 180 hastaneden alınan verilere göre, ABD'de Ocak 1980 ve Nisan 1990 arasında nozokomiyal mantar enfeksiyonu ile ilgili 27.200 mantar izolatu bildirilmiştir. Bildirilen izolatların 19.621'i (% 72.1) *candida*

türleridir.(9)

Candida türleri fırsatçı mantar patojenlerinin en yaygın olanıdır. Normal insan florasında deri, gastrointestinal sistem ve müköz mebranlarda bulunurlar. Normal flora elemanı oldukları için çoğunlukla endojen enfeksiyonlara sebep olurlar. Kandidoz en çok görülen sistemik mikozdur ve *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.guilliermondi* ve *C.dubliniensis* en sık izole edilen etkenlerdir.(7) Bu fırsatçı patojenler özellikle organ veya kemik iliği nakli alıcıları, altta yatan kanser hastalığının tedavisi için sitotoksik ilaçlar alan ve AIDS'li hastalar gibi ciddi bağışıklığı zayıflamış hastalarda görülür.(10)

Candida türleri, tüm invaziv mikozların %70- 90'ını oluşturan, invaziv mantar enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir.(11) *Candida* cinsine ait mayalar, septisemiye neden olan ajanlar arasında ABD'de dördüncü; Avrupa'da altıncı sırada yer almaktadır.(12) Türkiye'de ise *Candida* türleri kan dolaşımı enfeksiyonlarının üçüncü en yaygın nedeni (%10.1) olarak bildirilmiştir.(13).

İzolasyon sıklıkları değişkenlik gösterse de son 20-30 yılda enfeksiyonların % 95'inde *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* sorumludur. Bu türler arasında *C. albicans* azalan payına rağmen hala en yaygın patojendir. İnsanlarda genellikle deri, orofarenks, alt solunum yolu, gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem gibi bazı bölgeleri kolonize eder. *C. albicans* dışındaki türlerin izolasyon oranları, hasta popülasyonunun özelliklerine (yaş, altta yatan hastalıklar, hastanede kalış, vb.) göre değişebilir. *C. parapsilosis* yenidoğanlarda kandidemi vakalarının %30'una neden olurken, yetişkinlerde bu oran % 10-15'tir. *C. glabrata*, yaşlı ve neoplastik hastalar arasında daha yaygın bir bulaşıcı ajandır. *C. tropicalis* ise daha çok lösemi hastaları ve nötropenik hastalar arasında görülmektedir. *C. parapsilosis* cildi kolonize ettiğinden, kateterle ilişkili enfeksiyonlarda sık görülür ve salgınlara neden olabilir. Öte yandan *C. krusei*, hematopoietik kök hücre alıcıları veya flukonazol profilaksisi alan nötropenik lösemi hastaları arasında daha yaygındır.(1)

Tablo 1:İnvaziv kandida enfeksiyonları için risk faktörleri (1)

Yetişkinler için
Kan ve Organ Tümörleri
Nötropeni
Renal Yetmezlik
Şiddetli Akut Pankreatit
Organ Nakli
Yoğun Bakım Ünitelerinde Uzun Süreli Yatış
Yüksek APACHE (Acute Pysiology And Chronic Health Evaluation) II Skoru
Geniş Spektrumlu Antibiyotik Kullanımı
Antifungal Ajanların Kullanımı
Santral Venöz Katater Varlığı
Hemodiyaliz
Mekanik Ventilasyon
Total Parenteral Beslenme
İmmüsupresif İlaç Kullanımı
Candida Türlerinin Kolonizasyonu
Cerrahi Girişimler
Yenidoğan ve Çocuklar İçin
Prematürite
Düşük Doğum Ağırlığı
Düşük APGAR (American Pediatric Gross Assessment) Skoru
Konjenital Malformasyonlar

2.4.Patogenez ve İmmunité:

Hem humoral bağışıklık hem de hücre aracılı bağışıklık, Candida enfeksiyonlarına karşı savunmada rol oynar. Nötrofiller birinci basamak savunmadır ve nötrofil sayısı veya işlevindeki kusurlar, ciddi *C.albicans* enfeksiyonlarının en yaygın sebebidir. *C.albicans*'ın maya formları, özellikle antikor ve kompleman tarafından opsonize edildiğinde, bu doğal immün hücreler tarafından kolayca fagosit

edilir ve öldürülür. Hif formları, polimorfonükleer nötrofiller (PMN'ler) tarafından sindirilemeyecek kadar büyük olabilir, ancak bu bağışıklık hücreleri, hiflere bağlanarak ve oksidatif patlama tarafından üretilen metabolitleri boşaltarak mantarları yine de öldürebilir. (14)

T lenfosit disfonksiyonunu içeren birçok immün yetmezlik sendromu, şiddetli mukokutanöz kandidiyaz ile sonuçlanır ve Kandida enfeksiyonlarına karşı savunmada immün sistemin bu kolunun önemini vurgular. Örneğin, AIDS'li hastalar sık sık oral ve özofageal kandidiyaz atakları geçirirler, bu da yüzeysel enfeksiyonlara karşı korumanın bile CD4⁺ aracılı immün reaksiyonu içerdiğini düşündürür. Diğer mantarlarda olduğu gibi, makrofajların ve diğer immün efektör hücrelerin sitokin aktivasyonu, *C.albicans*'ı öldürme yeteneklerini artırır. Bu nedenle, TH1 ve TH2 aracılı sitokin yanıtları arasındaki uygun denge ve bozulmamış CD4⁺ hücre işlevi candida enfeksiyonlarında önemli bir yere sahiptir.(14)

Sağlıklı bireylerde oportunistik fungal patojenler mukozal yüzeylerde kolonize durumdadır. İmmünkompetan kişilerde minör enfeksiyonlara neden olurlar. Bebeklerde trush, kadınlardaki vaginal kandida gibi. İmmünkomprese kişilerde fatal sistemik enfeksiyonlara neden olabilirler.(15)

Candida türleriyle enfeksiyon endojen ya da ekzojen kaynaklı olabilir. Kandidaların sebep olduğu endojen kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında, öncelikle Kandidaların gastrointestinal kanalda sayıca artıp kolonize olmaları gerekmektedir. Altta yatan kronik hastalıklar, yoğun bakım veya yanık ünitesinde bulunmak, immünsüpresif tedavi almak, geniş spektrumlu çoklu antibiyotik kullanmak Kandidaların hem endojen kolonizasyonunu hem de invazyonunu kolaylaştırır. Ekzojen olarak da *Candida* türlerinin hastadan hastaya, sağlık personelinin hastaya geçebileceği, kullanılan tıbbi araçlarla (kateter gibi), kontamine sıvılar ve beslenme solüsyonları ile bulaşabileceği gösterilmiştir.(16)

2.5.Virülans Faktörleri:

Candida türlerinin; aderans, slime faktör ve biyofilm oluşturma, proteinaz ve fosfolipaz salgılaması, maya-hif dönüşümü, hücre yüzey bileşimi, fenotipik dönüşüm virülans faktörlerinin başlıcalarıdır.

2.5.1.Aderans:

Candida türlerinin çeşitli dokulara ve cansız yüzeylere tutunma yeteneği enfeksiyonun erken evresinde önemli olduğu bilinmektedir. Çeşitli *candida* türlerinin aderans yeteneği virülansla doğrudan ilişkilidir. Aderans özgün (ligand-reseptör etkileşimi) ve özgün olmayan (elektrostatik, van der Waals kuvvetleri) mekanizmaların kombinasyonu ile gerçekleşir.(4)

Candida türleri ayrıca tıbbi cihazların yüzeylerine yapışabilir ve biyofilmler oluşturabilir, bu da kateter yerleştirilmesine bağlı kandidemi ve antifungal dirençte artışa neden olur. Virülans derecesi ve biyofilm oluşturabilme yeteneği arasında pozitif bir korelasyon vardır.(15)

Candida türlerinin ağız ve vagina epiteline *in vitro* yapışma yeteneğinin incelendiği bir çalışmada *C.albicans*'ın deneye alınan diğer türlerden daha fazla derecede bağlanabildiği, *C.tropicalis* ve *C.stellatoidea*'nin de anlamlı derecede aderans gösterdikleri, *C.parapsilosis*'de bu özelliğin zayıf olduğu, *C.guilliermondi*, *C.krusei* ve *C.Kefyr*'de bulunmadığı gösterilmiştir. *Candida* türleri arasındaki bu fark adherens ile patojenliğin ilişkisini göstermektedir.(17)

2.5.2.Slime Faktör ve Biyofilm Oluşturma:

Candida türlerinin virülans faktörlerinden biri de slime oluşturma yeteneğidir. Slime faktör mikroorganizmanın plastik ve metal yüzeylere yapışmasını arttıran ve fagositozunu önleyen bir faktördür. İlk kez Christensen ve ark. tarafından gösterilen slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşmaktadır. Bu özellik sayesinde stafilokoklar doku yüzeylerine tutunup, çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedirler.(18) Slime üretebilen *Kandida* hücreleri katetere yapışarak, hem katetere bağlı *Kandida* enfeksiyonlarına hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal ilaçlarının etkisinden kurtulabilmesine neden olabilmektedirler.

Biyofilm damar içi kateter veya protez uygulamalarında başlıca komplikasyon olan enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Yabancı cisimler organizmada fibronektin, fibrinojen, vitronektin veya laminin ile kaplanır ve mikroorganizmalar konağın bu matriks proteinlerine yapışabilirler ve burada hücre dışı matriks salgılayabildiklerinde yüzeye yapışan, çoğunlukla polisakkarit yapısında bir biyofilm oluşur. Kateterde ortaya çıkan biyofilmlerde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörlerin rol

oynadığı; bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın slime faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin gerekli olduğu bilinmektedir.(17)

2.5.3. Proteinaz:

Proteinaz enzimi, ilk kez 1964 yılında tanımlanmıştır. *C.albicans* ve diğer bazı *Candida* türlerinin proteinaz salgıladığı tespit edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda proteinaz enziminin, fizyolojik önemi olan albümin, immungloblin, laktoferrin, laktoperoksidaz, müsin gibi substratları sindirdikleri saptanmıştır. Diğer bazı çalışmalarda ise epidermisin üst tabakasında yer alan, ekzojen patojenlere karşı savunma işlevi gören ve sistatin A olarak isimlendirilen epidermal sistein proteinaz inhibitörünün, *Candida* proteinazı tarafından yıkıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar proteinaz enzimi salan *Candida* türlerinin, vücutta bulunan pek çok koruyucu proteini parçalayarak daha kolay invazyon yapabildiğini göstermektedir. (19)

C. albicans ve diğer bazı *Candida* türleri tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde proteinaz salgırlar. Bu hücre dışı enzimin *C.tropicalis* ve *C.kefyr*'de de bulunduğu gösterilmiştir. Bunlar *C.albicans* ve *C.tropicalis*'de proteolitik ve keratinolitik etkinlik gösteren karboksil proteinaz; *C.parapsilosis*'de proteolitik etkinliği olan aspartil proteinaz ve *C.albicans*'daki kollajenolitik enzimlerdir. Proteolitik enzimlerin önemli bir virülans faktörü olduğu bilinmektedir. Bunlar, başta *C.albicans*, sonra daha az derecede *C.tropicalis*, orta derecede *C. parapsilosis* izolatları olmak üzere yalnızca en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır. Enfeksiyon etkeni olabilen diğer *Candida* türlerinde (*C.glabrata*, *C.krusei*, *C.kefyr* ve *C.guilliermondi*) hücre dışı proteinaz saptanamamıştır. Bu durum *Candida* türlerinin insandaki virülans sıralamasına yansımaktadır. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C.albicans* kökenlerinin *in vivo* proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda ölüme sebep oldukları gösterilmiştir.(17)

2.5.4. Fosfolipaz:

Yapılan çalışmalarda, *C.albicans* kökenlerinin %79'unun fosfolipaz üretirken; *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* izolatlarının hiç birinin bu enzimi üretmediğinin gözlemlenmesi bu enzim aktivitesinin yalnızca bu türle sınırlı olduğunu göstermektedir.(17) *C.albicans* hücreleri fosfolipaz A, B ve C'nin yanı sıra lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz transasetilaz aktiviteleri de sergiler. Fosfolipaz

aktiviteleri, konakçı hücre zarı hasarı, yapışma ve penetrasyon ile ilişkili olduğu için virülans faktörü olarak kabul edilir. Dolayısıyla, *C.albicans* suşları tarafından fosfolipaz üretimi, epitel hücrelere yapışma ve virülans ile sonuçlanır.(20)

2.5.5.Maya-hif Dönüşümü:

Maya-hif dönüşümü yapabilme yeteneğinin patojenitede bir miktar öneme sahip olduğu bilinmektedir. *Candida* türlerinin çoğu böyle bir dönüşümü yapabilmektedir. Dönüşümün hem pH hem de ısı ile düzenlendiği gösterilmiştir. Kandidalar Maya- hif dönüşümü yaparak mikro çevredeki değişikliklere yanıt vermektedir. Ayrıca *C.albicans* hifleri tigmotrofizm (dokunma hissi) sergilemeleri sayesinde uzun oyuklar boyunca ve deliklerden geçerek üreyebilir ve bu özellik epitelyal yüzeylerden geçmesine de yardımcı olur.(4)

2.5.6.Hücre Yüzey Bileşimi:

C.albicans'ın hücre duvarı birincil olarak polisakkaritler, mannan, glukan ve kitinden oluşur. Hücre duvarının kuru ağırlığının mannanlar yaklaşık %23'ünü, glukanlar % 40-60'ını, proteinler % 6-25'ini, lipitler % 1-7'sini ve kitinler % 0.6-9'unu temsil eder. (6)

Candida türlerinin hücre yüzey bileşimi hem hücrenin hidrobisitesini hem de hücreye verilecek bağışık yanıtı etkileyebilir. Hücre yüzeyindeki mannoproteinlerin glikozilasyon tipi ve derecesi, hücrenin hidrofobisitesini ve böylece de epitelyal yüzeylere tutunmasını etkileyebilir. *C.albicans*'ın germ tüpleri hidrofobikken; tomurcuk ve blastokonidyumlar hidrofiliktir. *C.albicans*'ın çeşitli glikoproteinleri organizmaya verilen bağışık yanıtı da baskılayabilir ve bunun mekanizmaları iyi bir şekilde anlaşılmamıştır.(4)

Hidrofobik olan mikroorganizmaların özellikle dakron, teflon, akrilik gibi yüzeylere adezyonunun daha iyi olacağı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada hidrofobisitesi en yüksek *C.parapsilosis* bulunmuştur. Bu da *C.parapsilosis*'in damar içi kateterlerle ilişkisini destekleyen diğer bir veridir.(19)

2.5.7.Fenotipik Dönüşüm:

Candida türlerinin bir morfolojiden diğerine çabucak geçme yeteneği fenotipik dönüşüm olarak ifade edilir. Kandida kolonileri, smooth(pürüzsüz), rough (pürüzlü), yıldız, noktalı, şapkalı, düzensiz kırışık ve tüylü olmak üzere farklı fenotipler arasında

geçiş yapabilir. (15) Orijinal olarak kaba koloni morfolojisindeki değişiklikler için kullanılan bu terim, şimdilerde tomurcuklanma ve hif oluşumu, hücre duvar glikoproteinlerinin ekspresyonu, proteolitik enzim salgılanması, nötrofillerin oluşturduğu oksidatif hasara direnç gösterme, antifungal duyarlılık ve direnç gibi özellikler konusunda farklılıkları temsil eden katı besiyerlerindeki farklı fenotipik değişimler için kullanılmaktadır. Fenotipik dönüşüm, organizmanın kendi mikro çevresindeki değişiklere çabuk uyum sağlanmasını olanaklı kılarak, onun hayatta kalmasını, dokulara invazyonunu ve konak savunmasından kaçmasını kolaylaştırır ve *Candida* türlerinin virülansına katkıda bulunur.(4)

2.6.Tıbbi Önemi Olan *Candida* Türleri:

2.6.1.*Candida albicans*:

Candida albicans klinik örneklerden en sık izole edilen türdür. Mukozaya ait kökenlerin %90-100'ünü ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının %50-70 'ini oluşturur. Krem renkli, yumuşak S tipi koloniler yaparlar. Yalancı ve gerçek hifler yapabilirler. Mısır unlu tween 80 besiyerinde yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler oluşturmuş yuvarlak blastokonidyumlar ve hif uçlarında türe özgü kalın duvarlı, tek veya birkaç tane klamidospore oluştururlar. Ana hücreden orijin alan ve ana hücreyle birleştiği noktada bir boğumlanma ya da daralma yapmaksızın birbirine paralel duvarları ile hifal uzantılar gösteren yapılar (germ tüp) oluşturması tipik özelliğidir.(2,4)

2.6.2.*Candida tropicalis*:

C.tropicalis Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinde beyaz ile krem renginde, kremsi, pürüzsüz görünümde koloniler oluşturur. Bu haliyle diğer *Candida* türlerinden ayrımı yapılamaz. Yalancı hif ve blastokonidya oluşturur. Blastokonidya, yalancı hifin daraldığı noktalardan doğar ve yalancı hif boyunca tek tek veya düzensiz kümeler şeklinde yerleşir. *C.tropicalis*, galaktoz, sukroz, maltoz ve trehalozu fermente edebilir, ayrıca bunları ve diğer karbonhidratları oksidatif yolla asimile edebilir. (21)

C.tropicalis, yaygın olarak, en virülan ikinci *Candida* türü olarak kabul edilmiştir, güçlü bir biyofilm üreticisi olarak bilinmektedir ve epitel ve endotel hücrelerine yapışır. *C.tropicalis* ozmotoleran bir mikroorganizmadır ve bu yüksek tuz

konsantrasyonunda hayatta kalma yeteneği, *in vitro* virölans faktörlerinin ekspresyonuna ve antifungal ilaçlara dirence katkıda bulunur.(21)

İmmün sistemi baskılanmış, özellikle lösemi veya diğeri hematolojik maligniteleri olan nötropenik hastalarda enfeksiyon etkenidir.(22) Ayrıca paranişı, otitis eksterna, endokardit, endoftalmit, artrit ve peritonit enfeksiyonlarına da sebep olabilmektedir.(2)

2.6.3.Candida glabrata:

İdrar örneklerinden izole edilen tüm mayaların yaklaşık %20'sini *Candida glabrata* oluşturur. Fungemilerde *Candida albicans*'dan sonra en yaygın ikinci etkenidir. *Candida glabrata*'nın neden olduğu endokardit ve yaygın enfeksiyon olguları da bildirilmiştir. (23)*C.glabrata* kolonileri, diğeri mayalara kıyasla daha yavaş ürer ve genellikle üremek için 48-72 saate ihtiyaç duyarlar. Mikroskopik olarak yalancı hif yapmazlar ve 2-3 um boyutunda tek noktadan tomurcuklanan, normal boyutlarda maya hücreleridir.(23) Mısırlu agarda küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan blastokinidyumlar oluştururlar. Yalancı hif oluşturmazlar. (2)

Glukoz ve trehelazu asimile eder.(23)

2.6.4.Candida parapsilosis:

Candida parapsilosis; fungemi, septik artrit, endokardit, peritonit gibi enfeksiyonlara yol açan bir *Candida* türüdür. Ekzojen yolla bulaşarak epidemilere, nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilir. Etken olarak izole edildiği enfeksiyonların büyük bir kısmında hastanın geçmişinde girişimsel bir işlem, hiperalimentasyon ya da yapay bir protez kullanımı hikayesi bulunmaktadır. (2) Mantar endokarditinin en yaygın ikinci etkenidir (*Candida albicans* en yaygın olanıdır). Ayrıca yenidoğanlarda invazif mantar enfeksiyonlarından da sıklıkla sorumludur. *C.parapsilosis*'te ekinokandin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri, diğeri *Candida* türlerine oranla daha yüksektir (22)

Mısırlu agarda yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidyumlar görülür. Çok önemli bir özelliği arada iri hiflerin bulunmasıdır. (2)

2.6.5.Candida kefir:

Çok miktarda uzun, dikdörtgen şeklinde blastokonidya gözlemlenmesi ve blastokonidyumların gevşek bağlantılı olması, çapraz şekilde kümeleşip ‘derede yüzen kütükler’ görüntüsü vermesi bu türün tanımlanmasında önemlidir. Blastokonidyumların üreme noktaları, ağaç dallarına benzer şekilde sıralı dizilim göstermesi dışında *C.krusei* de benzer patern oluşturur. Bu iki türün ayırımında karbonhidrat asimilasyon testleri gerekli olabilir.(23)

C.kefir glukoz, sukroz, galaktoz, selobiyoz, ksiloz, rafinoz’u asimile eder. Bu özelliği ile *C.krusei*’den ayrılır.(2)

2.6.6.Candida krusei:

Özellikle hastanede yatan hematolojik maligniteli hastalarda görülen bir türdür. Esas kaynak gastrointestinal sistem olup antifungal tedavi sonrası kolonizasyonu artar. SDA’da düzgün yüzeyli ve iri koloniler oluşturur. Mısır unlu agarda dizilimi ağaca benzeyen blastosporlar oluşturur. 25°C’de üç gün inkübe edildikten sonra Sabouraud buyyonun yüzeyinde kalın bir pellikül (zarımsı katman) oluşturur. *C.krusei* sikloheksimide duyarlıdır, sadece glukozu asimile edebilir. Flukonazole intrinsik direnç mevcuttur.(2)

2.6.7.Candida guilliermondii:

Zaman zaman endokardit, osteomyelit, deri ve idrar yolu enfeksiyonlarına ve dissemine hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyonlar ölümcül olabilir. Mısır unlu agarda, az sayıda kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastosporların oluşturduğu kümeler yaparlar.(22)

2.6.8.Candida dubliniensis:

Öncelikle tekrarlayan eritematöz oral kandidiyazis ile ilişkilidir, HIV ile enfekte hastalarda ara sıra diğer vücut bölgelerinden izole edilebilirler. *In vitro* çalışmalar, flukonazole tekrar tekrar maruz kalındığında duyarlı izolatların hızla azalmış duyarlılık veya direnç geliştirebildiğini göstermiştir.(22)

Germ tüp ve klamidospore oluşturması nedeniyle *C.albicans*’a benzer bulunmuştur. *Candida albicans* ile ayırımında 45 °C’ de üreyememe özelliği, germ tüp

oluşturma fakat *Candida albicans* için yapılan Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridisation (PNA FISH) testinin negatif olması, *C.albicans*'a göre daha bol miktarda klamidospore üretmesi gibi özellikler kullanılabilir. Ayrıca Deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizi, karbonhidrat asimilasyon testleri ve kromojenik özel besiyerleriyle de ayırım yapılabilir.(23)

2.6.9.Candida lusitania:

Morfolojik olarak *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'e benzemektedir. Sellobiyozu fermente etme ve ramnozu asimile etme özelliği ile bunlardan ayrılır.(2)

Candida lusitaniae'nin bazı suşlarında, daha önce duyarlı olan kolonilerde, fenotipik dönüşüm mekanizmasına bağlı olarak sporadik amfoterisin B direnci geliştiği saptanmıştır. *C.lusitaniae* izolatlarının çoğu, duyarlılık testlerinde amfoterisin B duyarlı olduğu için, bu mekanizmanın kazanılmış mı veya indüklenebilir mi olduğu net değildir.(23)

Tablo 2:Klinik laboboratuvarda sık karşılaşılan candida türlerinin en yaygın karekteristikleri (22)

ORGANİZMA	Mısır unlu agarda 25 °C'de Mikroskopik görünüm	BÜYÜME			Germ tüp	Üreaz (25°C de)
		Saboura ud broth da	25 °Cde siklohek zimidle	37°C de SDA da		
<i>C.albicans</i> <i>C.dubliniensis</i>	Terminal klamidosporlu pseudohifler; septada blastokonidya kümeleri	NSG	+		+	0
<i>C.tropicalis</i>	Pseudohif boyunca herhangi bir yerde blastokonidya	Kabarcıklı dar yüzey filmi	0; v		0	0
<i>C.parapsilosis</i>	Curved pseudohif boyunca balastokonidya, dev miçelyal hücreler	NSG	0		0	0
<i>C.lusitaniae</i>	Curved pseudohif boyunca uzayan kısa blastokonidya zincirleri	NSG	0		0	0
<i>C.guilliermondii</i>	Oldukça kısa, ince Psödohif; septada blastokonidia kümeleri	NSG	+		0	0
<i>C.kefyr</i>	Psödohif boyunca bir akarsuda kütüklere benzeyen uzun blastokonidia	NSG	+		0	0
<i>C.glabrata</i>	Psödohif yok; küçük hücreler, terminal tomurcuklanma	NSG	0		0	0
<i>C.krusei</i>	Çapraz kibrit çöpü veya ağaç benzeri blastokonidia içeren Psödohif	Tüpün üst taraflarında geniş yüzey filmi	0		0	+, v
<i>C.lipolytica</i>	Psödohif boyunca kısa zincirlerde uzamış Blastokonidia	Pellicle(g ecikmiş)	+		0	+

SDA: Sabouraud dekstroaz agar, +: pozitif, 0: negatif , v:strain variation, NSG: yüzey üremesi yok

2.7.Kandida Enfeksiyonları:

Uygun koşullar oluşursa, *Candida* türleri herhangi bir organ sisteminde klinik olarak belirgin enfeksiyon oluşturabilirler. Bu enfeksiyonlar, yüzeysel mukoza enfeksiyonu ve kütanöz kandidozdan karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyin gibi organları içeren hematogen yayılıma kadar kendini gösterir. Hematogen yayılımda doğrudan enfeksiyona atfedilebilecek mortalite oranı %50'ye yaklaşır.(4)

2.7.1.Kütanoz Kandidiazis:

Derinin daha çok aksilla, meme altı, anüs çevresi, el ve ayak parmak araları gibi sıcak ve nemli kat yerlerinde görülür (Kandida intertrigosu). Şişmanlık, diabetes mellitus, travma veya maserasyon predispozan faktörlerdir. Lezyonlar, yüzeysel erozyonlar şeklinde kızarıklık ve nemli olup bazılarında veziküller gelişebilir. El parmak aralarında görülen kandidoz (erosio interdigitale) daha çok bir meslek hastalığıdır. Elleri sürekli nemli kalan ev kadınları, bulaşık yıkayıcılar, çamaşırhane işçileri, aşçılar ve balıkçılarda sık görülür.(2)

Yenidoğanlarda görülen bebek bezi dermatitine de neden olabilirler. Perianal bölgeden başlayarak bezle temas eden tüm yerlere yayılabilirler. (5)

2.7.2.Onikomikoz:

Kandidalara bağlı tırnak enfeksiyonu ellerde daha sık görülür. Tırnak ile birlikte tırnak çevresindeki yumuşak dokunun da enfekte olması karakteristiktir. Yumuşak doku kızarıklık, ödemli olup piyogenik bir enfeksiyon görünümü verir. Tırnak zamanla düşebilir. Onikomikoz da nem önemli bir predispozan faktördür.(2)

Tırnak enfeksiyonlarına en sık *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondi* neden olur.(4)

2.7.3.Oral Kandidiazis:

Pamukçuk olarak bilinir. Enfeksiyon bukkal mukoza veya dilde beyaz plaklar veya yamalar şeklinde gözlenir. Daha ciddi enfeksiyonlarda bu plaklar membran ile birleşir. Plaklar epitele sıkıca yapışmışlardır ve yerinden kaldırıldıklarında kızarıklık, ödemli bir tabanları vardır. Eksudadan hazırlanan yayma örneğinde karakteristik olan yalancı hif blastokonidyanın gözlenmesi ile tanı konulabilir. (23)

Uzun süreli antibiyotik kullanımına bağlı değişen oral flora, yenidoğanda tükürüğün düşük pH'sı, dildeki papillerin hipertrofisi ve kronik glossit predispozan faktörlerdir. Oral kandidoz, günümüzde AIDS'in tanımlayıcı hastalığı olarak kabul edilir ve AIDS hastalarının neredeyse %100 'ünde saptanır. (23)

Oral kandidoz'da en sık etken *C.albicans*'dır. Ancak *C.dubliniensis* gibi yakın ilişkili türlerde etken olarak görülebilir.(23)

2.7.4.Gastrointestinal Kandidiazis:

Sıklıkla orofarengeal hastalığın uzantısı olarak, hemen hemen tüm sindirim sisteminde Kandida enfeksiyonları görülebilir. Özofajit, gastrit, enterit ve perianal hastalıkların geliştiği olgular bildirilmiştir. Özellikle gastroözofageal birleşke, Kandida enfeksiyonlarının sık geliştiği bir bölgedir. Hematolojik maligniteli hastalarda, düşük Ph ortamı bu bölgede enfeksiyonun sık görülme eğiliminde olmasını açıklayabilir. Disfaji retrosternal ağrı, üst gastrointestinal kanama ve bulantı görülebilen semptomlardır. Özellikle yenidoğanda, özefageal kandidoz, orofarengeal pamukçuk sonrasında da gözlenebilir.(23)

Kandida peritoniti ayaktan kronik periton diyalizi koşullarında ya da gastrointestinal cerrahi sonrası anastomoz sızıntısı veya bağırsak perforasyonunda ortaya çıkar. Bu enfeksiyonlar batında lokal kalabilir, komşu organları tutabilir veya hematojen kandidoza yol açabilir.(4)

2.7.5.Genital Kandidiazis:

Vulvovaginitlerin en sık etkenlerinden biri *Candida* türleridir. Vulvovaginal kandidoz daha çok doğurganlık çağındaki kadınlarda görülür. Geniş etki spektrumlu antibiyotik kullanımı, doğum kontrol hapı kullanımı, diabetes mellitus ve gebelik önemli predispozan faktörleridir. Hastalarda irritasyon, kaşıntı ve beyaz bir vaginal akıntı vardır. Rekürrens önemli bir sorundur. Genital kandidoz bazen cinsel ilişki ile bulaşabilir. Erkeklerde balanit, balnopoistit, üretrit görülebilir. İnfekte cinsel eşlerin birlikte tedavi görmeleri önemlidir.(2)

2.7.6.Kronik Mukokütanöz Kandidiazis:

Kronik mukokütanöz kandidoz ender görülen bir durumdur ve genellikle erken çocukluk döneminde başlar. T-lenfositlerin *Candida* türlerine yetersiz bir yanıtı söz konusudur. Bu hastalarda şiddetli seyreden ve sürekli bulunan mukokütanöz *Candida* lezyonları vardır ve buna, yaygın tırnak tutulumu ve vajinit de eşlik eder. Lezyonlar şekilsiz bir granülomatöz görünüm alacak kadar irileşebilir.(4)

2.7.7.Üriner Sistem Kandidiazis:

Candida türlerinin neden olduğu idrar yolu tutulumu, asemptomatik mesane kolonizasyonundan hematojen yayılıma bağlı böbrek apselerine kadar değişebilir. *Candida* türleri ile mesane kolonizasyonu; hastaya kalıcı mesane kateteri takılması, idrar yolu tıkanıklığı ya da öncesinde üriner girişimlerde bulunulması gibi durumlarda gerçekleşebilir. Diabetik hastalarda risk altındadır. Mesane yukarıda sayılan durumlarda *Candida* türleri ile kolonize olabilir ve üretrit ve sistit gelişebilir. Böbreğe hematojen yolla yayılım böbrek apsesi, papiller nekroz veya üreter ya da renal pelviste ‘mantar topu’ oluşturabilir.(4)

Glomerülde histolojik olarak yalancı hif ve blastokonidya kümeleri gözlemlenebilir. Na⁺ ve H⁺ iyon değişimine bağlı olarak düşen Ph ile oluşan mikroçevre, muhtemelen mayanın glomerülde çoğalmasına olanak sağlar. (23)

2.7.8.Kandidemi:

Kandidemi, olguların çoğunda gastrointestinal ya da genitoüriner kanaldan kaynaklanan endojen bir enfeksiyon olmakla birlikte, kalıcı bir kataterin kontaminasyonu sonucu da oluşabilir. Kataterin bağlanma yerine veya lümenine ulaşan organizmalar katater lümeninde bir biyofilm oluşturabilir ve ardından dolaşıma geçerler.(4)

C.albicans, kandidemi de en sık görülen etken olup, kan izolatlarının %50-60’ını oluşturur. Geri kalan albicans-dışı *Candida* türleri arasında en sık izole edilen etken *C.glabrata*’dır.(23)

2.7.9.Kardiyak Kandidiazis:

Candida türlerine bağlı kalp tutulumunun çoğu, hematojen yolla protez veya hasar görmüş bir kalp kapağına, miyokarda veya perikardiyal boşluğa etkenin yerleşmesi sonucu ortaya çıkar. Klinik tablo bakteriyal endokardite benzer. Ateşin yanı sıra yeni ve değişen bir kalp üfürümü vardır. Vejetasyonlar klasik olarak iri ve kolayca dağılılabılır olduğundan, *Candida* türlerinin yaptığı endokarditlerde embolik olaylar bakteri endokarditine göre daha sık görülür.(4)

2.7.10.Kandida Menenjit:

Gastrointestinal veya solunum sistemi enfeksiyonlarının yayılmasına, enfektif kalp kapağından kaynaklanan septik emboliye, travma ya da komplikasyonuna sekonder olarak gelişebilir. Nadir olarak görülen bir durumdur.(23)

2.8.Tanı:

Mantar enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında 1) mikrobiyolojik 2) immünolojik 3) histopatolojik olmak üzere üç temel yaklaşım vardır. Bunlara organizmanın moleküler ve biyokimyasal yöntemlerle saptanma ve tanımlama yöntemleri de eklenebilir.(4)

Tablo 3: Mantar hastalıklarının tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri (4)

Klasik mikrobiyolojik yöntemler Direkt mikroskopi (gram, giemsa ve kalkoflor beyazı boyamaları) Kültür İdentifikasyon Duyarlılık testi
Histopatolojik yöntemler Rutin boyalar(H&E) Özel boyalar (GMS, PAS, musikarmin) Direkt immünfloresans İn situ hibridizasyon
İmmünolojik yöntemler Antijen Antikor
Moleküler yöntemler Direkt saptama (nükleik asit saptama) İdentifikasyon Köken tiplendirme
Biyokimyasal yöntemler Metabolitler Hücre duvarı bileşenleri Enzimler

H&E: hematoksilin eozin GMS: gomori metenamin gümüş PAS: peiyodik asit-schiff

2.8.1.Direkt Mikroskobik İnceleme:

Doku kesitlerinin ve klinik örneklerin direkt mikroskobik olarak incelenmesi, mantar enfeksiyonlarının tanısında en hızlı ve en ekonomik yöntemlerden birisidir. Kültür sonuçları günlerce hatta haftalarca elde edilemezken, dokudaki mayaların veya hif yapılarının mikroskobik olarak saptanması bir saatten az bir sürede yapılabilir. Ancak direkt mikroskobide hem yalancı-negatif hem de yalancı-pozitif sonuçlar ortaya çıkabilir. Mikroskobinin duyarlılığı kültürden daha azdır ve negatif bulunan sonuçlar mantar enfeksiyonunu dışlamaz.(4)

Deri ve tırnak kazıntısı gibi sert örneklerden %15'lik potasyum hidroksit veya kalkoflor beyazı preparasyonu yapılır. Beyin Omurilik Sıvısı(BOS), idrar gibi sıvı örnekler 1500 devirde 10 dk. santrifüjlendikten sonra sedimentlerinden ve diğer

yumuşak örneklerden gram boyalı preparasyonlar yapılır. Preperatlarda tomurcuklanan hücreler ve pseudohifler aranır. *Candida* türleri tüm mantarlar gibi gram olumludur.(2)

2.8.2.Kültür:

Kültür, genel olarak mantar enfeksiyonlarının tanısında en duyarlı yöntem olarak kabul edilir. Çoğu zaman kültür, aynı zamanda etyolojik ajanların identifikasyonu için de gereklidir. Medikal olarak önemli tüm mantarları izole etmede tek bir kültür ortamı yeterli olmaz. Biri selektif diğeri selektif olmayan en az iki tipte besiyerinin kullanımı genel kabul görmektedir. Selektif olmayan besiyeri yavaş üreyen nazlı mantarların yanı sıra, hızlı üreyen mayaların ve küflerinde üremesine izin verecektir. Mantarlar, bakteriler için kullanılan besiyerlerinin çoğunda da ürerler; ancak üreme yavaş olabilir. Bu nedenle beyin kalp infüzyon(BHI) agar veya SABHI(Sabouraud dekstroze ve BHI) agar gibi daha zengin bir besiyeri önerilmektedir.(4)

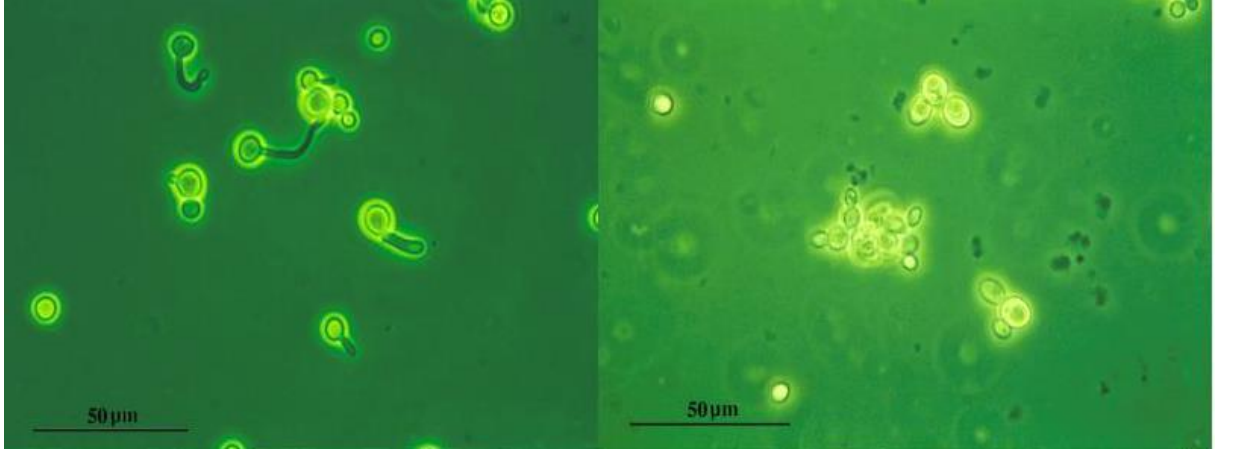
Candida türlerinin primer izolasyonunda en çok kullanılan besiyeri SDA'dır. Sikloheksimid, gentamisin, kloromfenikol gibi antimikrobikler, bakterilerin ve küflerin üremesini engellemek için besiyerlerinin içine ilave edilebilir. Kültür için alınan numuneler uygun besiyerine ekilerek hem 26°C hem de 37°C'de ayrı ayrı inkübe edilirler. Patojen olan mayalar genellikle 26°C ve 37°C'de 1-2 günde ürerler.(2)

2.8.3.İdentifikasyon:

Candida türlerinin tanımlanmasında, germ tüp testi, kromojenik besiyeri kullanımı, mısır unlu agardaki morfoloji, biyokimyasal/asimilasyon testleri, giderek artan sıklıkta kullanılan moleküler ve kütle spektrometre yöntemleri gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır.(23)

Germ tüp testi:

Germ tüp testi, *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan ilk yöntemlerden birisidir. Maya hücrelerinden direkt olarak oluşan ve kısa bir hif başlangıcı olan germ tüpler, septumlarında boğumlarının olmaması ile pseudohiflerden ayrılırlar. Klinik örnekten saptanan *C.albicans* ve *C.dubliniensis* izolatları serumda 37 C° de 2-3 saat inkübe edildiklerinde germ tüp oluşturmaktadırlar.(2)



Germ tüp pozitif

Germ tüp negatif

Şekil 1: germ tüp pozitif ve negatif örnekler (24)

Klamido spor oluşumu:

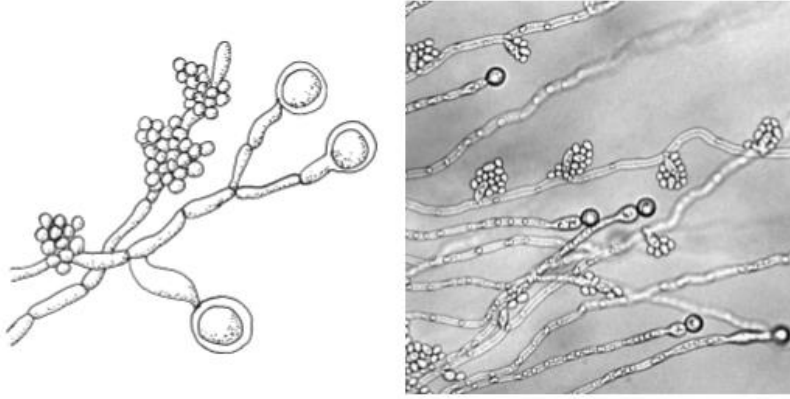
Mısırunlu jeloz gibi besince fakir bir ortam, maya hücrelerinin, iyi yedek besin depolayan klamidosporlar oluşturmaya yol açar. Bunlar oluşurken hifin veya yalancı hifin bir yerinde, sitoplazma yoğunlaşır, burası hifin çapından daha geniş olacak tarzda şişer ve duvarı kalınlaşır. Hiflerin içinde (ara klamidospor), kenarında (yan klamidospor) veya uçlarında (uç klamidospor) gelişebilen, büyük (8-12 m), yuvarlak ve kalın duvarlı bu oluşumlar, açlığa ve diğer değişik şartlara karşı canlılığını koruyabilecek bir uyum sağlarlar. (24)

Klamidosporlar *C. albicans*'ın en belirgin özelliğidir ve herhangi başka bir *Candida* türü tarafından nadiren meydana getirilir. Bu bakımdan *C. albicans* ile diğer kandidaların ayırdedilmesinde faydalı olurlar.

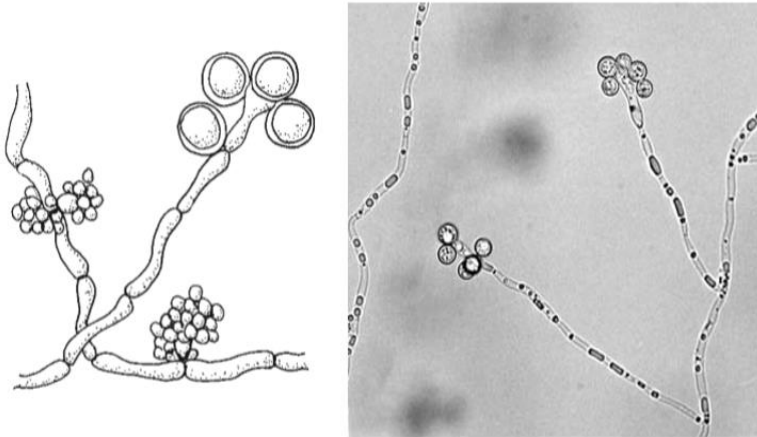
C. tropicalis'in de bazı kökenleri, özellikle de ilk ayrıldıkları sırada klamidosporlar yaparlar. Ancak bunlar *C. albicans*'a ait klamidosporlardan, bir destek hücrenin bulunmamasıyla farklılık gösterir ve daha sonra yapılan pasajlarda kaybolurlar. Buna karşılık klamidospor oluşumu *C. albicans*'da sabit bir olgudur. Ayrıca *C. tropicalis*'e ait klamidosporların biçimi gözyaşı damlasına benzer ve bunlar daha ufak çapta oluşurlar. (24)

Klamidospor üreten ve 1995'de ayrı bir *Candida* türü olarak kabul edilen *C. dubliniensis*'in klamidosporlarının diğerinkilerden farklı olması önemli bir fenotip özelliğidir. *C. albicans* genellikle gerçek veya psödohiflerin ucunda tek tek klamidosporlar üretir. Buna karşın *C. dubliniensis*'inkiler çok daha bol ve ekseri çiftler halinde veya üçlü hatta bazen psödohifin ucundaki aynı bir taşıyıcı hücreye yapışmış

kalın duvarlı birkaç klamidospordan oluşan kümeler veya salkımlar oluşturarak olağandışı düzen gösterirler.(24)



Şekil 2: *C.albicans* klamidospor(22)



Şekil 3: *C.dubliniensis* klamidospor(22)

Kromojenik besiyerleri:

Hızlı maya identifikasyonu amacıyla birçok kromojenik besiyeri geliştirilmiştir. Türe özgü kromojenik substratlar içeren bu besiyerlerinde mayalar ürettikleri enzimlerle reaksiyona girerek çeşitli renkte koloniler oluşturmaktadırlar. CHROMagar, kromojenik ayırım yapan bir kültür besiyeridir. Klinik önemi olan mayaların, özellikle *C.albicans* suşlarının izolasyonuna ve olası tanımlanmasına olanak sağlar. Özellikle karışık kültürlerde, koloni morfolojisi ve ayırt edici renk paternleri, maya türlerinin ayrımında kullanılmaktadır(23). *C.albicans* yeşil, *C.tropicalis* çelik mavi ve *C. krusei* toz pembe renkte koloniler oluşturmaktadırlar. (25)

Biyokimyasal testler:

Biyokimyasal testler mayalar için tiplendirmede kullanılan en temel testlerdir. Mayaların biyokimyasal özelliği fermentasyon veya asimilasyon testleri ile ortaya konulabilir. Karbonhidrat asimilasyon testinde, mayaların oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak çeşitli karbonhidratları kullanabilme özelliği değerlendirilir. Karbonhidrat fermentasyon testinde ise mayaların farklı karbonhidratları fermente ederek gaz oluşturup oluşturmadıkları araştırılır.

Üreaz testi, mayaların üreyi hidrolize edebilme yeteneği değerlendirilir. *Candida* türleri içerisinde hem üreaz pozitif hem de negatif türler bulunmaktadır. Ancak klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir. *C.krusei* üreaz pozitifdir.(2)

Piyasada, The API-20C AUX yeast identification system, the MicroScan Yeast Identification Panel (Beckman Coulter Inc., Brea, CA), The Yeast Biochemical Card (bioMérieux, Durham, NC), Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry(MALDI-TOF MS) gibi çok sayıda hazır ticari maya tanımlama kiti bulunmaktadır.(26)

Tablo 4:Bazı önemli *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleri (2)

	Glukoz	Maltoz	Sukroz	Trehaloz	Galaktoz	Sellobiyoz	Ksiloz	Rafinoz	Laktoz	Dulsiitol	Melibbiyoz	Üreaz	NO3-NO2
<i>C.albicans</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>C.parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.kefyr</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C.krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C.glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.8.4.Serolojik Testler:

Derin kandidoz kuşkusunda kandida antikor ve antijenini aramaya yönelik serolojik testler kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları sınırlı olduğundan dikkatle yorumlanmalıdır. Kandida hücre duvarında bulunan, yüksek

immunojenik ve immünomodülatör özellikler gösteren mannan(Mn) antijeninin tespiti invaziv kandidoz tanısında önemlidir. Ayrıca mannan polisakkaridinin oligomannoz epitoplarının hümmoral immün yanıtı indüklemesi nedeniyle anti-mannan antikor(anti-Mn) titrelerinin belirlenmesi de yol göstericidir. Hastaların yaklaşık %70’inde Mn ve anti-Mn testleri, kan kültürü pozitifleşmesinden 6-7 gün önce pozitif saptanmaktadır. Bu da fungeminin erken saptanması açısından önemlidir. Ancak anti-mn pozitifliği, kandida enfeksiyonlarının invazif ve yüzeysel formlarının ayırt edilmesinde yararlı değildir.(27)

2.8.5.Moleküler Testler:

İnvazif mantar hastalıklarının tanımlanmasında direkt mikroskopik inceleme ve kültür, standart konvansiyonel yöntemlerdir. Ancak gerek zaman alıcı olması gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri ve bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olmaları nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin giderek artan oranlarda uygulanması, bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adımdır.(28)

Mantar enfeksiyonlarının moleküler tanısı ya doğrudan hasta örneği ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilir. Mantarların tanımlanmasında en yaygın kullanılan iki DNA bölgesi, küçük ve büyük ribozomal alt üniteleri arasında yer alan türe özgül ‘internal transcribed spacer (ITS)’ ve büyük ribozomal alt ünitesinin (26S) D1/D2 bölgeleridir. Bu bölgeler tür düzeyinde farklılıklar gösteren yeterli zincir heterojenitesi içermektedir. Dolayısıyla mantarları tür düzeyinde tanımlamak ve olası mutasyonel değişiklikleri saptamak için daha uygundur. Mantarların genotiplendirme çalışmalarında, protein kodlayan intron bölgeler ve ribozomal DNA (rDNA) gibi protein kodlamayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılır.(28)

2.9.Antifungal Duyarlılık Testleri:

İnfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi, mikoloji alanındaki önemli ilerlemelerden biri olmuştur. Şu anda mevcut olan referans yöntemler, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından maya (CLSI, M27-A2) ve küfler (CLSI, M38-A) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, CLSI

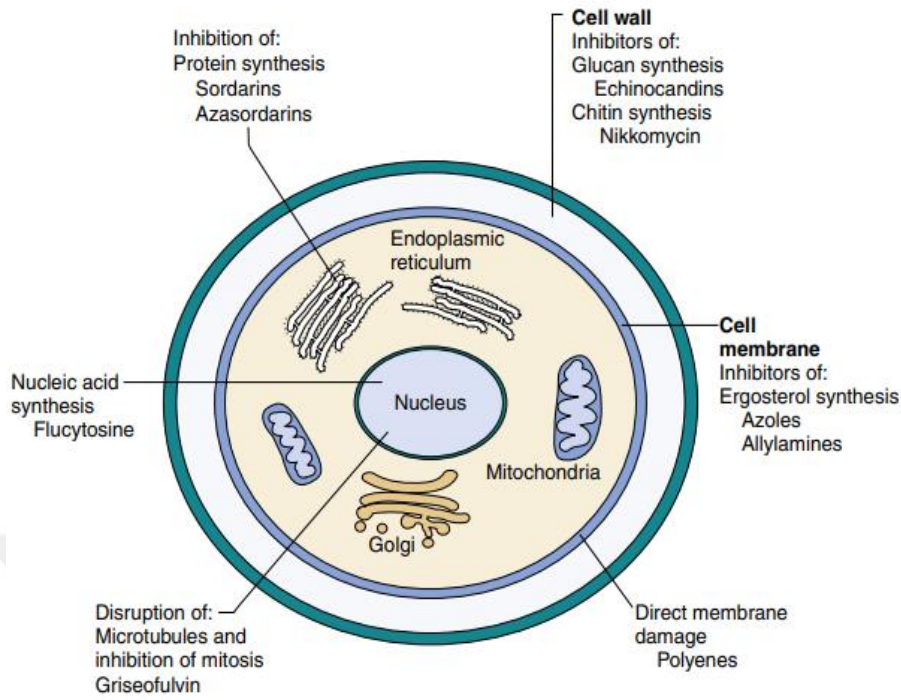
tarafından *Candida* türleri (flukonazol, vorikonazol) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir (EUCAST E.Dis 7.1).Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin, uzun sürede sonuç verme ve bazı *Candida* suşları ve azoller için MİK sonuçlarının okunmasının zor olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. (29)

Mevcut olan bu güncel sorunlar ışığında, antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar, bu sorunları en aza indirgeyecek, hızlı ve/veya pratik yöntem arayışlarına ve bu alandaki çalışmalara odaklanmıştır. Bu konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalar, E test ve ticari olarak mevcut olan kolorimetrik bir sistem olan “Sensititre Yeast One”ı (TREK Diagnostic Systems) referans yöntem ile karşılaştırmayı hedeflemiştir. Bu çalışmaların sonuçları, referans yöntem ile bu yöntemler arasındaki uyum oranlarının genelde iyi düzeyde olduğunu göstermekle birlikte, özellikle *C. glabrata* gibi flukonazole azalmış duyarlılık ya da direnç saptanan ve MİK değeri sınır değerlere yakın olabilen türlere ait suşlarda uyum oranlarının düşük düzeylerde olabileceğine işaret etmektedir.(29)

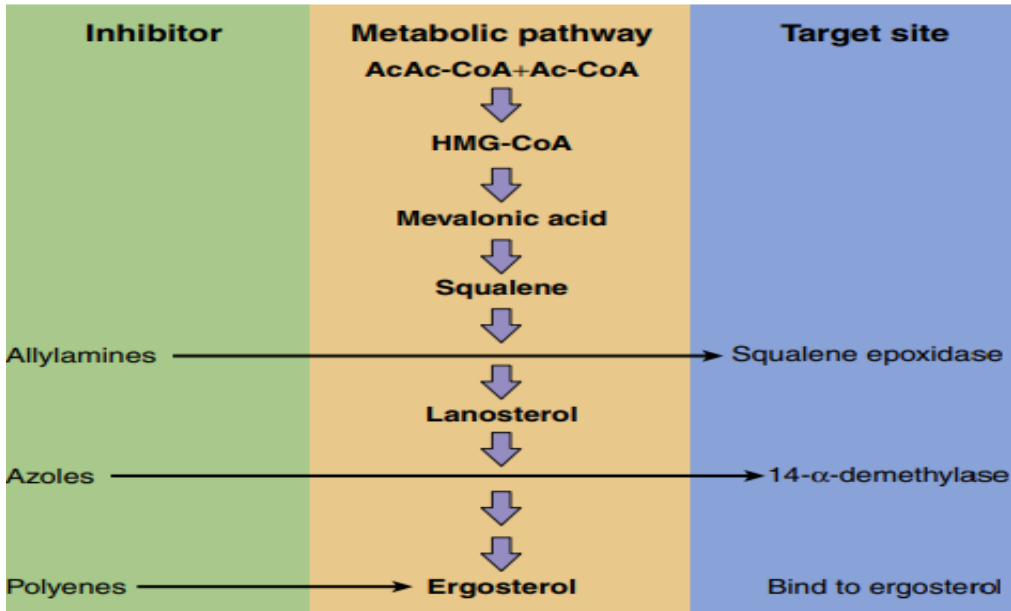
2.10.Antifungal İlaçlar:

Mikotik enfeksiyonları tedavi etmekte kullanılabilen sınırlı, fakat artan sayıda antibiyotik vardır. Çoğunun ciddi yan etki, dar antifungal spektrum, dokulara kötü penetrasyon ve dirençli mantarları seçme gibi bir ya da daha fazla olumsuzlukları vardır. Mantarlar insan hücreleri gibi ökaryot olduğundan uygun antifungal hedefi bulmak zor olmaktadır. Çoğu hücresel ve moleküler olaylar benzerdir ve hatta genler ve proteinler arasında oldukça fazla homoloji vardır.(7)

Halen kullanılmakta olan ilaçlardan polienler hücre zarı ergosterolüne bağlanırlar. Flusitozin primidin sentezini, azoller ve alliaminler ergosterol sentezini ve ekinokandinler hücre duvarı b-glukan sentezinin inhibe ederken griseofulvin mikrotübüler yapıyı bozar.(7)



Şekil 4: Antifungallerin ilaçların etki yerleri (4)



Şekil 5: Alilamin, azol ve polien antifungallerinin inhibisyon bölgelerini gösteren, ergosterol sentezi için metabolik pathway. Ac-CoA, Asetil-koenzim A; HMG-CoA, hidroksimetil glutaril-koenzim A. (4)

2.10.1.Polienler Grubu Antifungaller:

Polien makrolid antifungal ajanları, çoğu çoklu, konjuge, çift bağlı ve bir ila üç halkalı yapılar içeren bir grup karmaşık organik molekülden oluşur. Bu grup, amfoterisin B, amfoterisin B'nin koloidal ve lipozomal preparatları, nistatin gibi en yaygın kullanılan antifungal ajanları içerir.(26)

Amfoterisin B:

Amfoterisin B, aktinomicet *Streptomyces nodosus* tarafından üretilir.(26) Amfoterisin B (ve lipid formülasyonları), antifungal etkisini en az iki farklı mekanizma ile gösterir. Birincil mekanizma, amfoterisin B'nin mantarların temel membran sterolü olan ergosterole bağlanmasını içerir. Bu bağlanma, mantar hücre zarının ozmotik bütünlüğünü bozan ve hücre içi bileşenlerin sızmasına ve hücre ölümüne yol açan iyon kanallarını üretir Amfoterisin B ayrıca memeli hücrelerinin ana zar sterolü olan kolesterole de bağlanır, ancak bunu ergosterole göre daha az avidite ile yapar. Amfoterisin B'nin kolesterole bağlanması, amfoterisin B insanlara uygulandığında gözlemlenen toksisitenin çoğunu oluşturur. Amfoterisin B'nin ilave bir etki mekanizması, amfoterisin B'nin kendisinin oksidasyonu ile tetiklenen bir oksidatif reaksiyonlar zincirinin oluşmasından kaynaklanan doğrudan zar hasarını içerir. Bu süreç, toksik serbest radikal oluşumu yoluyla amfoterisin B'nin hızlı fungisidal aktivitesine önemli bir katkıda bulunabilir.(4)

Amfoterisin B'nin etki spektrumu geniştir ve çoğu *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Mucormycetes* ve endemik dimorfik patojenleri (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* ve *Paracoccidioides*) içerir. (4)

Amfoterisin B'nin klinik endikasyonları arasında invaziv kandidiyazis, kriptokokoz, aspergilloz, mukormikoz, blastomikoz, koksidioidomikoz, histoplazmoz, parakoksidioidomikoz, talaromikoz ve sporotrikoz bulunur. Amfoterisin B'nin lipid formülasyonları, geliştirilmiş bir etkinlik-toksisite profili sunar ve öncelikle geleneksel amfoterisin B'de başarısız olan veya böbrek fonksiyon bozukluğu olan kişilerde mantar enfeksiyonlarının tedavisi için önerilir.(4)

Amfoterisin B'nin ana yan etkileri nefrotoksisitenin yanı sıra ateş, titreme, kas ağrısı, hipotansiyon ve bronkospazm gibi infüzyonla ilişkili yan etkileri içerir. (4)

Amfoterisin B'nin lipit formülasyonlarının en büyük avantajı, özellikle nefrotoksisite olmak üzere önemli ölçüde azaltılmış yan etkilerdir. Lipid formülasyonları, etkinlik açısından geleneksel amfoterisin B'den üstün değildir ve çok daha pahalıdır.(4)

Nistatin:

Nistatin, *Streptomyces noursei* tarafından üretilen bir antifungaldir. Gastrointestinal sistemden emilmez. Esas olarak, lokal olarak oral veya vulvovajinal kandidiyazı tedavi etmek için kullanılır. Bu ilacın toksisitesi, parenteral kullanımı engellemektedir.(26)

Griseofulvin:

Griseofulvin, dermatofitlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan oral bir ajandır. Mantar hücresi içindeki mikrotübüllerle etkileşim yoluyla mantar büyümesini ve mitozun bölünmeyi engeller. Griseofulvin, dermatofitozların tedavisinde ikinci basamak bir ajan olarak kabul edilir. İtrakonazol ve terbinafin gibi daha yeni ajanlar daha hızlı etki gösterir ve daha fazla etkinlik sağlar. Griseofulvin ayrıca mide bulantısı, ishal, baş ağrısı, hepatotoksisite, döküntü ve nörolojik yan etkiler dahil olmak üzere bir dizi hafif yan etki ile ilişkilidir.(4)

2.10.2.Azol Grubu Antifungaller:

Azol sınıfı antifungaller yapı açısından imidazoller (azol halkasında iki nitrojen) ve triazoller (azol halkasında üç nitrojen) olarak ayrılır. İmidazoller arasında sadece ketokonazol sistemik aktiviteye sahiptir. Triazollerin tümü sistemik aktiviteye sahiptir ve flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve isavukonazol içerir. Hem imidazoller hem de triazoller, sitokrom P450'ye bağımlı enzim lanosterol 14-a-demetilazı inhibe ederek etki eder. Bu enzim lanosterol'un ergosterole dönüşümünü inhibe eder ve mantar hücresinin membran sentezini bozar.(4)

Organizmaya ve azole türüne bağlı olarak ergosterol sentezinin inhibisyonu, fungal hücre büyümesinin inhibisyonu (fungistatik) veya hücre ölümü (fungisidal) ile sonuçlanır. Genellikle azoller, *Candida spp.* ve *C.neoformans* gibi maya benzeri mantarlara karşı fungistatik aktivite gösterirler. Bununla birlikte, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve isavukonazol, *Aspergillus spp.*'ye karşı fungisidal etki göstermektedir.(4)

Ketokonazol:

Ketokonazol, imidazol sınıfı antifungal ajanların oral olarak emilen, lipofilik bir üyesidir. Etki spektrumu, endemik dimorfik patojenler, *Candida spp.* *C. neoformans* ve *Malassezia spp.*'yi içerir, ancak genellikle triazol antifungal ajanlardan daha az aktiftir. Ketokonazolün oral uygulama yoluyla absorpsiyonu düzensizdir ve asit gastrik pH gerektirir. Lipofilitesi, yağlı dokulara ve pürülan eksüdalara nüfuz ve konsantrasyon sağlar; ancak yüksek oranda (>% 99) proteine bağlandığından, merkezi sinir sistemine zayıf bir şekilde nüfuz eder. Ketokonazol, mide ve karaciğer toksisitesi, mide bulantısı, kusma ve döküntü gibi ciddi yan etkilere neden olabilir.(4)

Flukonazol:

Flukonazol, mükemmel oral biyoyararlanımı ve düşük toksisitesi olan birinci nesil bir triazoldür. Flukonazol yaygın olarak kullanılmaktadır ve çoğu *Candida* türlerine, *C. neoformans*, *dermatophytes*, *Trichosporon spp.* *H.capsulatum*, *C.immitis* ve *P.brasiliensis* türlerine karşı etkilidir. *Candida* türleri arasında *C.auris*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii* ve *C.rugosa* ile azalmış duyarlılık görülür. *C.krusei* ve *C.auris*'in flukonazole doğal olarak dirençli olduğu düşünülürken, *C.glabrata* enfeksiyonları yüksek dozlarda (örn., 800 mg / gün) flukonazol ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir. Flukonazol, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* ve *Mucormycetes* dahil fırsatçı küflere karşı aktif değildir.(4)

Flukonazol suda çözünür ve oral veya intravenöz olarak uygulanabilir. Protein bağlanması düşüktür ve merkezi sinir sistemi dahil tüm organ ve dokulara dağılır. Eksfoliyatif dermatit veya karaciğer yetmezliği gibi ciddi yan etkiler nadirdir. Kandidemi ve mukozal kandidiyazis için birincil tedavi olarak ve seçilmiş yüksek riskli popülasyonlarda profilaksi olarak kullanılır.(4)

İtrakonazol:

İtrakonazol, oral yoldan kapsül veya çözelti halinde uygulanabilen lipofilik bir triazoldür. İtrakonazol, *Candida spp.* *C.neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Dermatofitler*, *Sporothrix schenckii* ve endemik dimorfik patojenler dahil olmak üzere geniş bir antifungal aktivite spektrumuna sahiptir. İtrakonazol, flukonazole dirençli *C.glabrata* ve *C.krusei* suşlarının tümüne olmasa da bazılarına karşı aktiviteye sahiptir. (4)

Ketokonazolde olduğu gibi, itrakonazolün oral emilimi düzensizdir ve asit gastrik pH gerektirir. Açlık durumunda verildiğinde oral çözelti ile absorpsiyon artırılır. İtrakonazol, yüksek oranda proteine bağlıdır ve maya benzeri mantarlara karşı

fungistatik aktivite ve *Aspergillus spp.*'ye karşı fungisidal aktivite gösterir. Kandidiyazın kutanöz ve mukozal formlarının tedavisinde faydalı olmasına rağmen, hematojen kandidiyazın tedavisinde itrakonazolün etkililiği yeterince değerlendirilmemiştir. (4)

Flukonazolün aksine, ilaç etkileşimleri itrakonazol de yaygındır. Şiddetli hepatotoksisite nadirdir ve gastrointestinal intolerans, hipokalemi, ödem, döküntü ve yüksek transaminazlar gibi diğer yan etkiler seyrek olarak ortaya çıkar.(4)

Vorikonazol:

Vorikonazol, *Candida spp*, *C. neoformans*, *Trichosporon spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, esmer mantarlar ve endemik dimorfik patojenlere karşı aktiviteye sahip geniş spektrumlu bir triazoldür. *Candida* türleri arasında *C.krusei* vorikonazol duyarlıdır. Flukonazole karşı duyarlılığı azalmış *C.albicans* ve *C.glabrata* suşlarının bazıları da vorikonazole duyarlıdır. (4)

Vorikonazol'un hem oral hem de IV formülasyonları mevcuttur. Merkezi sinir sistemine ve diğer dokulara mükemmel bir şekilde nüfuz eder. Vorikonazol, maya benzeri mantarlara karşı fungistatik etki gösterir ve *Aspergillus spp.*'ye karşı fungisidaldir. Vorikonazol genellikle iyi tolere edilir, ancak hastaların yaklaşık üçte biri geçici görme bozuklukları yaşar. Diğer yan etkiler arasında karaciğer enzim anormallikleri, deri reaksiyonları ve halüsinasyonlar veya konfüzyon bulunur.(4)

Posakonazol:

Posakonazol, *Aspergillus* ve *Mucormycetes* dahil olmak üzere *Candida*, *Cryptococcus*, dimorfik mantarlar ve filamentli mantarlara karşı güçlü aktivite gösterir. Posakonazol, oral süspansiyon, İntra Venöz(IV)formülasyonu ve tablet olarak mevcuttur. Emilimi gıda alımıyla artar ve en çok emilim yağlı öğünlerde görülür.(4)

Posakonazol, maya benzeri mantarlara karşı fungistatik aktivite gösterir ve *Aspergillus spp.*'ye karşı fungisidaldir. Posakonazol, graft-versus-host hastalığı (GVHD) olan hematopoietik kök hücre nakli (HSCT) alıcılarında ve hematolojik maligniteli ve uzamış nötropenili hastalarda invazif mantar enfeksiyonu profilaksisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi onayına sahiptir. (4)

En yaygın yan etkiler hafiftir ve mide-bağırsak şikayetleri, rash, yüz kızarması, ağız kuruluğu ve baş ağrısını içerir. Diğer azollerde olduğu gibi, hepatik toksisite tarif edilmiştir ve posakonazol ile tedavi öncesinde ve sırasında karaciğer fonksiyon

testlerinin izlenmesi önerilmektedir. Hepatik P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilen diğer ilaçlarla etkileşimler yaygındır.(4)

Isavukonazol:

İsavukonazol, oral veya intravenöz olarak uygulanabilen suda çözünür bir triazol antifungal ajandır. Kandidemi ve invazif kandidiyazın tedavisi, invazif aspergilloz tedavisi ve nadir küf enfeksiyonlarının tedavisi için klinik deneyleri tamamlamıştır. Isavuconazole, *Candida spp* ve diğer maya türleri ve *Aspergillus spp.*'ye karşı iyi in vitro aktivite göstermiştir. *A.niger* dışında ve invazif aspergilloz ve invazif mukormikoz tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır.(4)

2.10.3.Ekinokandinler:

Ekinokandinler, mantar hücre duvarının önemli bileşenleri olan 1,3- β -glukanların sentezini inhibe eden yeni, oldukça seçici, yarı sentetik lipopeptid antifungallerdir. Memeli hücreleri 1,3-b-glukan içermediğinden, bu grup, mantarlar için toksisitesi açısından seçicidir. Glukanlar, hücre bölünmesinde ve hücre büyümesinde de önemlidir. Glukan sentez enzim kompleksinin inhibisyonu, *Candida spp.*'ye karşı fungisidal, *Aspergillus spp.*'ye karşı fungistatik aktivite ile sonuçlanır. Günümüzde, çeşitli mikozların tedavisinde veya önlenmesinde kullanım için onaylanmış üç ekinokandin (anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin) bulunmaktadır.(4)

Ekinokandinlerin etki spektrumu, hücre duvarında baskın 1,3-b-glukan bulunan mantarlarla sınırlıdır. Bu nedenle *Candida spp* ve *Aspergillus spp.*'ye karşı aktiftirler. Esmer mantarlara ve endemik dimorfik patojenlere karşı değişken aktiviteye sahiptir. *C. neoformans*, *Trichosporon spp*, *Fusarium spp* ve *Mucormycetes* karşı etkili değildirler. *Candida spp.*'nin flukonazole dirençli suşlarına karşı mükemmel aktiviteye sahiptir. Ekinokandinler, intravenöz olarak uygulanır ve yüksek oranda (>%95) proteine bağlanırlar. Beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyonları düşük olmasına rağmen, tüm ana organlara dağılırlar. Tüm ekinokandinler çok iyi tolere edilir ve çok az ilaç-ilaç etkileşimi vardır.(4)

Kaspofungin, kandidemi dahil invaziv kandidiyazisin tedavisi ve diğer antifungal ilaçlara dirençli veya tolere edemeyen invazif aspergillozlu hastaların tedavisi için kullanılmaktadır. Anidulafungin, özofagus kandidiyazisi ve kandidemi

tedavisi için ve mikafungin, özofagus kandidiyazı ve kandidemi tedavisi ve invaziv kandidiyazın önlenmesi için kullanılmaktadır.(4)

2.10.4.Antimetabolit Etkili Antifungaller:

Flusitozin, antimetabolit olarak işlev gören mevcut tek antifungal ajandır. Mantar hücresindeki DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlerin sentezine etkileyerek antifungal aktivite gösteren florlanmış bir pirimidin analogudur. Flusitozin, mantar hücresine sitozin permeaz yoluyla girer ve sitoplazmada 5-florourasile (5-FU) deamine edilir. 5-FU, 5-floroüridik aside dönüştürülür ve daha sonra RNA sentezinde urasil ile rekabet eder, sonuçta RNA yanlış kodlaması, DNA ve protein sentezinin inhibisyonu gerçekleşir.(4)

Flusitozinin antifungal spektrumu *Candida spp.*, *C. neoformans*, *Rhodotorula spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* ile sınırlıdır. Flusitozin monoterapisi sırasında *Candida spp* ve *C. neoformans* arasında direnç gelişebilir.(4)

Flusitozin suda çözünür ve oral yoldan uygulandığında mükemmel biyoyararlanıma sahiptir. Serum, beyin omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir. Flusitozin serum konsantrasyonları 100 µg / ml'yi aştığında kemik iliği supresyonu, hepatotoksisite ve gastrointestinal intoleransı gibi belirtiler görülebilir. Flusitozin direnç gelişimi nedeniyle monoterapi olarak kullanılmaz. Flusitozinin amfoterisin B veya flukonazol ile kombinasyonlarının hem kriptokokoz hem de kandidiyazın tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir.(4)

2.10.5.Alliaminler:

Alilamin sınıfı antifungal ajanlar, sistemik aktiviteye sahip olan terbinafini ve topikal bir ajan olan naftifini içerir. Bu ajanlar, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek, ergosterolde bir azalmaya ve mantar hücre membranı içinde skualende bir artışa neden olur. Terbinafin, dermatofitler, *Candida* türleri, *Malassezia* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* türleri, *Aspergillus* türleri, *Sporothrix schenckii* ve *Penicillium marneffe*i içeren geniş bir etki spektrumuna sahiptir. (4)

Lipofilik bir antifungal ajandır. Oral ve topikal formülasyonlarda bulunur ve yağlı dokularda, ciltte, saçta ve tırnaklarda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Terbinafin, onikomikoz dahil hemen hemen tüm dermatomikoz formlarının tedavisinde etkilidir ve çok az yan etki sergiler. Flukonazole dirençli *Candida*

türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda flukonazol ile birlikte kullanıldığında için umut vaat etmektedir.(4)

2.11.Antifungal Direnç Mekanizmaları:

İnvazif mikozların en sık etkeni olan *Candida* türleri, antifungal ilaçlara direnç mekanizmalarının anlaşılmasında büyük role sahiptir. Antibakteriyel maddelere direnç mekanizmalarının aksine, mantarların, direnç kazanmanın bir yolu olarak antifungal ilaçları yok edebildiğine veya değiştirebildiğine dair hiçbir kanıt yoktur; benzer şekilde, antifungal direnç genleri, birçok bakteriyel direnç geninde olduğu gibi hücreden hücreye aktarılamaz. Bununla birlikte, çok ilaçlı dışa akım pompalarının, hedef değişikliklerinin ve ilaç hedeflerine erişimin azalmasının, tıpkı antibakteriyel direnç için olduğu gibi, antifungal ajanlara direnç için önemli mekanizmalardır. Bakterilerde ortaya çıkan yüksek düzeyli çoklu ilaç direncinin hızla ortaya çıkması ve yayılmasının aksine, antifungal direnç genellikle yavaş gelişir ve intrinsik dirençli türlerin ortaya çıkmasını veya önceden maruz kalınan bir ilaca dirençle sonuçlanan hücresel yapıların veya işlevlerin aşamalı, adım adım değişmesini içerir.(4)

Candida türlerinin ve *C.neoformans*'ın amfoterisin B'ye dirençli mutantları azalmış bir ergosterol içeriğine sahip olduğu, polien bağlayıcı sterollerin (ergosterol) polienleri daha az bağlayanlar (fecosterol) ile değiştirildiği veya hücre zarlarında ergosterolün maskelendiği, böylece polienlerin bağlanmasının engellendiği gösterilmiştir. Amfoterisin B direncinin moleküler mekanizması belirlenmemiştir; ancak dirençli *Candida* türlerinin ve *C. neoformans*'ın sterol analizi sonucunda C-8 sterol izomerazı, C-5 sterol desatüراز enzimlerini ve C-24 sterol metiltransferazı kodlayan sırasıyla *ERG2*, *ERG3* veya *ERG6* genlerinde kusur bulunmuştur.(4)

Mantar enfeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesi için azollerin, özellikle flukonazolün çok sık kullanılması, bu sınıftan antifungal ajanlara karşı direncin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan çoğu *Candida* türü arasında flukonazole primer direnç nadirdir. Enfekte hastaların (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) kanından izole edilen en yaygın beş *Candida* türü arasında, yalnızca *C. krusei* flukonazole doğal olarak dirençli kabul edilir. Kalan türler arasında, *C. glabrata*'nın yaklaşık %10'u ve *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in % 2'sinden azı flukonazole primer dirençlidir. Yeni

triazoller (vorikonazol, posakonazol ve izavukonazol), *Candida spp.*'ye karşı flukonazolden daha etkilidir. (4)

Candida türlerinde azol direnci, hedef enzimlerin miktarında veya kalitesinde bir değişiklik, ilacın hedefe ulaşımının azalması veya bu mekanizmaların bazı kombinasyonları ile meydana gelir. Bu nedenle, hedef enzim lanosterol 14-a-demetilazı kodlayan gendeki (*ERG11*) nokta mutasyonları, azollere afinitesi azalmış, değiştirilmiş bir hedefe yol açar. *ERG11*'in aşırı ekspresyonu, hedef enzimin aşırı üretimine neden olarak, tüm hedef enzim moleküllerini inaktive etmek için hücre içinde daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmasına neden olur.(4) Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset ailesinden *Cdr1p* ve *Cdr2p* ile majör kolaylaştırıcı süper ailesinden (major facilitator superfamily) *Mdr1p* olmak üzere iki gruptur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ilaç atımında rol oynayan hücre membranı ile ilişkili taşıyıcıları kodlamaktadır. *MDR1* flukonazole, *CDR1* ve *CDR2* ise flukonazol, ketokonazol, itrakonazol gibi farklı azollere ve terbinafin, amorolfın gibi diğer bazı ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır.(3)

Kaspofungin, anidulafungin ve mikafunginin tümü, azole dirençli suşlar dahil olmak üzere *Candida* türlerine karşı güçlü fungisidal aktivite gösterir. Ekinokandinlere duyarlılığı azalmış *Candida* izolatları yaygın değildir, ancak bu ajanlarla uzun süreli tedavi gören hastalar arasında giderek daha fazla görülmektedir. Ekinokandinlere direnç, glukan sentez enzim kompleksinde değişiklik ve böylece ilacın hedef enzimi inhibe edememesi sonucu gelişmektedir. Glukan sentez enzim kompleksinin katalitik subüniti olan internal membran proteinlerini (*Fks1p*, *Fks2p*) kodlayan *fks1* ve *fks2*'de nokta mutasyonları olması ekinokandin direncine neden olur. *Fks* mutasyonu, tüm ekinokandinlere dirençli, ancak polien ve azol antifungal ajanlara duyarlılığı koruyan suşlarla sonuçlanır.(4)

Flusitozin direnci, ilaç alımının azalması (permeaz aktivitesinin kaybı) nedeniyle veya flusitozini 5-FU (sitozin deaminaz) ve 5-floroüridik aside (FUMP pirofosforilaz) dönüştürmek için gerekli enzimatik aktivite kaybı nedeniyle gelişebilir. Pirimidin kurtarma yolundaki diğer bir enzim olan urasil fosforibosiltransferaz da FUMP (5-florourasilmonofosfat) oluşumunda önemlidir ve flusitozine direncinde aktivite kaybı olmaktadır.(4)

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1.İzolatların Toplanması ve Saklanması

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ekim 2019-Nisan 2021 tarihleri arasında kan kültüründen izole edilen *Candida* suşları çalışmaya dahil edildi ve çalışma gününe kadar stok süt besiyerinde (Conda, İspanya) -80 C° bekletildi.

3.2.Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri:

3.2.1.İzolatların canlandırılması:

Kan kültüründen izole edilen ve çalışma gününe kadar -80 °C'de saklanan stok *Candida* kültürleri 37 °C' lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (LabM, Neogen) pasajlandı. Pasajlanan besiyerleri 37 °C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Üremesi zayıf olan ya da olmayan besiyerlerinin inkübasyonu 48 saate uzatıldı. Üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı ve maya olarak boyanan suşlarda tür düzeyinde tanımlamaya geçildi.

3.2.2. *Candida* İzolatlarının Tanımlanması:

Germ tüp testi:

Test edilecek olan maya kolonisinden öze ile bir miktar alıp 2 ml insan serumu içerisinde bir süspansiyon hazırlandı. 37 °C 'de maksimum 3 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Işık mikroskopunda 40X'lık objektifte lam-lamel arasında bir damla süspansiyon koyarak değerlendirildi. Maya hücrelerinden direkt olarak oluşan ve kısa bir hif başlangıcı olan germ tüplerin varlığı araştırıldı. Germ tüp oluşturan maya hücreleri *Candida albicans* olarak tanımlandı.

Mısır unu-Tween 80 Agar Besiyerinde mikroskopik Görünümün incelenmesi:

Mısır un-tween 80 agar (HIMEDIA, Hindistan) besiyerine öze 45 derecelik açı ile tutularak, 1 cm aralıklarla, birbirine paralel üç çizgi şeklinde ekim yapıldı. Agar yüzeyine, inokülasyon çizgilerini kaplayacak şekilde bir lamel kapatıldı. Plaklar 30C° 'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lamel üzerinden ışık mikroskopunda 10X ve 40X objektifte incelendi.(23)

Klamidospor, psödohif ve psödohif boyunca eşit olarak dağılmış blastokonidya varlığı *Candida albicans* olarak, psödohif oluşumunun gözlenmemesi *Candida glabrata* olarak, psödohifin daraldığı noktadan doğan ve psödohif boyunca tek tek veya küçük düzensiz kümeler şeklinde blastokonidyaların görülmesi *Candida tropicalis* olarak, çalı görünümüne benzeyen, ekim çizgilerine bitişik, çok sayıda fokal alanı olan satellit üreme paterninin gözlenmesi *Candida parapsilosis* olarak değerlendirilmiştir. (23)

YST8 Diagnostics paneli ile tanımlama (Diagnostics, Slovenya):

Maya inokulumu hazırlamak için 37°C’ de 48 saat inkübe edilmiş SDA da büyümüş maya kolonileri kullanıldı. Maya kolonileri %0,85’lik salin solüsyonu içerisine inoküle edildi. Colorimeter standard (bioMerieux, Fransa) cihazı kullanılarak McFarland 3-5 olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. YST8 diagnostics panelindeki kuyucuklara 0,1 ml eklendi. URE, SUC, TRE, RAF kuyucuklarına 2-3 damla parafin yağı damlatıldı. Panel buharlaşmayı önlemek için ağzı kilitli poşete konuldu. 30 °C’ de 24 saat inkübe edildi. Oluşan renk değişiklikleri değerlendirildi ve not edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra BGL kuyucuğuna PHE reaktifi damlatıldı ve oluşan renk değişikliği not edildi. YST8 tanımlama tablosu kullanılarak *Candida* türleri isimlendirildi.

Germ tüp testi, Mısır un-tween 80 agar besiyerindeki mikroskopik görünüm ve YST8 diagnostics panel sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis* olarak tanımlanan suşlara antifungal duyarlılık testi yapıldı.

3.3. Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi:

Çalışmaya dahil edilen *Candida* suşlarının antifungal duyarlılıkları E-test yöntemi kullanılarak belirlendi. Saf maya kolonileri steril serum fizyolojik içinde colorimeter standard (bioMerieux, Fransa) cihazı kullanılarak McFarland 0,5 olacak şekilde süspansiyon ayarlandı. Bu süspansiyon, 90 mm’lik petri kutularında hazırlanmış olan RPMI 1640 besiyerine (HIMEDIA, Hindistan) pamuk uçlu steril eküvyon çubuklar yardımıyla dört yöne yayıldı. Her petri kutusuna steril bir pens yardımıyla ikişer adet E-test stribi yerleştirildi. Plaklar 35 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon elipsleri değerlendirildi. Amfoterisin B için üremenin tam inhibe olduğu değer, azol grubu antifungaller ve ekinokandinler için

üremenin %80 inhibe olduğu değerler MİK kabul edildi. Çalışmada kullanılan E-test stripleri, içerikleri ve markaları Tablo 5’ de gösterilmiştir.

Tablo 5:Çalışmada kullanılan E-Test stripleri, içerikleri ve markaları

Amfoterisin B	0.002-32 µg/ml	Himedia
Flukonazol	0.016-256 µg/ml	Himedia
Posakonazol	0.002-32 µg/ml	Himedia
Vorikonazol	0.002-32 µg/ml	Himedia
Kaspofungin	0.002-32 µg/ml	Himedia
Mikafungin	0.002-32 µg/ml	Himedia

Flukonazol, vorikonazol, kaspo­fungin, mikafungin için elde edilen MİK değerleri CLSI M27A S4 klinik sınır değerleri kullanılarak yorumlandı. Suşlar MİK değerlerine göre S (susceptible=duyarlı), S-DD (Susceptible-dose dependent= Doza Bağımlı Duyarlı), I (Intermediate=Orta Derecede Duyarlı) ve R (Resistant= Dirençli) olarak sınıflandırıldı.(30) Tüm *Candida* suşlarının Amfoterisin B ve posakonazol; *C.glabrata* suşlarının vorikonazol için elde edilen MİK değerleri CLSI epidemiyolojik eşik değerlerine göre yorumlandı. Vahşi tip (WT, Wild type) ve vahşi olmayan tip (non-WT, non wild type) olarak sınıflandırıldı.(31)

Tablo 6: *C.albicans* için kullanılan antifungal sınır MİK değerleri(31,32)

<i>Candida</i> türü	Antifungal	Epidemiyolojik eşikdeğer (µg/ml)		Sınır değerleri (µg/ml)			
		WT	non-WT	S	I	S-DD	R
<i>C.albicans</i>	Amfoterin B	≤2	>2	≤2			>2
	Flukonazol			≤2		4	≥8
	Posakonazol	≤0,06	>0,06				
	Vorikonazol			≤0,12	0,25-0,5		≥1
	Kaspofungin			≤0.25	0.5		≥1
	Mikafungin			≤0.25	0.5		≥1

Tablo 7: *C.glabrata* için kullanılan antifungal sınır MIK değerleri(31,32)

<i>Candida Türü</i>	Antifungal	Epidemiyolojik eşik değer($\mu\text{g/ml}$)		Klinik Sınır değerleri ($\mu\text{g/ml}$)			
		WT	non-WT	S	I	S-DD	R
<i>C.glabrata</i>	Amfoterin B	≤ 2	> 2				
	Flukonazol					≤ 32	≥ 64
	Posakonazol	≤ 2	> 2				
	Vorikonazol	$\leq 0,5$	$> 0,5$				
	Kaspofungin			≤ 0.12	0.25		≥ 0.5
	Mikafungin			≤ 0.006	0.12		≥ 0.25

Tablo 8: *C.parapsilosis* için kullanılan antifungal sınır MIK değerleri(31,32)

<i>Candida Türü</i>	Antifungal	Epidemiyolojik eşik değer($\mu\text{g/ml}$)		Klinik Sınır değerleri ($\mu\text{g/ml}$)			
		WT	non-WT	S	I	S-DD	R
<i>C.parapsilosis</i>	Amfoterin B	≤ 2	> 2				
	Flukonazol			≤ 2		4	≥ 8
	Posakonazol	$\leq 0,12$	$> 0,12$				
	Vorikonazol			$\leq 0,12$	0,25-0,5		≥ 1
	Kaspofungin			≤ 2	4		≥ 8
	Mikafungin			≤ 2	4		≥ 8

Tablo 9: *C.tropicalis* için kullanılan antifungal sınır MIK değerleri(31,32)

<i>Candida</i> Türü	Antifungal	Epidemiyolojik eşik değer($\mu\text{g/ml}$)		Klinik Sınır değerleri($\mu\text{g/ml}$)			
		WT	non-WT	S	I	S-DD	R
<i>C.tropicalis</i>	Amfoterin B	≤ 2	> 2				
	Flukonazol			≤ 2		4	≥ 8
	Posakonazol	$\leq 0,12$	$> 0,12$				
	Vorikonazol			$\leq 0,12$	0,25-0,5		≥ 1
	Kaspofungin			≤ 0.25	0.5		≥ 1
	Mikafungin			≤ 0.25	0.5		≥ 1

3.4. Quantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-

PZT)

Antifungal duyarlılık testine dahil ettiğimiz 41 *C.albicans*, 22 *C.parapsilosis*, 14 *C.glabrata* ve 13 *C.tropicalis* suşlarının flukonazol duyarlılık sonuçları değerlendirildi. Flukonazol dirençli, orta duyarlı ve doza bağımlı duyarlı (S-DD) olan suşlarda flukonazol direnç mekanizmalarının moleküler olarak araştırılması amaçlandı. Moleküler testlere 14 *Candida glabrata*, 10 *Candida parapsilosis* ve 1 *Candida albicans* suşu dahil edilmiştir. *Candida tropicalis* suşlarında hiç flukonazol dirençli, orta duyarlı yada S-DD suş saptanmadığı için moleküler testlere dahil edilmemiştir.

Tablo 10: Moleküler testlere dahil edilen suşlar

<i>Candida</i> türü	S-DD	I	R
<i>C.glabrata</i>	11		3
<i>C.parapsilosis</i>	5		5
<i>C.albicans</i>			1

Ergosterol demetilazı kodlayan *ERG11*, atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri quantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (qRT-PZT) ile araştırıldı. *C.albicans* izolatleri için *ERG11*,

CDR1, *CDR2*, *MDR1* genlerinin, *C.glabrata* izolatları için *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* genlerinin, *C.parapsilosis* izolatları için *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genlerinin ve tüm izolatlarda internal kontrol geni olarak *ACT1* geninin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Bu amaçla önce suşlardan RNA elde edildi. Daha sonra cDNA eldesi ve PZT uygulandı. Son olarak da elde edilen Ct değerlerine göre rölatif kantitasyon hesabı yapıldı. Referans suş olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.glabrata* ATCC 2950 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 suşları kullanılmıştır. Deney grubu suşlarının kontrol ATCC suşuna göre hedef geni kaç kat eksprese edildiği hesaplanmıştır. Kontrol ATCC (American Type Culture Collection) suşuna göre 2 kat ve daha fazla ekspresyonlar over ekspresyon olarak değerlendirilmiştir.

3.4.1. RNA Eldesi

RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, katalog numarası 12183018A) kiti kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyona alındı.

1. En az 5×10^8 olacak şekilde maya hücresi toplandı ve uygun boyutta mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. +4 °C'de 500xg'de 5 dakika santrifüjlendi ve çökelti oluşturuldu. Supernatant dikkatlice atıldı.
2. Hücre çökeltesine 100 µL lizozim solusyonu eklendi ve vortekslenerek tekrar karıştırıldı.
3. 0.5 µL %10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solusyonu eklendi ve iyice karışana kadar vortekslendi.
4. Tüp içerisindeki hücreler oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
5. 350 µL 2-mercaptoethanolü lizis buffer eklendi ve vortekslendi.
6. Lizat 4-15 mL'lik yuvarlak tabanlı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve en az 45 saniye boyunca maksimum hızda bir rotor-stator homojenleştirici kullanarak homojenize edildi. Homojenat oda ısısında 2600xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant temiz RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
7. Her bir maya hücre homojenatı hacmine 250 µL% 100 etanol eklendi.
8. Etanol ekledikten sonra oluşabilecek herhangi bir görünür çökeltiyi dağıtmak için vortekslenerek iyice karıştırıldı.
9. Örnek kalan çökelti ile birlikte bir spin kolona (Toplama Tüpü ile) aktarıldı.

10. Hem spin kolon hemde toplama tüpü oda ısısında 2600xg 15 saniye santrifüj edildi. Süzülen sıvı atıldı ve spin kolon aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
11. Spin kolona 700 µL Wash Buffer I eklendi ve oda ısısında 12000xg 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü ve süzülen sıvı atıldı. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Spin kolona etanolle birlikte 500 µL Wash Buffer II eklendi
13. Oda ısısında 12000xg 15saniye santrifüj edildi. Süzülen sıvı atıldı ve spin kolon aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
14. 12.ve 13. Basamaklar bir kere daha tekrarlandı.
15. Membranı bağlı RNA ile kurutmak için Spin kolonu ve toplama tüpü oda ısısında 1 dakika 12.000 × g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon bir recovery tüpüne yerleştirildi.
16. Spin kolonun ortasına 30 µL to 3 × 100 µL RNaz İçermeyen Su eklendi.
17. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildi.
18. Spin kolon ve recovery tüp oda ısısında 12000xg 2dakika santrifüj edildi ve RNA elde edildi.

3.4.2. cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentez fazına geçildi. cDNA sentezi için WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) (Wizbio, katalog numarası W2211) kullanıldı.

cDNA sentezi için kullanılan mastermiks içerikleri tabloda verilmiştir.

Tablo 11:cDNA sentezi için kullanılan master miks içerikleri ve volümleri

içerik	volüm (µl)
10X Reaksiyon Buffer	2
20X dNTP miksi	1
Random hexamer	2
WizScript™ RTase	1
RNase inhibitör	0.5
RNase-Free su	3.5
RNA örneği	10

cDNA sentezi için master miks hazırlandıktan sonra, revers transkripsiyon reaksiyonuna geçildi. Revers transkripsiyon basmağı için 10 µl 2X revers transkripsiyon master miksi bir mikrotüp içine konuldu. Sonra 10 µl RNA örneği eklendi ve karıştırmak için iki üç kez aşağı yukarı pipetlendi. Hava kabarcıklarını

gidermek ve içeriği karıştırmak için kısa süre santrifüj edildi. Revers transkripsiyon reaksiyon miksi tablo da gösterildiği gibi inkübe edilerek cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 12: cDNA sentezi için kullanılan revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları

	adım 1	adım 2	adım 3	adım 4
sıcaklık (°C)	25	37	85	4
zaman	10 dk	120 dk	5 dk	-

Elde edilen cDNA örnekleri RT-PCR gününe kadar -80 C° 'de saklandı.

3.4.3.Real time qPCR

cDNA elde edildikten sonra real time qPCR aşamasına başlandı. Real time qPCR için WizPure™ qPCR Master (SYBR) (Wizbio, katalog numarası W1711) kiti kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo13’de gösterilmektedir.

Tablo 13: Çalışmada kullanılan primerler, primer dizileri ve firma adı

Primer adı	Primer dizisi	Sentez firması
CA-ERG11-F	ACTCATGGGGTTGCCAATGTT	Oligomer
CA-ERG11-R	GAGCAGCATCACGTCTCCAA	Oligomer
CA-CDR1-F	CCATGACTCCTGCTACCGTG	Oligomer
CA-CDR1-R	CCATCGAGACCAACCCAACA	Oligomer
CA-CDR2-F	AGGTGCTATGCAAAAGGGGG	Oligomer
CA-CDR2-R	CAGCAACAGGACCAGCTTCA	Oligomer
CA-MDR1-F	AGTTGCTTGGGGTAGTTCCG	Oligomer
CA-MDR1-R	TGCTCTCAACTTTGGTCCGT	Oligomer
CA-ACT1-F	AGGTTTGGAAGCTGCTGGTA	Oligomer
CA-ACT1-R	ACGTTTCAGCAATACCTGGGA	Oligomer
CG-ERG11-F	CGGCTCTGCTATCCCATACG	Oligomer
CG-ERG11-R	ATTCGTGACCCTTTGGACCC	Oligomer
CG-CDR1-F	GGGACCCTACCTACAAACCG	Oligomer
CG-CDR1-R	GGAACCTCTGGCCAACCAGTA	Oligomer
CG-CDR2-F	TTTCAGCTTACTTGAGACAACCTTC	Oligomer
CG-CDR2-R	CATTTAGACCTTCACCTGCAACA	Oligomer
CG-ACT1-F	CAACGGAGGAAAGATGACTCAAAT	Oligomer
CG-ACT1-R	CACCGTCACCAGAGTCCAAA	Oligomer
CP-ERG11-F	GGGTCCCAAGGGTCATGAAT	Oligomer
CP-ERG11-R	CAATGCGGTCTTTGCGAACT	Oligomer
CP-CDR1-F	TTCCCATGCCAAACATGACTACT	Oligomer
CP-CDR1-R	CAAGTATTGCTTCCAGAGAGGGG	Oligomer
CP-MDR1-F	CTAGTCCGTGTTTGGCCACT	Oligomer
CP-MDR1-R	AGGCGCATAGGTCTCAGGTA	Oligomer
CP-ACT1-F	TGGACGGTGAAGAAGTTGCTG	Oligomer
CP-ACT1-R	AAGACAGCTCTTGGTGCGTC	Oligomer

Real time qPCR için kullanılan master miks içerikleri Tablo14’de gösterilmiştir.

Tablo 14:real time qPCR için kullanılan master miks içerikleri

MasterMiks içerikleri	Volüm
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA örneği	2 µl
RNase-Free distile su	6 µl
Toplam	20 µl

Master miks hazırlandıktan sonra real time qPCR reaksiyonuna başlandı. Reaksiyon koşulları tablo’de gösterilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems™, USA) cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 15:Real time qPCR reaksiyon koşulları

PCR basamağı	sıcaklık (°C)	zaman	Cycle
İlk denaturasyon	95	10 dakika	1
Denaturasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma	60	60 saniye	
Erime eğrisi	60-95	sürekli	1

3.4.4. Rölatif Kantitasyon Hesaplama

RNA ekspresyon kantitasyonu, referans olarak ACT1 transkripti kullanılarak kontrol grubuna normalize edildi. Rölatif kantitasyon hesaplamasında "" $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi" kullanılmıştır. $\Delta\Delta C_t$ 'nin hesaplanması aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

1. Hem hedef grup hem de referans gruptaki her numunenin hem hedef RNA hem de referans RNA'sı için real time PCR ile C_t değerleri elde edildi. Real time PCR basamağı üç kere tekrarlandı ve elde edilen C_t değerlerinin ortalaması alındı.
2. Hedef grup ΔC_t değerleri, referans RNA C_t değerinin hedef gruptaki hedef RNA C_t değerinden çıkarılmasıyla elde edilmiştir.
3. Referans grubu ΔC_t değerleri, referans RNA C_t değerinin referans grubundaki hedef RNA C_t değerinden çıkarılmasıyla elde edilmiştir.

4. $\Delta\Delta C_t$ değerleri, referans grubu ΔC_t değerlerinin hedef grup ΔC_t değerlerinden çıkarılmasıyla elde edilmiştir.
5. C_t değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak işlendi ve kat değişimi (fold change) hesaplandı.
6. Kat Değişim değeri 1'i geğerse, hedef grup RNA ekspresyonun referans grubun RNA ekspresyonuna göre arttığı yorumlanır. Kat Değişim değeri 1'in altındaysa, hedef grubun RNA ekspresyonun referans grubun RNA ekspresyonuna göre azaldığı yorumlanır.

3.5. İstatistiksel Metod:

Bulguların istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Ekim 2019 – Nisan 2021 tarihleri arasında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşları toplandı. Bu sürede toplam 100 adet *Candida* suşu toplandı ve tür düzeyinde tanımlamaları yapıldı. Tür düzeyinde tanımlama sonucunda suşların 41'i *C.albicans*, 22'si *C.parapsilosis*, 14'ü *C.glabrata*, 13'ü *C.tropicalis*, 5'i *C.lusitaniae*, 3'ü *C.guilliermondi*, 1'i *C.krusei* ve 1'i *C.kefyr* olarak tespit edildi.

Tablo 16:Kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı

<i>Candida</i> Türü	Sayı	%
<i>C.albicans</i>	41	41
<i>C.parapsilosis</i>	22	22
<i>C.glabrata</i>	14	14
<i>C.tropicalis</i>	13	13
<i>C.lusitaniae</i>	5	5
<i>C.guilliermondi</i>	3	3
<i>C.krusei</i>	1	1
<i>C.kefyr</i>	1	1
Toplam	100	100

İzolatların gönderildikleri bölümlere göre dağılımı tablo17'de gösterilmektedir.

Tablo 17:Kan kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin bölümlere göre dağılımı

Bölüm	Örnek sayısı (N)	Yüzde (%)
Yoğun bakım	78	78
Dahili bölüm	16	16
Cerrahi bölüm	6	6
Toplam	100	100

Tür düzeyinde tanımlamadan sonra *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* olarak tanımlanan suşlara antifungal duyarlılık testi yapıldı. Bu amaçla toplam 90 *Candida* suşuna antifungal duyarlılık testi yapıldı.

Yapılan antifungal duyarlılık testleri sonucunda, *Candida albicans* suşlarının flukonazole %2'si dirençli, %98'i duyarlı bulunmuştur. Vorikonazole suşların %15'i dirençli, %5'i orta duyarlı, %80'i duyarlı bulunmuştur. Mikafungine suşların %10'u orta duyarlı, %90'ı duyarlı bulunmuştur. Suşların tamamı kaspofungine duyarlı bulunmuştur.(30) Amfoterisin B ve posakonazol için CLSI'da belirtilen bir MIK değeri olmadığı için, bu antifungaller için epidemiyolojik sınır değerler kullanılmıştır. Buna göre Amfoterisin B için suşların %34'ü vahşi olmayan tip (non-wild type), %66'sı vahşi tip (wild type) olarak tespit edilmiştir. Posakonazol için suşların %7'si vahşi olmayan tip(non-wild type), %93'ü vahşi tip(wild type) olarak saptanmıştır.(31) *Candida albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları Tablo18'de gösterilmektedir.

Tablo 18:*Candida albicans* suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=41)

Antifungal	WT		Non-WT		Duyarlı		S-DD		Orta duyarlı		Dirençli	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AmfoterisinB	27	66	14	34								
Flukonazol					40	98					1	2
Posakonazol	38	93	3	7								
Vorikonazol					33	80			2	5	6	15
Kaspofungin					41	100					0	0
Mikafungin					37	90			4	10	0	0

Candida parapsilosis suşlarının flukonazole %23'ü dirençli, %23'ü doza bağımlı duyarlı, %54'ü duyarlı bulunurken, vorikonazole suşların %50'si orta duyarlı, %50'si duyarlı bulunmuştur. Mikafungine suşların %14'ü orta duyarlı, %86'sı duyarlı bulunmuştur. Suşların tamamı kaspofungine duyarlı bulunmuştur.(30) Amfoterisin B için *Candida parapsilosis* suşların %59'u vahşi olmayan tip (non-wild type) %41'i vahşi tip (wild type) olarak bulunmuştur. Posakonazol için suşların %5'i vahşi olmayan tip (non-wild type), %95'i vahşi tip (wild type) olarak saptanmıştır.(31)

Candida parapsilosis suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları Tablo19’da gösterilmektedir.

Tablo 19: *Candida parapsilosis* suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=22)

Antifungal	WT		Non-WT		Duyarlı		S-DD		Orta duyarlı		Dirençli	
	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%
Amfoterin B	9	41	13	59								
Flukonazol					12	54	5	23			5	23
Posakonazol	21	95	1	5								
Vorikonazol					11	50			11	50	0	
Kaspofungin					22	100					0	0
Mikafungin					19	86			3	14	0	0

Candida glabrata suşlarının flukonazole %21’i dirençli, %79’u doz bağımlı duyarlı bulunmuştur. Mikafungine suşların %7’si dirençli, %64’ü orta duyarlı, %29’u duyarlı bulunmuştur. Kaspofungine suşların %7’si orta duyarlı, %93’ü duyarlı bulunmuştur(30) Amfoterisin B için *Candida glabrata* suşların %71’i vahşi olmayan tip (non-wild type), %29’u vahşi tip (wild type)olarak bulunmuştur. Suşların tamamı posakonazol için vahşi tip (wild type) olarak saptanmıştır. Vorikonazol için suşların %57’si vahşi olmayan tip (non-wild type), %43’si vahşi tip (wild type) olarak bulunmuştur.(31) (30) *Candida glabrata* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları Tablo 20’de gösterilmektedir

Tablo 20: *Candida glabrata* suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=14)

Antifungal	WT		Non-WT		Duyarlı		S-DD		Orta duyarlı		Dirençli	
	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%
Amfoterin B	4	29	10	71								
Flukonazol							11	79			3	21
Posakonazol	14	100	0	0								
Vorikonazol	6	43	8	57								
Kaspofungin					13	93			1	7	0	0
Mikafungin					4	29			9	64	1	7

Candida tropicalis suşlarının tamamı flukonazol ve kaspo fungin duyarlı bulunmuştur. Mikafungine suşların %15'i orta duyarlı, %85'i duyarlı bulunmuştur. Vorikonazole suşların %15'i orta duyarlı, %85'i duyarlı bulunmuştur. (30) Amfoterisin B için *Candida tropicalis* suşların %77'si vahşi olmayan tip (non-wild type), %23'ü vahşi tip (wild type) olarak bulunmuştur. Posakonazol için suşların %8'i vahşi olmayan tip (non-wild type), %92'si vahşi tip (wild type) olarak bulunmuştur.(31) *Candida tropicalis* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları Tablo 21'de gösterilmektedir.

Tablo 21: *Candida tropicalis* suşlarının antifungal duyarlılıkları(N=13)

Antifungal	WT		Non-WT		Duyarlı		S-DD		Orta duyarlı		Dirençli	
	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%	N (Sayı)	%
Amfoterin B	3	23	10	77								
Flukonazol					13	100			0	0	0	0
Posakonazol	12	92	1	8								
Vorikonazol					11	75			2	15	0	0
Kaspofungin					13	100			0		0	0
Mikafungin					11	75			2	15	0	0

Tablo 22: *Candida albicans* izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri

Antifungal	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	0,75-12	2	6
Flukonazol	0,064-12	0,125	0,25
Posakonazol	0,023-0,38	0,047	0,064
Vorikonazol	0,012->32	0,032	>32
Kaspofungin	<0,002-0,064	0,003	0,004
Mikafungin	<0,002-125	0,125	0,038

Tablo 23: *Candida parapsilosis* izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri

Antifungal	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	1-8	3	6
Flukonazol	0,094->256	0,75	>256
Posakonazol	0,032-0,94	0,064	0,125
Vorikonazol	0,08-1	0,125	0,75
Kaspofungin	0,064-0,75	0,25	0,5
Mikafungin	0,75-3	1,5	3

Tablo 24: *Candida glabrata* izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri

Antifungal	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	1-12	4	8
Flukonazol	6->256	8	>256
Posakonazol	0,25-2	1	2
Vorikonazol	0,38-3	0,75	2
Kaspofungin	<0,002-0,19	<0,002	0,125
Mikafungin	0,006-0,25	0,125	0,125

Tablo 25: *Candida tropicalis* izolatları için altı antifungal için E-test yöntemi ile belirlenen MİK aralıkları, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri

Antifungal	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	1->32	6	16
Flukonazol	0,25-1	0,5	1
Posakonazol	0,032-0,19	0,064	0,125
Vorikonazol	0,047-0,19	0,094	0,19
Kasopfungin	<0,002-0,25	<0,002	0,064
Mikafungin	0,012-0,5	0,125	0,38

Antifungal duyarlılık testi sonucuna 3 *C.glabrata*, 5 *C.parapsilosis* ve 1 *C.albicans* suşu flukonazol dirençli saptanırken; 11 *C.glabrata* ve 5 *C.parapsilosis* suşu flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunmuştur. Flukonazol dirençli/dozbağımlı duyarlı saptanan suşların flukonazol direncinden sorumlu olan *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* genlerinin ve internal kontrol geni *ACT1* geninin ekspresyon düzeyleri quantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (qRT-PZT) ile araştırıldı.

Candida albicans1 suşu için *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve internal kontrol olarak *ACT1* geni ekspresyon seviyeleri araştırıldı. RT-PCR iki kez tekrarlandı ve elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Elde edilen sonuçlar kontrol ATCC suşu ile kıyaslanarak; çalışılan genin kontrol ATCC suşuna göre kaç kat fazla eksprese edildiği hesaplandı. Referans suş olarak *C.albicans ATCC 90028* suşu kullanıldı. Kontrol suşa göre iki kat ve daha fazla ekspresyon over ekspresyon olarak değerlendirildi.

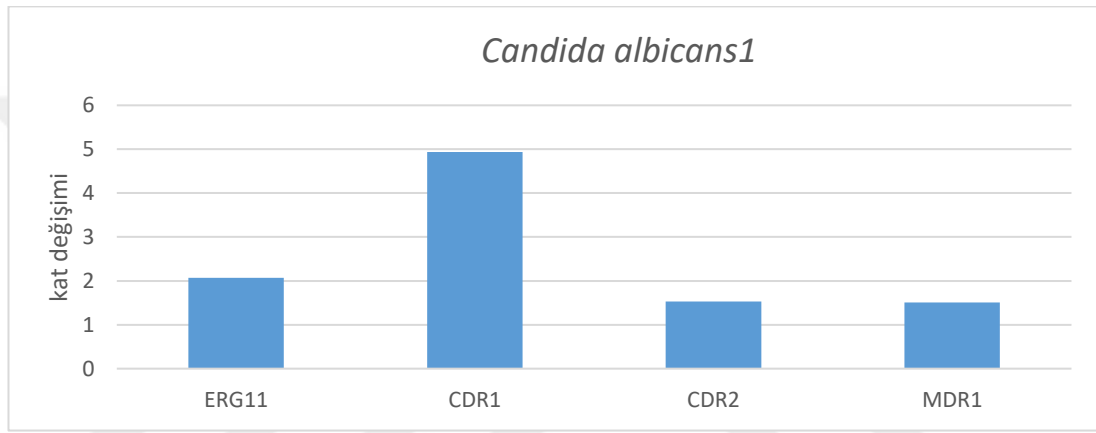
C.albicans1 suşunun flukonazol, vorikonazol, posakonazol MİK değerleri ve *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* gen kat değişimleri Tablo 26'da gösterilmiştir.

C.albicans1 suşu flukonazol, vorikonazol, posakonazol arasında çapraz direnç göstermiştir. *Candida albicans1* suşu kontrol ATCC suşuna göre *CDR1* genini 4,94, *CDR2* genini 1,53, *MDR1* genini 1,51 ve *ERG11* genini 2,07 kat fazla eksprese ettiği bulunmuştur. *C.albicans1* suşu *ERG11* ve *CDR1* genini over eksprese etmektedir.

Tablo 26: *C.albicans1* suşu azol grubu antifungal MIK değerleri ve çalışılan genlerin kat değişim sayıları

	Flukonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Vorikonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Posakonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	ERG11 (kat değişimi)	CDR1 (kat değişimi)	CDR2 (kat değişimi)	MDR1 (kat değişimi)
<i>C.albicans1</i>	12/R	0,75/I	0,38/NWT	2,07	4,94	1,53	1,51

R: Dirençli; I: orta duyarlı; NWT: non-wild type(vahşi olmayan tip)



Şekil 6: *C.albicans1* suşu ERG11, CDR1, CDR2, MDR1 genleri ekspresyon seviyesi grafiği

C.glabrata suşlarında ERG11, CDR1, CDR2 ve internal kontrol olarak ACT1 geni ekspresyon seviyeleri araştırıldı. RT-PCR üç kez tekrar edildi ve elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Elde edilen sonuçlar kontrol ATCC suşu ile kıyaslanarak; çalışılan genin kontrol ATCC suşuna göre kaç kat fazla eksprese edildiği hesaplandı. Referans suş olarak *C.glabrata* ATCC 2950 suşu kullanıldı.

Flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının tamamı vorikonazol ile çapraz direnç göstermiştir. Fakat hiçbir suş posakonazol ile çapraz direnç göstermemiştir.

Flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının tamamı(%100) ERG11 ve CDR1 genini over ekprese etmektedir. CDR2 genini *C.glabrata*9 suşu hariç diğer 2 suş(%67) over ekprese etmektedir.

Flukonazol dirençli saptanan suşların flukonazol, posakonazol, vorikonazol MIK değerleri ve ERG11, CDR1, CDR2 genlerinin kat değişimleri Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27:Flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları

	Flukonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Vorikonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Posakonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	<i>ERG11</i> (kat değişimi)	<i>CDR1</i> (kat değişimi)	<i>CDR2</i> (kat değişimi)
<i>C.glabrata7</i>	>256/R	3/NWT	2/WT	633,26	603,27	11,49
<i>C.glabrata9</i>	>256/R	1/NWT	1/WT	63,26	103,96	1,57
<i>C.glabrata13</i>	>256/R	1,5/NWT	1,5/WT	67,64	310,11	4,31

R:Dirençli; NWT: non-wild type(vahşi olmayan tip); WT: Wild type(vahşi tip)

Flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunan 11 *C.glabrata* suşunun 5'inde vorikonazol ile çapraz direnç tespit edilmiş ve hiçbir suşta posakonazol ile çapraz direnç tespit edilmemiştir.

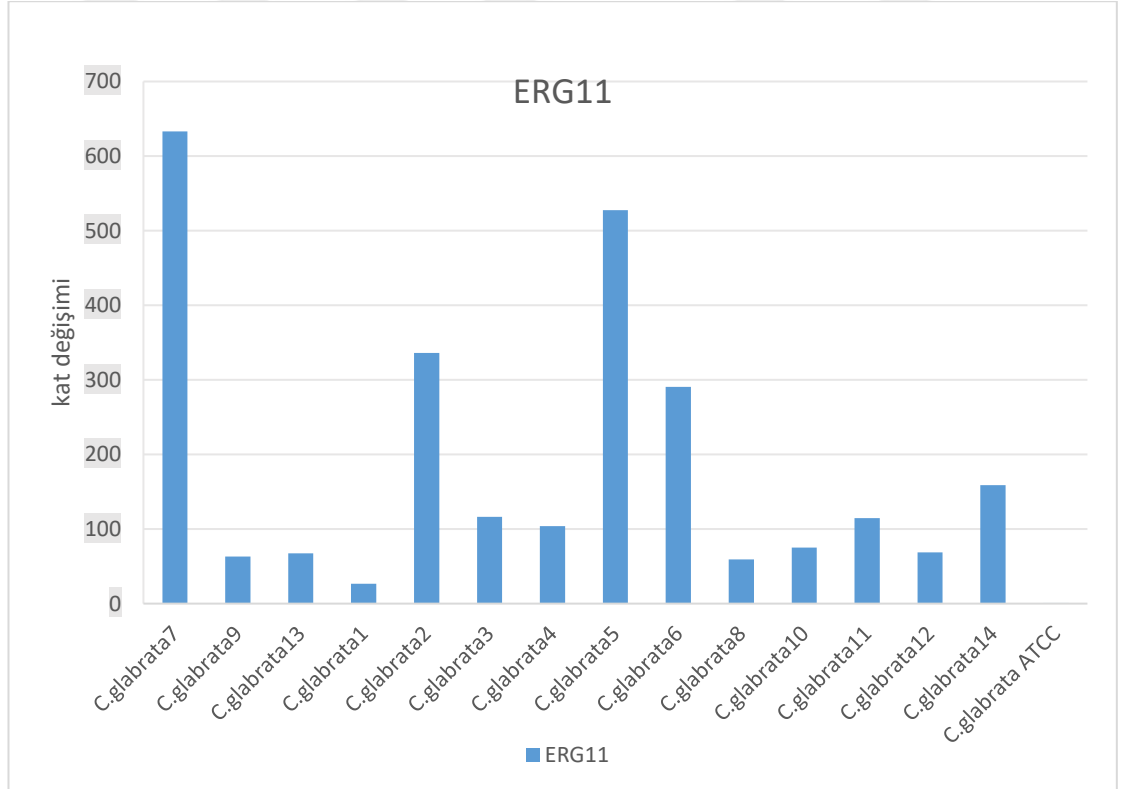
Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının tamamı(%100) aynı flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarında olduğu gibi *ERG11* ve *CDR1* genini over eksprese etmektedir. *CDR2* genini ise *C.glabrata8* suşu hariç diğer 10 suş (%91) over eksprese etmektedir.

Flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunan *C.glabrata* suşlarının flukonazol, posakonazol, vorikonazol MIK değerleri ve *ERG11*,*CDR1*,*CDR2* genlerinin kat değişim sayıları Tablo 28'de verilmiştir.

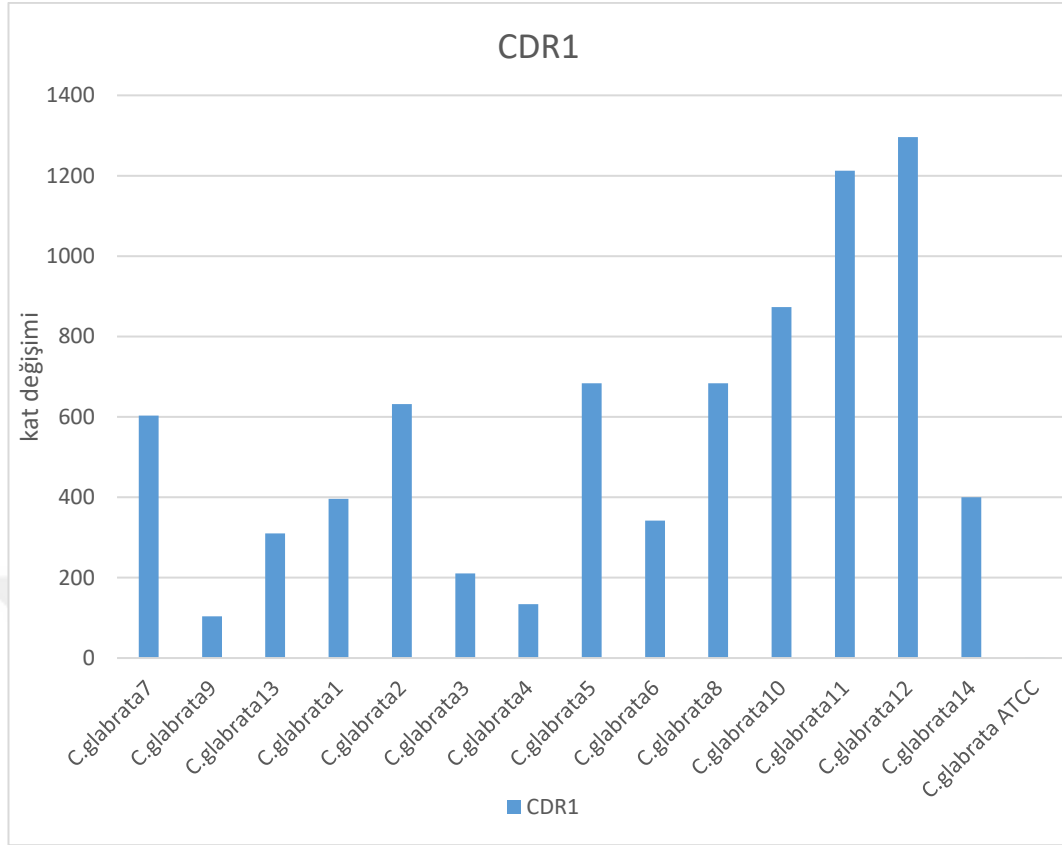
Tablo 28:Flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları

	Flukonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Vorikonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Posakonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	<i>ERG11</i> (kat değişimi)	<i>CDR1</i> (kat değişimi)	<i>CDR2</i> (kat değişimi)
<i>C.glabrata1</i>	8/S-DD	2/NWT	1/WT	26,84	396,17	2,85
<i>C.glabrata2</i>	6/S-DD	0,38/WT	0,5/WT	336,23	631,80	4,55
<i>C.glabrata3</i>	6/S-DD	0,5/WT	0,5/WT	116,43	210,83	6,07
<i>C.glabrata4</i>	12/S-DD	1,5/NWT	0,25/WT	103,72	134,36	3,83
<i>C.glabrata5</i>	16/S-DD	1,5/NWT	1/WT	527,61	683,43	10,55
<i>C.glabrata6</i>	8/S-DD	0,5/WT	2/WT	290,68	341,71	9,29
<i>C.glabrata8</i>	6/S-DD	0,5/WT	1,5/WT	59,30	683,43	1,70
<i>C.glabrata10</i>	8/S-DD	0,5/WT	0,25/WT	75,23	873,09	3,14
<i>C.glabrata11</i>	12/S-DD	0,75/NWT	1,5/WT	114,56	1212,13	4,55
<i>C.glabrata12</i>	8/S-DD	0,5/WT	0,5/WT	68,75	1296,13	2,70
<i>C.glabrata14</i>	6/S-DD	0,75/NWT	1,5/WT	158,68	399,85	5,18

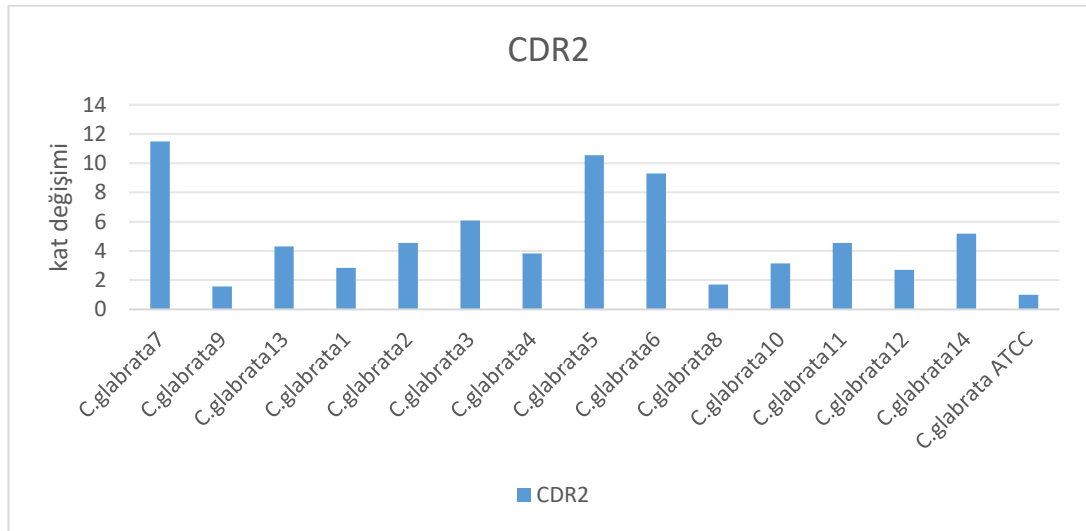
S-DD: Doza bağımlı duyarlı; NWT: non-wild type (vahşi olmayan tip); WT: Wild type(vahşi tip)



Şekil 7:*C.glabrata* suşlarının *ERG11* geni ekspresyon seviyesi grafiği



Şekil 8: *C.glabrata* suşlarının CDR1 geni ekspresyon seviyesi grafiğı



Şekil 9: *C.glabrata* suşlarının CDR2 geni ekspresyon seviyesi grafiğı

C.glabrata suşlarında flukonazol dirençli ve doz bağımlı duyarlı suşların ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında üç gen için iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. *ERG11* geni için p: 0,885; *CDR1* geni için p: 0,170; *CDR2* geni için p:1,000 bulundu.

C.parapsilosis suşlarında *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* ve internal kontrol olarak *ACT1* geni ekspresyon seviyeleri araştırıldı. RT-PCR üç kez tekrar edildi ve elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Elde edilen sonuçlar kontrol ATCC suşu ile kıyaslanarak; çalışılan genin kontrol ATCC suşuna göre kaç kat fazla eksprese edildiği hesaplandı. Referans suş olarak *C.parapsilosis ATCC 22019* suşu kullanıldı.

Flukonazol dirençli 5 *C.parapsilosis* suşunun tamamında vorikonazol ile çapraz direnç tespit edilirken, hiçbir suшта posakonazol ile çapraz direnç tespit edilmedi.

Flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarında, *C.parapsilosis6* suşu hariç diğer 4 suшта (%80) *ERG11* ve *CDR1* geni over eksprese saptandı. *MDR1* geni ise flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının tamamında(%100) over eksprese saptandı.

Flukonazol dirençli saptanan *C.parapsilosis* suşlarının flukonazol, posakonazol, vorikonazol MIK değerleri ve *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genlerinin kat değişimleri Tablo 29’da verilmiştir.

Tablo 29:Flukonazol dirençli bulunan *C.parapsilosis* suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları

	Flukonazol MIK(µg/ml) /Duyarlılık Durumu	Vorikonazol MIK(µg/ml) /Duyarlılık Durumu	Posakonazol MIK(µg/ml) /Duyarlılık Durumu	<i>ERG11</i> (kat değişimi)	<i>CDR1</i> (kat değişimi)	<i>MDR1</i> (kat değişimi)
<i>C.parapsilosis1</i>	>256/R	0,5/I	0,094/WT	5,65	4,76	2,64
<i>C.parapsilosis5</i>	8/R	0,75/I	0,125/WT	3,81	2,00	3,72
<i>C.parapsilosis6</i>	>256/R	1/I	0,125/WT	1,94	1,42	2,65
<i>C.parapsilosis9</i>	12/R	0,19/I	0,094/WT	8,13	13,48	6,33
<i>C.parapsilosis10</i>	>256/R	0,38/I	0,094/WT	10,82	18,08	4,63

R: Dirençli; I:orta duyarlı; WT: wild type(vahşi tip)

Flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunan 5 *C.parapsilosis* suşunun 3’ünde vorikonazol ile çapraz direnç tespit edilirken; suşların 1’inde posakonazol ile çapraz direnç tespit edildi.

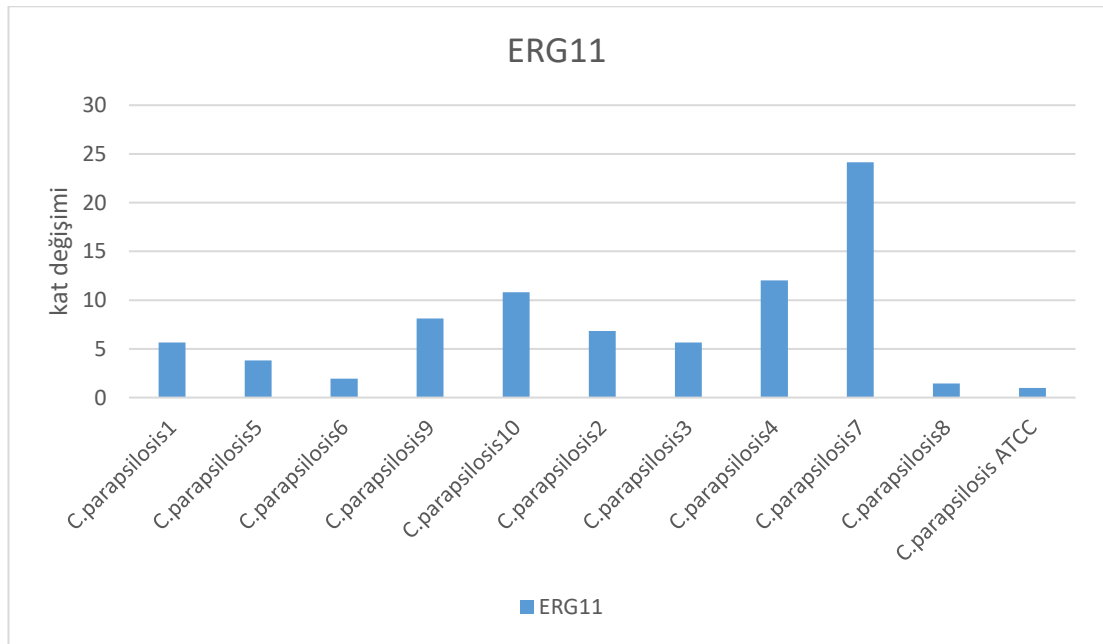
Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarında *C.parapsilosis8* suşu hariç diğer 4 suşta(%80) *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genleri over eksprese saptandı. *C.parapsilosis8* suşunda hiçbir gen over eksprese saptanmadı.

Flukonazol doz bağımlı duyarlı saptanan *C.parapsilosis* suşlarının flukonazol, posakonazol, vorikonazol MIK değerleri ve *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genlerinin kat değişimleri Tablo 30’da verilmiştir.

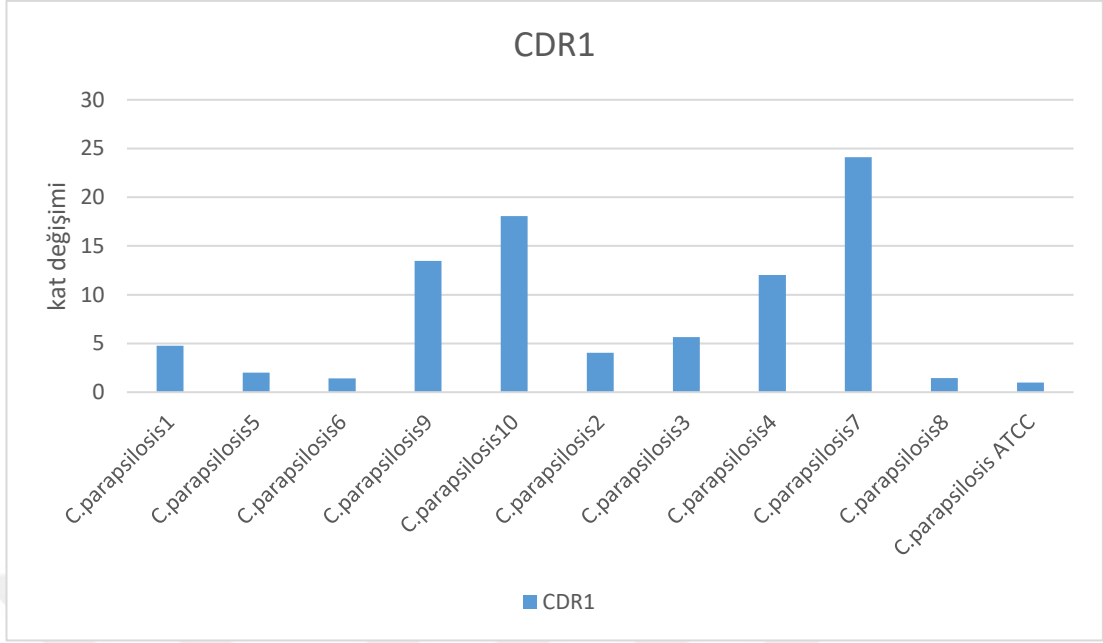
Tablo 30:Flukonazol doz bağımlı duyarlı bulunan *C.parapsilosis* suşlarının azol MIK değerleri ve gen kat değişim sayıları

	Flukonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Vorikonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	Posakonazol MIK(μ g/ml) /Duyarlılık Durumu	<i>ERG11</i> (kat değişimi)	<i>CDR1</i> (kat değişimi)	<i>MDR1</i> (kat değişimi)
<i>C.parapsilosis2</i>	3/S-DD	0,094/S	0,064/WT	6,83	4,05	4,08
<i>C.parapsilosis3</i>	4/S-DD	0,125/S	0,094/WT	5,89	5,66	4,64
<i>C.parapsilosis4</i>	6/S-DD	0,38/I	0,094/WT	8,13	12,01	2,25
<i>C.parapsilosis7</i>	6/S-DD	0,19/I	0,125/WT	18,98	24,13	2,30
<i>C.parapsilosis8</i>	6/S-DD	0,25/I	0,94/NWT	1,33	1,46	1,29

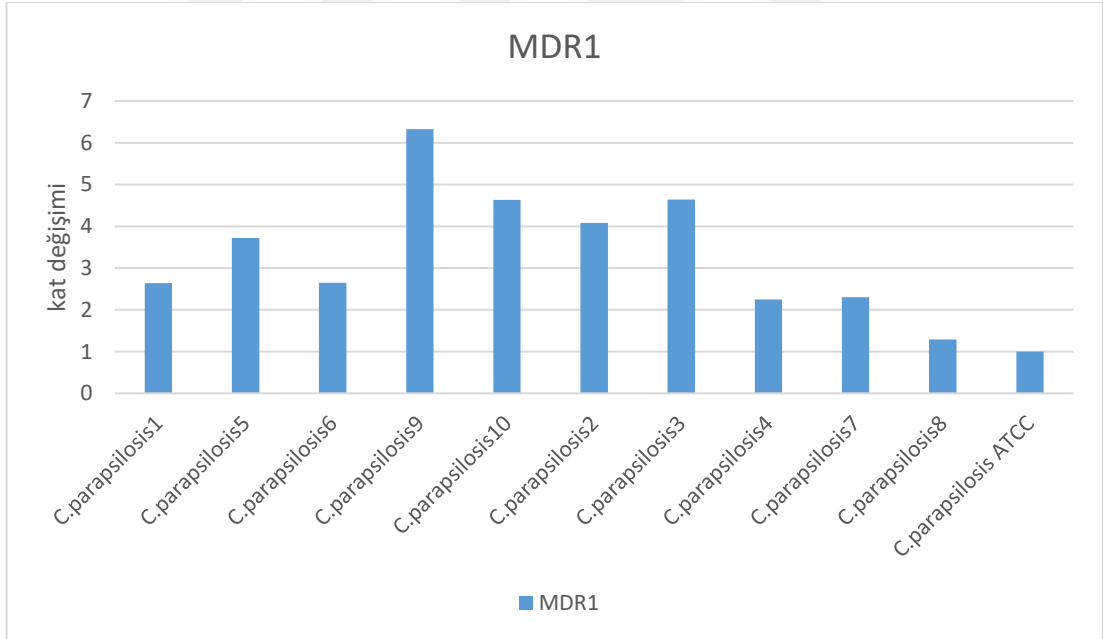
S: duyarlı; S-DD: Doza bağımlı duyarlı; I: orta duyarlı; NWT: non-wild type(vahşi olmayan tip); WT:Wild type(vahşi tip)



Şekil 10: *C.parapsilosis* suşlarının *ERG11* geni ekspresyon seviyesi grafiği



Şekil 11: *C.parapsilosis* suşlarının *CDR1* geni ekspresyon seviyesi grafiği



Şekil 12: *C.parapsilosis* suşlarının *MDR1* geni ekspresyon seviyesi grafiği

C.parapsilosis suşlarında flukonazol dirençli ve doz bağımlı duyarlı suşların ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında üç gen için iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. *ERG11* geni için $p:0,69$; *CDR1* geni için $p: 0,841$; *MDR1* geni için $p:0,31$ bulundu.

5.TARTIŞMA

Hastane kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlar giderek artış göstermektedir. Bu fırsatçı enfeksiyonlar arasında da mantar enfeksiyonları önemli bir yer tutmaktadır. Mantar enfeksiyonları arasında en sık *Candida* türleri patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. *Candida* türlerinin neden olduğu fungemiler, hastane kaynaklı fungal enfeksiyonlar arasında ilk sırada yer almaktadır. *Candida* türleri, ABD'de nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan ilk beş patojen arasındadır ve nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının % 8-10' undan izole edilmektedir.(1)

Uzun süreli antibiyotik tedavisi alma, uzun yoğun bakımda yatış süresi, altta yatan malignite Kandidemi riskini artırmaktadır(1). Çalışmamızda suşların %78'i yoğun bakım ünitesinde, %16'sı dahili servislerde, %6'sı da cerrahi servislerde yatan hastalardan izole edilmiştir. Hamidi ve ark. yaptığı çalışmada da kandidemilere en sık yoğun bakımda yatan hastalarda(%85,3) bulunmuştur.(32). Israel ve ark yaptığı çalışmada da en sık yoğun bakım da yatan ve hematojik maligniteli hastalarda kandidemiye rastlanmıştır.(33)

Kandidemi de en sık görülen etken *Candida albicans*'dır ve kan izolatlarının %50-60'ını oluşturur.(23). Ancak son yıllarda kandidemiye neden olan *Candida albicans* türlerinin sıklığı giderek azalmakta ve albicans dışı *Candida* türlerinin sıklığı artış göstermektedir. *C.albicans* 'ın sıklığı yıllara göre azalma göstereceği hala en sık izole edilen türdür.(1) Bizim çalışmamızda da %41 oranla en fazla izole edilen suş *C.albicans* olmuştur. Çalışmamızda kandidemiye neden olan albicans dışı *Candida* türleri sıklık sırasına göre *Candida parapsilosis* (%22), *Candida glabrata* (%14) ve *Candida tropicalis* (%13) olmuştur. Berrio ve ark. yaptığı çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde en sık izole edilen *Candida* türleri %40,8 *C.albicans*, %23,1 *C.parapsilosis*, %17 *C.tropicalis* ve %6,8 *C.glabrata*'dır. (34). Cortes ve ark. Kolombiya'da yaptığı çok merkezli çalışmada da kandidemi nedeni olarak en sık *C.albicans* bulunmuştur. Ancak *C.albicans*'ın görülme sıklığı yıllara göre azalmıştır. *C.albicans* en fazla oranla(%66,7) 2008-2009 yılları arasında görülmüştür. 2010-2011 yıllarında %40,8 olarak, 2010-2013 yıllarında ise %41,2 olarak bulunmuştur. Cortes ve ark. *C.albicans*'dan sonra sırasıyla *C.tropicalis* (%23,4-10,6), *C.parapsilosis* (%26,5-13,7) ve *C.glabrata* (%9,5-2,6) en sık saptanan kandidemi etkenleri olmuşlardır. (35) Montagna ve ark. yaptığı çalışmada kandidemi nedeni olarak en sık albicans dışı

Candidalar bulunmuş(%59,8) bunların içerisinde de çalışmamızla benzer şekilde sırasıyla en sık *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* izole edilmiştir.(36)

Guinea' nin yaptığı ve küresel olarak Kandidemi etkenlerini incelediği çalışmada ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study'nin verilerine göre 5 tür (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.krusei*) kandidemi vakalarının %92 sini oluşturmaktadır. Dünya çapında *C.albicans* %62 oranla en sık izole edilen Kandidemi etkeni olmuştur. Ancak *C.albicans*'ın sıklığı yıllara göre azalmıştır. ABD' de 1999, 2004, 2012 yıllarında kandidemi etkeni olarak *C.albicans* sırasıyla %52, %45, %38 oranında bulunmuştur. Ancak albicans dışı Candidalarda kuzey Avrupa ve ABD'de *C.glabrata* sıklığı daha fazla iken, *C.parapsilosis* sıklığı daha az bulunmuştur. Buna karşılık İspanya ve Brezilya'da ise *C.parapsilosis* sıklığı daha fazla iken *C.glabrata* sıklığı az bulunmuştur.(37)

Rodriguez ve ark Peru'da yaptığı çalışmada kandidemi etkeni en sık %71,9'luk oranla albicans dışı Candidalar olmuştur. Çalışmalarında kandidemi etkeni olarak %27,8 *C.albicans*, %25,3 *C.parapsilosis*, %24,7 *C.tropicalis* ve %9,5 *C.glabrata* saptamışlardır.(38) Mete ve ark.nın ülkemizde yaptığı çalışmada kandidemi etkeni olarak en sık albicans dışı Candidalar (%68) bulunmuştur. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. Glabrata* ve *C. tropicalis* sırasıyla %32, %28, %17 ve %11 olarak bildirilmiştir.(39)

Kandidemilerin önlenmesi ve sağaltımı genellikle uzun dönem ilaç kullanımı gerektirmektedir. Bu amaçla ilk olarak azol grubu antifungaller tercih edilmektedir. Uzun ve tekrarlayan antifungal kullanımı sonucunda da dirençli *Candida* suşlarıyla karşılaşmaktadır. (3) Bu yüzden antifungal duyarlılık testlerinin rutin uygulanması, tedavi seçiminde ve direncin izlenmesinde oldukça önemlidir.

Mantar enfeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesi için azollerin, özellikle flukonazolün çok sık kullanılması, bu sınıftan antifungal ajanlara karşı direncin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan çoğu *Candida* türü arasında flukonazole primer direnç nadirdir. Enfekte hastaların (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) kanından izole edilen en yaygın beş *Candida* türü arasında, yalnızca *C. krusei* flukonazole doğal olarak dirençli kabul edilir. Kalan türler arasında, *C. glabrata*'nın yaklaşık %10'u ve *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in %2'sinden azı flukonazole primer dirençlidir. Yeni triazoller (vorikonazol, posakonazol ve izavukonazol), *Candida spp.*'ye karşı flukonazolden daha etkilidir. (4)

Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının %2'si flukonazole, %15'i vorikonazele dirençli ve %5'i vorikonazol orta duyarlı bulunmuştur. Pfaller ve ark'larının 1997 ve 2007 yılları arasında yaptığı çok merkezli çalışmada flukonazol direnci %1,4; vorikonazol direnci %1,2 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda vorikonazol direnci daha yüksek saptanırken, flukonazol direnci benzer bulunmuştur.(40) Kılınçel ve ark. yaptığı kan kültürlerinden izole edilen candidaları incelediği çalışmada *C.albicans*'ların % 11'i flukonazol dirençli, %2'si de doza bağımlı duyarlı bulunmuştur. Aynı çalışmada *C.albicans*'ların %14'ü vorikonazol dirençli bulunmuştur.(41) Karabıçak ve ark.'nın yaptığı çalışmada da flukonazol direnci %16,6 ile bizim çalışmamızdan daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada vorikonazol direnci %11 ile çalışmamızdan daha düşük oranda saptanmıştır.(42) Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada *C. albicans*'ın flukonazol direnç oranı %2,2 olarak bulunmuştur.(43) Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada ise *C.albicans* suşlarında flukonazol ve vorikonazol direnci saptanmamıştır.(44)

Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının %7'si posakonazol için vahşi olmayan tip (non-wild type) olarak bulunmuştur. MİK aralığı 0,023-0,38 µg/ml, MİK₅₀ 0,047 µg/ml, MİK₉₀ 0,064 µg/ml olarak bulunmuştur. Çiçek-Kolak ve ark yaptığı çalışmada posakonazol için *C.albicans* suşlarının tamamı vahşi tip (wild type) ve MİK aralığı, MİK₅₀, MİK₉₀ sırasıyla 0.008-0.03, 0.015, 0.03 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük değerler bulunmuştur.(44) Lindberg ve ark. yaptığı çalışmada *C.albicans* suşlarının posakonazol MİK aralığı, MİK₅₀, MİK₉₀ sırasıyla 0.008–0.12 µg/ml, 0.015 µg/ml, 0.03 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük değerler bulunmuştur.(45) Zhang ve ark.'nın 385 *Candida* suşunu incelediği çalışmalarında *C.albicans* suşlarının %15,4'ü posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bizim çalışmamızdan daha yüksek bulunmuştur. MİK aralığı 0.007–4mg/L, MİK₅₀ 0.015 mg/L ve MİK₉₀ 0.125 mg/L olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamıza göre MİK aralığı daha geniş, MİK₉₀ değeri daha yüksek ve MİK₅₀ değeri ise daha düşük bulunmuştur.(46)

Çalışmamızda *Candida parapsilosis* suşlarının %23'ü flukonazol dirençli, %23'ü flukonazol doza bağımlı duyarlı bulunmuştur. Suşların %50'si vorikonazol orta duyarlı bulunmuş hiç vorikonazol dirençli suş saptanmamıştır. Pfaller'in yaptığı çok merkezli çalışmada *C.parapsilosis* suşları flukonazole %3,6, vorikonazole %1,8 oranında dirençli bulmuşlardır.(47) Yine Pfaller ve ark yaptığı bölgelere göre direnç profillerinin belirlendiği çalışmada *C.parapsilosis* için flukonazol direnci Asya-

Pasifik bölgesinde %0,6, Avrupa’da %4,6, Latin Amerika’da %4,3 ve Kuzey Amerika’da %3,7 olarak bulunmuştur. (48) Israel ve ark. *C.parapsilosis* suşlarında %37,8 flukonazol, %28,2 vorikonazol direnci saptamışlardır.(33) Ülkemizde yapılan bir çalışmada da %8,7 flukonazol dirençli, %4,35 vorikonazol dirençli,%4,35 vorikonazol orta duyarlı *C.parapsilosis* suşları rapor edilmiştir.(44) *C.parapsilosis* suşlarında Erdoğan ve ark. %28,6 flukonazol, %20 vorikonazol direnci; Kılınçel ve ark. %7,6 flukonazol ve %7,6 vorikonazol direnci saptamışlardır.(41,49) Karabıçak ve ark. flukonazol için %3,2 dirençli, %3,2 doza bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşu saptamışlar ve vorikonazol için hiç dirençli suş saptamamışlardır.(42) Tümtürk ve ark. flukonazol için %15,6 dirençli, %9,3 doza bağımlı duyarlı; vorikonazol için %12,5 doza bağımlı duyarlı suş bulurken; hiç vorikonazol dirençli suşa rastlamamışlardır. (50) Lindberg ve ark. *C.parapsilosis* suşlarında flukonazol ve vorikonazol direnci bildirmemişlerdir.(45)

Çalışmamızda *C.parapsilosis* suşlarının %5’i posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bulunmuştur. MİK Aralığı 0,032-0,94 µg/ml, MİK₅₀ 0,064 µg/ml, MİK₉₀ 0,125 µg/ml olarak bulunmuştur. Martí-Carrizosa ve ark yaptığı 15 yıllık bir dönemin incelendiği çalışmalarında posakonazol MİK aralığı 0.008 – 0.25 µg/ml, MİK₅₀ 0.06 µg/ml, MİK₉₀ 0.125 µg/ml olarak bizim çalışmamıza benzer sonuçlar bulmuşlardır.(51) Lindberg ve ark. MİK Aralığı, MİK₅₀, MİK₉₀ değerlerini sırasıyla 0.015–0.12, 0.03, 0.06 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük değerler rapor etmişlerdir.(45) Çiçek ve ark. *C.parapsilosis* suşlarında posakonazol için % 4,3; zhang ve ark %1,2 vahşi olmayan tip bildirmişlerdir.(44,46)

Bir haploid mantar patojeni olan *C. glabrata*, doğası gereği azol antifungal ilaçlara daha az duyarlıdır ve invazif enfeksiyonlar, özellikle büyük cerrahi gerektiren immün sistemi baskılanmış yaşlı hastalarda ve nötropenik hastalarda yüksek (~% 50) ölüm oranları ile ilişkilidir.(52)

Çalışmamızda flukonazol için *C.glabrata* suşlarının %21’i dirençli, %79’u doza bağımlı duyarlı bulunmuştur. Erdoğan ve ark. *C.glabrata* suşlarında flukonazol direncini %11,1 bulurken, Rodriguez ve ark hiç dirençli suş bulamamış suşların tamamı doza bağımlı duyarlı bulunmuştur.(38,49) Ülkemizde Mete ve ark yaptığı kan kültüründen izole edilen candidaları incelediği çalışmada flukonazol direnci ilk peryodda (2004-2008) %5; ikinci peryodda (2013-2017) %6 olarak rapor edilmiştir.(39) Pfallerin 10 yıllık bir dönemi(2006-2016) incelediği çalışmasında

flukonazol direnci %8,1 olarak saptanmıştır. *C.glabrata* suşlarının flukonazol direncine bölgelere göre bakıldığında Asya-Pasifik bölgesinde %6,8, Avrupa’da %4,9, Latin Amerika’da %2,6, Kuzey Amerika’da %10,6 olarak bulunmuştur.(48) Yine Pfaller ve ark yaptığı *C.glabrata* suşlarının SENTRY ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC) sürveyans programına göre flukonazol direnç oranları sırasıyla %7,3 ve %12,2 olarak rapor edilmiştir.(53) Andersen ve ark çalışmalarında flukonazol için %14,7 dirençli, %85,3 doza bağımlı duyarlı/orta duyarlı suş bildirmişlerdir.(54) Al-Baqsemi ve ark. çalışmalarında flukonazol için *C.glabrata* suşlarının %52’si doz bağımlı duyarlı, %48’ini dirençli olarak bizim çalışmamızdaki değerlerden daha yüksek bulmuşlardır. (52)

Çalışmamızda vorikonazol için *C.glabrata* suşların %57’si vahşi olmayan tip, %43’ü vahşi tip olarak bulunmuştur. Vorikonazol için MİK aralığı 0,38-3 µg/ml, MİK₅₀ 0,75 µg/ml ve MİK₉₀ 2 µg/ml olarak bulunmuştur. Çiçek-Kolak ve ark. *C.glabrata* suşlarında vorikonazol MİK aralığı, MİK₅₀, ve MİK₉₀ sırasıyla 0,25-1, 0,5, 1 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük değerler bulmuşlardır. (44) Karabıçak ve ark vorikonazol MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ sırasıyla 0.015-2, 0.25, 1 µg/ml olarak tespit etmişlerdir.(42) Lindberg ve ark nın çalışmalarında; MİK aralığı, MİK₅₀, ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.06–2 µg/ml, 0.25 µg/ml, 1 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük bildirilmiştir.(45) *C. glabrata* suşlarında Vorikonazol direncini Israel ve ark %4,6, Andersen ve ark.%66, Pfaller ve ark. 2001-2004 yılları arasında %10,3, 2005’de %9,5, 2006’da %10,2 ve 2007’de %9,4 olarak rapor etmişlerdir. (33,47,54)

Çalışmamızda *C.glabrata* suşlarının hepsi posakonazol için vahşi tip olarak bulunmuştur. MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,25-2, 1, 2 µg/ml’ dir. Rodriguez ve ark. çalışmamızla benzer şekilde tüm *C.glabrata* suşlarını posakonazol için vahşi tip olarak bildirmiştir. MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla sırasıyla <0,003-1, 0,25, 0,25 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük değerlerdir.(38) Lindberg ve ark yaptıkları çalışmada *C.glabrata* için posakonazol MİK aralığı, MİK₅₀, ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.12–2,1, 2 µg/ml olarak bizim çalışmamızla benzerdir. (45) Çiçek-Kolak ve ark posakonazol için *C.glabrata* suşlarının %61,5’ ini vahşi tip, %38,5’ ini vahşi olmayan tip olarak saptamışlardır.(44)

Daha önce yapılan birçok çalışmanın sonuçlarıyla tutarlı olarak bizim çalışmamızda da *C.tropicalis* suşlarının tamamı flukonazol duyarlıydı (38,41,42)

SENTRY sürveyans progamının verilerine göre 2006-2016 yılları arasında *C.tropicalis* suşlarında flukonazol direnci %3,2'dir. Bölgelere göre bakıldığında bu oran Asya-Pasifik'de %9,2, Avrupa'da %2,5, Latin Amerika'da %1,1 ve Kuzey Amerika'da %1,9'dir.(48) Ülkemizden Mete ve ark. çalışmalarının ilk peryodunda (2004-2008) hiç flukonazol direnci saptamazken, ikinci peryodda (2013-2017) % 8 flukonazol orta duyarlı suş saptamışlardır.(39) Diğer yandan *C.tropicalis* suşlarında flukonazol direncini; Israel ve ark %4,8 ; Tümtürk ve ark %14,3, Çiçek-Kolak ve ark %5,9 olarak rapor etmişlerdir.(39,44,50)

Bu çalışmada *C.tropicalis* suşlarının hiç vorikonazol dirençli suşa rastlanmazken suşların %15'i vorikonazole orta duyarlı olarak bulundu. Çiçek-Kolak ve ark *C.tropicalis* suşlarının %5,9'unu vorikonazol dirençli, %58,8 ise orta duyarlı olarak saptamışlardır.(44) ARTEMİS global antifungal sürveyans programının verilerine göre *C.tropicalis* suşlarında vorikonazol direnci; 2001-2004 yıllarında %6,1, 2005'de %4,5, 2006'da %3,8 ve 2007'de %5,1'dir.(47) *C.tropicalis* suşlarında vorikonazol direncini; Tümtürk ve ark %14,3; Karabıçak ve ark %8,3, Israel ve ark %8 olarak saptamışlardır.(33,42,50) Diğer yandan; Kılınçel, Rodriguez ve ark çalışmalarında *C.tropicalis* suşlarının tamamını vorikonazol duyarlı bulmuşlardır. (38,41) Mete ve ark ise çalışmalarının ilk peryodunda suşların tamamını vorikonazol duyarlı bulurken; ikinci peryodda *C.tropicalis* suşlarının %8'ini vorikonazol orta duyarlı olarak bildirmişlerdir. (39)

Çalışmamızda *C.tropicalis* suşlarının %8'i de posakonazol için vahşi olmayan tip(non-wild type) olarak bulundu. MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,032-0,19, 0,064, 0,125 µg/ml olarak belirlendi. Rodriguez ve ark. *C.tropicalis*'de posakonazol için MİK aralığı, MİK₅₀, ve MİK₉₀ değerlerini sırasıyla <0,003-0,12, >0,003, 0,006 µg/ml olarak bizim çalışmamızdan daha düşük bildirmişlerdir.(38) Çiçek-Kolak ve ark *C.tropicalis* suşlarının %70,6 'sı posakonazol için vahşi olmayan tip olarak, %29,4'ü vahşi tip olarak bulmuşlardır. Bu değerler bizim çalışmamızdan oldukça yüksek değerlerdir.(44) Mete ve ark çalışmalarının ilk peryodunda (2004-2008) *C.tropicalis* suşlarının tamamını posakonazol duyarlı bildirirken, ikinci peryodda (2013-2017) %54 posakonazol direnci bildirmişlerdir.(39)

Kaspofungin, anidulafungin ve mikafunginin tümü, azole dirençli suşlar dahil olmak üzere *Candida* türlerine karşı güçlü fungisidal aktivite gösterir. Ekinokandinlere duyarlılığı azalmış *Candida* izolatları yaygın değildir, ancak bu

ajanlarla uzun süreli tedavi gören hastalar arasında giderek daha fazla görülmektedir.(4)

Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının tamamı kaspofungine duyarlı bulunurken, suşların %90'ı mikafungin duyarlı, %10'u mikafungine orta duyarlı bulundu. Çiçek-Kolak ve ark. yaptığı çalışmada *C.albicans* suşlarının tamamı mikafungin duyarlı bulunurken, suşların %94,6'sı kaspofungin duyarlı %5,4'ü dirençli olarak bildirilmiştir. (44) İsrail de yapılan bir çalışmada da *C.albicans*'ın kaspofungin için %7,6'sı dirençli olarak rapor edilmiştir.(33) Erdoğan ve ark. çalışmalarında *C.albicans* suşlarının % 93.5'ini kaspofungine, %91.4'ü mikafungine duyarlı bulmuşlardır.(49)

Bu çalışmada *C.parapsilosis* suşlarının %14'ü mikafungine orta duyarlı, tamamı kaspofungin duyarlıydı. Erdoğan ve ark. *C.parapsilosis* suşlarında kaspofungin direncini %8,4, mikafungin direncini ise %42,1 olarak saptamışlardır.(49) Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde; Kılınçel ve ark. *C.parapsilosis* suşlarının %10'unu mikafungin orta duyarlı bildirmişlerdir.(41) Martí-Carrizosa ve ark ise *C.parapsilosis* suşlarında %1,5 kaspofungin direnci bulurken; hiç mikafungin direncine rastlamamışlardır.(51) Pfaller ve ark. yaptığı çok merkezli 20 yıllık bir dönemin incelendiği 5 peryoddan oluşan çalışmada, hiçbir peryotta *C.parapsilosis* suşlarında mikafungin ve kaspofungin direnci saptanmamıştır.(48) Çiçek-Kolak ve ark. ve Lindberg ve ark. benzer şekilde *C.parapsilosis* suşlarında hiç kaspofungin ve mikafungin direnci tespit etmemişlerdir.(44,45) Benzer şekilde Israel ve ark. ve Tümtürk ve ark. da *C.parapsilosis* suşlarında kaspofungin direncine rastlamamışlardır.(33,50)

Bizim çalışmamızda *C.glabrata* suşlarının %7'si mikafungine dirençli bulunurken; suşların %64'ü mikafungine, %7'si kaspofungine orta duyarlıydı. Çiçek-Kolak ve ark. çalışmalarında *C.glabrata* suşlarının tamamını kaspofungin ve mikafungine duyarlı bulmuşlardır. Tümtürk ve ark hiç kaspofungin direncine rastlamamıştır.(44,50) Anderson ve ark. *C.glabrata* suşlarında mikafungin direncini %1,6 olarak saptamışlardır.(54) Israel ve ark *C.glabrata* suşlarında kaspofungin direncini %33,6 olarak bildirmişlerdir.(33) SENTRY programının verilerine göre 2006-2016 yılları arasında *C.glabrata* suşlarının %3,5'i kaspofungine, %1,7'si mikafungine dirençli olarak rapor edilmiştir.(48) Erdoğan ve ark. %44,4 kaspofungin dirençli *C. glabrata* bulurken; hiç mikafungin direnci tespit etmemişlerdir.(49) Benzer

şekilde; Lindberg ve ark *C.glabrata* suşlarında hiç kaspofungin ve mikafungin direncine rastlamamışlardır.(45)

Çalışmamızda *C.tropicalis* suşlarının %15'i mikafungine orta duyarlı bulunurken, suşların tamamı kaspofungin duyarlıydı. Pfaller ve ark kaspofungin direncini %0,7, mikafungin direncini %0,6 olarak bulmuşlardır.(48) Israel ve ark *C.tropicalis*'de %7,4 kaspofungin direnci bildirirken; Erdoğan ve ark %22,2 kaspofungin direnci saptamış ve hiç mikafungin direnci saptamamışlardır.(33,49) Çiçek-Kolak ve ark çalışmalarında hiç kaspofungin ve mikfungin direncine rastlamamışlardır.(44)

Amfoterisin B ilk kez 1955 yılında *Streptomyces nodosus*' dan üretilmiştir. Etki spektrumu oldukça geniş olmasına rağmen nefrotoksisite geliştirmesi kullanımını sınırlamaktadır.(4)

Bu çalışmada *C.albicans* suşlarının %34'ü amfoterisin B için vahşi olmayan tip(non-wildtype) olarak bulundu. Çiçek –Kolak ve ark, Rodrigez ve ark, Sarah ve ark'larının çalışmalarında *C.albicans* suşlarının tamamını amfoterisin B için vahşi tip olarak bulmuşlardır.(33,38,44) Mete ve ark yaptıkları, 2004-2008 ve 2013-2017 olarak iki peryodun incelendiği çalışmada *C.albicans* suşları amfoterisin B için ilk peryotta tamamını vahşi tip olarak, ikinci peryotta ise % 5'ini vahşi olmayan tip olarak tespit etmişlerdir.(39) Diğer bir çalışmada Erdoğan ve ark. amfoterisin B için *C. albicans* suşlarının %3,5' uğunun vahşi olmayan tip olduğunu bildirmişlerdir.(49)

Çalışmamızda *C.parapsilosis* suşlarının %59'u Amfoterisin B için vahşi olmayan tip olarak bulundu. Mete ve ark. iki peryoddan oluşan çalışmalarında ilk peryodda (2004-2008) hiç amfoterisin B direncine rastlamazken; ikinci peryodda(2013-2017) suşların %21'i amfoterisin B dirençli olduğunu bildirmişlerdir.(39) *C.parapsilosis* suşlarında Amfoterisin B direncini Kılınçel ve ark %7,1, Erdoğan ve ark %5 olarak rapor etmişlerdir.(41,49) Martí-Carrizosa, Çiçek-Kolak, Israel, Rodriguez, Tümtürk ve ark. *C.parapsilosis* suşlarında hiç amfoterisin B direncine rastlamamışlardır.(33,38,44,50,51) Bizim çalışmamızda *C.parapsilosis* suşlarında amfotersin B direnci yapılan diğer çalışmalara göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada *C.glabrata* suşlarının %71'i amfoterisin B için vahşi olmayan tip(non-wild type) olarak belirlendi. Mete ve ark. çalışmalarında *C.glabrata* için ilk peryodda *C.glabrata* suşlarının tamamını amfoterisin B duyarlı bulurken; ikinci

periyotta % 28 amfotersin B dirençli suş bulmuşlardır.(39) Daha önce yapılan bir çok benzer çalışmada *C.glabrata* suşlarında amfoterisin B direnci bildirilmemiştir. (33,38,44,45,49,50,54,54)

Çalışmamızda *C.tropicalis* suşlarının %77'si amfoterisin B için vahşi olmayan tip(non-wild type) olarak bulunmuştur. Bizim bulgularımızın aksine birçok araştırmacı *C.tropicalis* suşlarının tamamını amfoterisin B' ye duyarlı yani vahşi tip olarak bildirmişlerdir.(33,38,44,49,50) Diğer yandan, Mete ve ark çalışmalarının ilk periyodunda (2004-2008) *C.tropicalis* suşlarının tamamını amfoterisin B'ye duyarlı olarak bildirirken, ikinci periyotta (2013-2017) %15 amfoterisin B direncinin olduğunu rapor etmişlerdir. (39)

Candida türlerinde azol direnci, hedef enzim lanosterol 14-a-demetilazı kodlayan gendeki (*ERG11*) nokta mutasyonları, *ERG11*'in aşırı ekspresyonu ve fungal atım pompalarını kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu sonucu gelişmektedir.(4) Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset ailesinden *Cdr1p* ve *Cdr2p* ile majör kolaylaştırıcı süper ailesinden (major facilitator superfamily) *Mdr1p* olmak üzere iki gruptur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ilaç atımında rol oynayan hücre membranı ile ilişkili taşıyıcıları kodlamaktadır. *MDR1* flukonazole, *CDR1* ve *CDR2* ise flukonazol, ketokonazol, itrakonazol gibi farklı azollere ve terbinafin, amorolfın gibi diğer bazı ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır.(3)

Çalışmamızda flukonazol dirençli *C.albicans1* suşu kontrol ATCC suşuna göre *ERG11*'i 2,07, *CDR1*'i 4,94, *CDR2*'yi 1,53 ve *MDR1*'i 1,51 kat daha fazla eksprese etmektedir. *C.albicans1* suşunda *ERG11* ve *CDR1* genleri over ekspresyon göstermektedir. Golabek ve ark.'nın 60 flukonazol duyarlı, 60 flukonazol dirençli toplamda 120 *C.albicans*'ı inceledikleri çalışmalarında *CDR2*, *MDR1* ve *ERG11* genleri ekspresyon seviyelerinde duyarlı ve dirençli grup arasında anlamlı fark bulunurken; *CDR1* geninde anlamlı fark bulunmamıştır.(55) Toe ve ark. 2 flukonazol dirençli 2 flukonazol doz bağımlı duyarlı (SDD) *C.albicans* suşunu inceledikleri çalışmalarında SDD suşlarda sadece *CDR2* overpresyonu saptanmıştır. Flukonazol dirençli suşların birinde *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin tümü overeksprese saptanırken; diğer dirençli suшта *CDR2* ve *MDR1* genleri overeksprese saptanmıştır. Hiçbir suшта *ERG11* geni overeksprese bulunmamıştır.(56) Mane ve ark. *CDR1* genini flukonazol dirençli ve SDD *C.albicans* suşlarında flukonazol duyarlı *C.albicans* suşlarına göre anlamlı olarak daha yüksek saptamışlardır. *CDR2* genini flukonazol

dirençli suşlarda duyarlı suşlara göre anlamlı olarak yüksek saptarken; *MDR1* ve *ERG11* genlerinde flukonazol dirençli, doz bağımlı duyarlı ,duyarlı gruplar arasında anlamlı fark saptamamışlardır.(57) Ülkemizde yapılan bir çalışmada flukonazol dirençli *C.albicans* suşlarının, flukonazol duyarlı ve kısmı inhibisyon gösteren suşlara göre *CDR1* ve *CDR2* genlerini daha fazla ekprese ettiği bulunmuştur. *MDR1* geninin flukonazol dirençli suşlarda daha fazla ekprese edildiğini ancak flukonazol kısmi inhibisyon gösteren suşlarda *MDR1* geninin mean değeri dirençli suşlardan daha yüksek bulunmuştur.(3) Fuentes ve ark. flukonazole 8 dirençli, 9 doz bağımlı duyarlı ve 10 duyarlı *C.albicans* 'ı incelediği çalışmalarında, flukonazol dirençli ve duyarlı *C.albicans* suşlarının kontrol ATCC suşu ile kıyaslanmaları sonucunda elde edilen gen ekspresyon seviyelerinde *ERG11* geni için iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır(p:0,621). *CDR1*(p: 0,016), *CDR2*(p:0,021) ve *MDR1*(p:0,006) genileri açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genini flukonazol dirençli grubun daha fazla ekprese ettiği bildirilmiştir. Doza bağımlı duyarlı ve duyarlı suşlar arasında tüm genler açısından anlamlı fark bulunmamıştır.(58) Liu ve ark. nın 12 azol dirençli *C.albicans* 'ı inceledikleri çalışmalarında *CDR1* ve *CDR2* geninde ekspresyon artışı saptarken; *ERG11* ve *MDR1* geninde artış tespit edememişlerdir. (59)

Çalışmamızda flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının tamamının *ERG11* ve *CDR1* genlerini over ekprese ettiği; *CDR2* genini ise bir suş hariç diğer 2 suşun(%67) over ekprese ettiği bulunmuştur. Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının tamamının dirençli suşlara benzer şekilde *ERG11* ve *CDR1* genlerini over ekprese ettiği; *CDR2* genini ise bir suş hariç diğer 10 suşun(%91) over ekprese ettiği bulunmuştur. Flukonazol dirençli ve doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarında iki grup arasında hiçbir gende anlamlı fark saptanmamıştır. Szweda ve ark. çalışmalarında 15 flukonazol dirençli *C.glabrata* suşunun 13'ünde(%86,6) ve 56 flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşunun 16'sında(%28,6) *CDR1* geninin referans suşa göre daha fazla ekprese edildiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada flukonazol dirençli suşların 5'i (%35,7) ve flukonazol doz bağımlı suşların 13'ü(%22,8) *CDR2* genini daha fazla ekprese ederken; *ERG11* geninin flukonazol doz bağımlı suşların 33'ünde(%58) daha fazla ekprese edildiği ancak flukonazol dirençli suşların hiçbirinde kontrol suşa göre fazla ekprese edilmediği bildirilmiştir.(60) Yao ve ark. 12 flukonazol dirençli, 47 flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşunu

inceledikleri çalışmalarında, *CDR1* ve *CDR2* genleri ekspresyon seviyeleri flukonazol dirençli grupta doz bağımlı duyarlı gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. *ERG11*, *PDR1* ve *SNQ2* genleri için iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. (61) Teo ve ark. çalışmalarında 5 flukonazol dirençli *C.glabrata* suşu incelemiş ve *CDR1* ve *CDR2* geni tüm suşlarda over eksprese bulunurken; *ERG11* geni hiçbir suшта over eksprese bulunmamıştır. (56) Farahyar ve ark. flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarında flukonazol duyarlı suşta *CDR1* ve *CDR2* genlerini over eksprese bildirmişlerdir.(62) Sanguinetti ve ark. çalışmalarında 16 flukonazol dirençli *C.glabrata* suşunun %75'inde(12/16) *CDR1*, %50'sinde (8/16) *CDR2* ve %50'sinde (8/16) *SNQ2* genini kontrol suşuna göre over eksprese saptamışlardır. *ERG11* geninde anlamlı artış tespit edememişlerdir. (63) Sakagami ve ark. çalışmalarında bir flukonazol dirençli *C.glabrata* suşu tespit etmiş ve suşun kontrol ATCC suşuna göre *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* genlerinin sırasıyla 41,9, 6,1, 2,8 kat daha fazla ekprese ettiğini bildirmişlerdir. Ancak *ERG11* geninde anlamlı artış tespit edememişlerdir.(64)

Çalışmamızda flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının %80'inde *ERG 11* ve *CDR1* geni over eksprese saptandı. *MDR1* geni ise flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının tamamında(%100) over eksprese saptandı. Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarının %80'inde *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genleri over eksprese saptandı. Sadece bir doza bağımlı duyarlı suшта hiçbir gen over eksprese saptanmadı. Flukonazol dirençli ve doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarında iki grup arasında hiçbir gende anlamlı fark saptanmadı. Neji ve ark. çalışmalarında flukonazole dirençli 4, doz bağımlı duyarlı 6 ve duyarlı 12 *C.parapsilosis* suşunu incelemişler ve flukonazol dirençli suşların 2'sinde, doza bağımlı duyarlı suşların 4'ünde *CDR1* ve *MDR1* genlerinin anlamlı seviyede yüksek bulmuşlardır. *ERG11* ve *MDR1* genini sadece bir flukonazol doza bağımlı suшта overeksprese bulmuşlardır. Flukonazol duyarlı suşların hiçbirinde hiçbir gende over ekspresyon bildirmemişlerdir. (65) Berkow ve ark. 35 flukonazol dirençli *C.parapsilosis*'i inceledikleri çalışmalarında, *CDR1* genini 16 suшта over eksprese saptarken, *MDR1* genini 3 izolatta çok yüksek seviyede(en düşük 25 kat) saptamışlardır. *ERG11* genini ise 8 izolatta over eksprese saptamışlardır.(66) Souza ve ark. 9 flukonazol dirençli *C.parapsilosis*'i inceledikleri çalışmalarında flukonazol varlığında tüm suşların *ERG11* ve *CDR1* genini overeksprese ettiğini, 2 suşun ise *MDR1* genini over eksprese ettiğini bulmuşlardır. (67)

Posakonazol kısmen uzatılmış yan zincirleri ile diğer azollere göre daha kompakt bir yapı gösterir. Bu yan zincirleri ile enzimin ek başka bölgelerine bağlanarak enzim over eksprese olsa bile enzimi yine de inhibe edebilir. Ayrıca *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri tarafından kodlanan atım pompaları posakonazolu diğer azollere kıyasla daha az derecede maya hücresi dışına atarlar.(68) Çalışmamızda flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının tamamı *CDR1* ve *ERG11* genini, %67'si *CDR2* genini ve flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının tamamı *CDR1* ve *ERG11* genini, %91'i *CDR2* genini over eksprese etmesine rağmen hiçbir şuşta posakonazol direnci görülmemiştir. Flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarında hiçbir şuşta posakonazol direnci görülmezken, flukonazol doz bağımlı duyarlı suşlarda sadece *C.parapsilosis8* suşunda posakonazol direnci görülmüştür.

Çalışmamızda *C.parapsilosis8* suşu flukonazol doza bağımlı duyarlı, vorikonazol orta duyarlı ve posakonazol için vahşi olmayan tip olarak bulundu. *C.parapsilosis8* suşu çalışmamızdaki *C.parapsilosis* suşları içerisinde tek posakonazol direnci gösteren suş olmasına rağmen *ERG11*, *CDR1* ve *MDR1* genlerinin hiçbirinde over ekspresyon görülmedi. *C.parapsilosis6* suşunda ise flukonazol MİK'i >256 µl/ml ile dirençli, vorikonazol orta duyarlı olmasına rağmen, *ERG11* ve *CDR1* genlerinde overekspresyon görülmedi. Sadece *MDR1* geninde 2,65 katlık bir over ekspresyon görüldü. Daha düşük MİK değerlerine sahip diğer *C.parapsilosis* suşlarında her üç gen de over eksprese saptanırken ya da daha fazla kat değişimi gösterirken, *C.parapsilosis6* suşunda bunun görülmemesi ve *C.parapsilosis8* suşu üç azole de duyarlı olmamasına rağmen hiçbir gende over ekspresyon saptanmaması azol direncinde bizim çalıştığımızdan başka mekanizmaların olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak *candida* türlerinde azol grubu antifungallere dirençte lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* geni ve atım pompa genleri *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1*'in over ekspresyon gösterdiği bulundu. Ancak azol direncinde sadece bu mekanizmaların değil bu çalışmada bakılmayan *ERG11* geninde mutasyon gibi daha farklı mekanizmaların da olabileceği sonucuna varıldı.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda uzun hastanede yatış süresi, immunsuprese hastalıklar, uzun antibiyoterapi gibi nedenlerden dolayı *candida* nedenli kan dolaşımı enfeksiyonları artmaktadır. Bu enfeksiyonlarda seçilecek ampirik ilaç büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık profilinin bilinmesi ampirik ilaç seçiminde oldukça önemlidir.

Çalışmamızda kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan 100 *Candida* suşu tanımlandı. %41 oranla en fazla izole edilen suş *C.albicans* oldu. Bunu *C.parapsilosis* (%22) *C.glabrata*(%14) ve *C.tropicalis*(%13) takip etti. Antifungal duyarlılık testi sonucunda *C.glabrata* suşlarında 3 flukonazol dirençli, 11 doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarında 5 flukonazol dirençli, 5 doz bağımlı duyarlı; *C.albicans* suşlarında ise sadece bir flukonazol dirençli suş görüldü. *C.tropicalis* suşlarında hiç flukonazol direncine rastlanmadı.

Flukonazol dirençli ve doz bağımlı duyarlı suşlarda azol direncinin moleküler mekanizmaları araştırıldı. Flukonazol dirençli *C.glabrata* suşlarının %100'ünde *ERG11* ve *CDR1* geni, %67'sinde *CDR2* geni over eksprese saptandı. Flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının %100'ünde *ERG11* ve *CDR1*, %91'inde *CDR2* geni over eksprese saptandı. Flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının % 80'inde *ERG11* ve *CDR1*, % 100'ünde *MDR1* geni over eksprese saptanırken; flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarının %80'inde *ERG11*, *CDR1*, *MDR1* genleri over eksprese saptandı. Flukonazol dirençli *C.albicans* suşunda ise *ERG11* ve *CDR1* genleri over eksprese saptandı. *C.albicans* suşlarında flukonazol dirençli suş sayımız sadece bir olduğu için azol direncinin daha net değerlendirilmesi için daha fazla suşa ihtiyaç vardır.

Flukonazol dirençli ve flukonazol doz bağımlı duyarlı gruplar arasında hiçbir gende anlamlı fark bulunmamıştır. Belirli bir döneme ait izolatları dahil ettiğimiz çalışmamızda, izolat sayısının az olması bu sonucu ortaya çıkarmış olabilir. Daha net sonuçlar için daha fazla suş sayısına ihtiyaç vardır.

Flukonazol dirençli ya da doz bağımlı duyarlı *C.glabrata* suşlarının hiç birinde posakonazol direncinin görülmemiştir. Flukonazol dirençli *C.parapsilosis* suşlarının tamamında ve flukonazol doz bağımlı duyarlı *C.parapsilosis* suşlarının %80'inde posakonazol duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlar bize bu tür flukonazol dirençli ya da

doz bağımlı duyarlı suşlarda posakonazolün tedavide kullanılabileceğini göstermektedir.

Flukonazol dirençli ya da doz bağımlı duyarlı olmasına rağmen hiçbir geni over ekprese etmeyen suşların bulunması, MİK değeri yüksek olmasına rağmen MİK değeri düşük olanlara göre daha az kat değişimi gösteren suşların olması azol direncinde farklı mekanizmaların olabileceğini ve azol direncinde kompleks birçok mekanizmanın birlikte rol alabileceğini düşündürmektedir. Bu durumun aydınlatılabilmesi için daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç vardır.



7.KAYNAKLAR

1. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. C. 10, Therapeutics and Clinical Risk Management. Dove Press; 2014. s. 95-105.
2. Tümbay E. Candida türleri. In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş (Ed.). 1999. bs. Ankara: öncü basımevi, güneş kitabevi; 1999.
3. Gülat S, Dereli MD. Flukonazole Dirençli Candida albicans İzolatlarında Atım Pompa Ekspresyonlarının Araştırılması. Mikrobiyoloji Bül. :10.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji Başustaoğlu AC(çeviren) 6.Baskı, Ankara: Atlas,2010
5. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-volume set. C. 2. Elsevier Health Sciences; 2014.
6. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg. 01 Nisan 1996;25(2):136-44.
7. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick Barbara, vd. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. New York: Mcgraw-Hill Education; 2016.
8. Pappas PG. Invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am. Eylül 2006;20(3):485-506.
9. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev. Ekim 1996;9(4):499-511.
10. Vandeputte P, Larcher G, Bergès T ve ark. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of Candida tropicalis. Antimicrob Agents Chemother. Kasım 2005;49(11):4608-15.
11. Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M ve ark. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). Epidemiol Infect. Haziran 2001;126(3):397-414.
12. Warnock DW. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007;48(1):1-12.
13. Erdem I, Ozgultekin A, Inan AS ve ark. Bloodstream infections in a medical–surgical intensive care unit: incidence, aetiology, antimicrobial resistance

- patterns of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 01 Ekim 2009;15(10):943-6.
14. Kenneth J. Ryan editor. Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases. Third edition. Norwalk, Conn. : Appleton & Lange, [1994] ©1994; 1994.
 15. Yang Y-L. Virulence factors of Candida species. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36:223-8.
 16. Ural O. Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi ve Korunma. Hastane İnfeksiyonları Derg. 2004;8:159-67.
 17. Yücel A, Kantarcioğlu AS. Candida'ların Patojenlik Belirtgenleri. Cerrahpaşa Tıp Derg. 2000;31(3):15.
 18. Birinci A, Cihan ÇÇ, Bilgin K ve ark. The investigation of slime production in Candida species. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2005;35:163-6.
 19. Gürcan Ş, Alver O, Ercan İ ve ark. Çeşitli Candida Türlerinde Virülansın Değerlendirilmesi: İn Vitro ve İn Vivo Çalışma. Türkiye Klin Tıp Bilim Derg. 2010;30(5):1493-502.
 20. Mishra NN, Prasad T, Sharma N ve ark. Pathogenicity and drug resistance in Candida albicans and other yeast species. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. Eylül 2007;54(3):201-35.
 21. Zuza-Alves DL, de Medeiros SSTQ, de Souza LBFC ve ark. Evaluation of Virulence Factors In vitro, Resistance to Osmotic Stress and Antifungal Susceptibility of Candida tropicalis Isolated from the Coastal Environment of Northeast Brazil. Front Microbiol. 15 Kasım 2016;7:1783-1783.
 22. Larone D. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. İçinde 1987.
 23. Procop GW, Church D, Hall G, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, vd. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, Pa: Lippincott, Williams & Wilkins; 2017.
 24. Yücel A, Kantarcioğlu AS. Candida albicans'ın Taksonomisinde Önemli bazı değişiklikler. Cerrahpaşa Tıp Derg. 1999;30(3):236-46.
 25. Ota F, Aslan G. Fungemi etkeni Candida türlerinin hızlı tanısında CHROMagar Candida besiyerininin kullanımı. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2006;5.
 26. Tille PM author. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. Thirteenth edition. St. Louis, Missouri : Elsevier, [2014]; 2014.

27. US AD. Temel İmmünoloji ve Seroloji Prof. Dr. Dürdal Us. Ankara: hipokrat kitapevi; 2016.
28. Susever S, Yeğenoğlu Y. İnvazif Mantar Enfeksiyonlarının Tanımlanmasında Moleküler Yöntemlerin Öneminin Konvansiyonel Yöntemler ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2011 45 2.
29. Arıkan S. Antifungal Duyarlılık Testleri Neredeyiz. infeksiyon.dergisi.org. 2007;21:069-70.
30. CLSI. Reference Method For Broth Dilution Susceptibility Testing Of Yeasts: Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Clin Lab Inst. 2012;32.
31. CiLo BD, Topaç T, Ağca H ve ark. Candida İzolatlarının Antifungal Duyarlılığının Belirlenmesinde Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bül. :14.
32. Hamidi AA, Kuru C. Kandidemi Oolgularında Candida türlerinin Dağılımı ve Sağ kalıma Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi. Online Türk Sağlık Bilim Derg. 30 Eylül 2020;5(3):474-81.
33. Israel S, Amit S, Israel A ve ark. The Epidemiology and Susceptibility of Candidemia in Jerusalem, Israel. Front Cell Infect Microbiol. 11 Ekim 2019;9:352-352.
34. Berrio I, Maldonado N, De Bedout C ve ark. Comparative study of Candida spp. isolates: Identification and echinocandin susceptibility in isolates obtained from blood cultures in 15 hospitals in Medellín, Colombia. J Glob Antimicrob Resist. Haziran 2018;13:254-60.
35. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN ve ark. Candidemia in Colombia. Biomed Rev Inst Nac Salud. 01 Mart 2020;40(1):195-207.
36. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G ve ark. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). Infection. 2013;41(3):645-53.
37. Guinea J. Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. Clin Microbiol Infect. 01 Haziran 2014;20:5-10.

38. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L ve ark. A multi-centric Study of Candida bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. PLoS One. 2017;12(4):e0175172.
39. Mete B, Zerdali EY, Aygun G ve ark. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(2):325-33.
40. Pfaller M, Diekema D, Gibbs D ve ark. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1366-77.
41. Kılınçel Ö, Akar N, Karamurat ZD ve ark. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2018;48(4):256-63.
42. Karabıçak N, Alem N. Antifungal susceptibility profiles of Candida species to triazole: application of new CLSI species-specific clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of antifungal resistance. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):122-32.
43. Akçam EA. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzlenen Kandidemi Olgularının Epidemiyolojik, Klinik ve Antifungal Duyarlılık Yönünden İncelenmesi, Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, 2009.
44. Çiçek-Kolak Ç, Erman-Daloğlu A, Özhak B ve ark. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde İzlenen Yetişkin Hastalarda Kandidemi Epidemiyolojisi, Candida Türlerinin Antifungal Duyarlılıkları ve Mortalite Üzerine Etkileri. İçinde 2017. s. 26.
45. Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N ve ark. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. Sci Rep. 2019;9(1):1-6.
46. Zhang H, Tan J, Kontoyiannis DP ve ark. Screening the in vitro susceptibility of posaconazole in clinical isolates of Candida spp. and Aspergillus spp. and

- analyzing the sequence of ERG11 or CYP51A in non-wild-type isolates from China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(2):166-70.
47. Pfaller M, Diekema D, Gibbs D ve ark. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366-77.
 48. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD ve ark. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. İçinde Oxford University Press US; 2019. s. S79-94.
 49. Erdogan E, Erdogan MM, Delen LA. Candidemia in adult intensive care units: Analysis of a 4 year process in a tertiary hospital in Turkey. *Ann Med Res*. 2020;27(11).
 50. Tümtürk A. Yoğun Bakım Hastalarında Görülen Kandidemide Tür Dağılımı ve Antifungal İlaçlara Karşı Direnç Gelişimi: Tek Merkez Deneyimi. *Med Sci*. 31 Ocak 2020;15(1):26-34.
 51. Martí-Carrizosa M, Sánchez-Reus F, March F ve ark. Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15-year period. *Scand J Infect Dis*. 01 Haziran 2014;46(6):454-61.
 52. Al-Baqsmi ZF, Ahmad S, Khan Z. Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-10.
 53. Pfaller M, Castanheira M, Lockhart S ve ark. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1199-203.
 54. Andersen K-M, Kristoffersen AK, Ingebretsen A ve ark. Diversity and antifungal susceptibility of Norwegian *Candida glabrata* clinical isolates. *J Oral Microbiol*. 2016;8(1):29849.
 55. Gołabek K, Strzelczyk JK, Owczarek A ve ark. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(2).

56. Teo JQ-M, Lee SJ-Y, Tan A-L ve ark. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1-4.
57. Mane A, Vidhate P, Kusro C ve ark. Molecular mechanisms associated with fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. *Mycoses*. 2016;59(2):93-100.
58. Fuentes M, Hermosilla G, Alburquenque C ve ark. Characterization of azole resistance mechanisms in Chilean clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia*. 2014;31(5):511-7.
59. Liu J-Y, Shi C, Wang Y ve ark. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. *Res Microbiol*. 2015;166(3):153-61.
60. Szweda P, Gucwa K, Romanowska E ve ark. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. *J Med Microbiol*. 2015;64(6):610-9.
61. Yao D, Chen J, Chen W ve ark. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China. *Infect Drug Resist*. 2019;12:771.
62. Farahyar S, Zaini F, Kordbacheh P ve ark. Expression of efflux pumps and fatty acid activator one genes in azole resistant *Candida glabrata* isolated from immunocompromised patients. *Acta Med Iran*. 2016;54(7):458-64.
63. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B ve ark. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):668-79.
64. Sakagami T, Kawano T, Yamashita K ve ark. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. *J Infect Chemother*. 2019;25(1):34-40.
65. Neji S, Hadrich I, Trabelsi H ve ark. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):1-16.

66. Berkow EL, Manigaba K, Parker JE ve ark. Multidrug transporters and alterations in sterol biosynthesis contribute to azole antifungal resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5942-50.
67. Souza ACR, Fuchs BB, Pinhati HM ve ark. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6581-7.
68. Hof H. A new, broad-spectrum azole antifungal: posaconazole—mechanisms of action and resistance, spectrum of activity. *Mycoses*. 2006;49:2-6.

