



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS*
SUŞLARINDA FLUKONAZOL DUYARLILIĞI, PROTEİNAZ
AKTİVİTESİ VE ERG11-SAP2 EKSPRESYONU İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. NAGİHAN EGE

DÜZCE-2023



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* SUŞLARINDA
FLUKONAZOL DUYARLILIĞI, PROTEİNAZ AKTİVİTESİ VE ERG11-SAP2
EKSPRESYONU İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. NAGİHAN EGE

TIPTA UZMANLIK TEZİ

PROF.DR. ŞÜKRÜ ÖKSÜZ

Tez Danışmanı

DÜZCE-2023

ÖNSÖZ

Bilgi ve tecrübeleri ile tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim süresince yardımını, desteğini ve zamanını esirgemeyen kıymetli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ'e; hem mesleki hem hayata dair bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Cihadiye Elif ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. İdris ŞAHİN'e ve Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN'a; uzmanlık eğitimim boyunca birlikte keyifle çalıştığım sevgili asistan arkadaşlarıma ve tez çalışmamın moleküler aşamasında çok desteği olan Ziya ERDOĞAN başta olmak üzere mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma;

Beni her iyi konuda cesaretlendiren, doğruluğun, iyiliğin ve vicdan sahibi olmanın en üstün erdem olduğunu öğreten, evlatları olduğum için her zaman çok şanslı hissettiğim anneme ve babama; her zaman yanımda olduklarını bildiğim, varlıkları ile mutlu olduğum kardeşlerime; uzmanlık eğitimim ve tez yazım sürecimde beni sabırla destekleyen, huzur ve neşe kaynakları olan sevgili eşime ve çocuklarıma teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada amacımız, *C. albicans* suşlarındaki flukonazol direncinin, suşların proteinaz aktiviteleriyle ve ERG11/ SAP2 genleri ile ilişkisi incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza, 01.08.2021- 01.08.2022 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen örneklerden, *Candida albicans* üremesi olan 127 örnekten izole edilen suşlar dahil edildi. İzolatların flukonazol MİK değerleri, EUCAST önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Flukonazol MİK değerlerinde 48. saatte yükselme durumu ve proteinaz aktiviteleri incelendi. Çalışmaya alınan 44 adet suşun ERG11 ve SAP2 gen ekspresyon seviyeleri real time qPCR ile ölçüldü. Relatif ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile hesaplandı. Bu seviyelerin birbirleri ile, flukonazol direnci ile, 48. saat MİK yükselmesi ve proteinaz üretimi ile ilişkileri incelendi.

Bulgular ve Sonuç: Çalışmamızda saptanan *C. albicans*'ta flukonazole direnç oranı, dünyada yakın tarihte yapılan çalışmalar ile benzerdir (%3,14). ERG11 VE SAP2 gen ekspresyon seviyeleri arasında pozitif bir lineer korelasyon saptanmıştır ($p<0,001$). İzolatların SAP2 ve ERG11 ekspresyon seviyeleri ile flukonazol dirençleri arasında ilişki bulunmamıştır. ERG11 ekspresyon seviyeleri ve 48. saat MİK yükselmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı varken ($p=0,037$), SAP2 seviyeleri ve 48. Saat MİK yükselmesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Aynı şekilde izolatların proteinaz aktiviteleri ve SAP2/ERG11 ekspresyon düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Flukonazol 48. Saat MİK değerleri yükselmesinin proteinaz aktivitesiyle ilişkisiz olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız PCR yapılan suş sayısı artırılarak ve dirençli duyarlı suş eşitliği sağlanarak tekrarlanabilir. Gelecekte, *Candida* enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü, SAP ailesi gibi virülans faktörlerini inhibe etmek için özel olarak modüle edilmiş farmakolojik veya immünolojik araçlarla sağlanabilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Candida albicans*, proteinaz, tolerans

ABSTRACT

Background: Our aim in this study is to examine the relationship between fluconazole resistance in *Candida albicans* strains, their proteinase activities and ERG11/ SAP2 genes.

Material and Method: Strains isolated from 127 samples with *C. albicans* growth were included in our study, from samples sent to Düzce University Faculty of Medicine Medical Microbiology Laboratory between 01.08.2021 and 01.08.2022. Fluconazole MIC values of the isolates were determined by the broth microdilution method according to EUCAST recommendations. The increase in fluconazole MIC values at the 48th hour and proteinase activities were examined. ERG11 and SAP2 gene expression levels of 44 strains included in the study were measured by real time qPCR. Relative expression levels were calculated by the $\Delta\Delta CT$ method. The relationships of these levels with each other, fluconazole resistance, 48th hour MIC elevation and proteinase production were examined.

Results: The fluconazole resistance rate in *C. albicans* detected in our study is similar to recent studies conducted around the world (3.14%). A positive linear correlation was detected between ERG11 AND SAP2 gene expression levels ($p < 0.001$). No relationship was found between the SAP2 and ERG11 expression levels of the isolates and their fluconazole resistance. While there was a statistically significant relationship between ERG11 expression levels and the 48th hour MIC increase ($p = 0.037$), there was no statistically significant relationship between SAP2 levels and the 48th hour MIC increase. Likewise, there is no statistically significant relationship between the proteinase activities of the isolates and SAP2/ERG11 expression levels. It was determined that the increase in fluconazole 48th hour MIC values was unrelated to proteinase activity. Our study can be repeated by increasing the number of strains for which PCR is performed and ensuring the equality of resistant-susceptible strains. In the future, prevention and control of *Candida* infections may be achieved by pharmacological or immunological tools specifically modulated to inhibit virulence factors such as the SAP family.

KEYWORDS: *Candida albicans*, proteinase, tolerance

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mantarların Genel Özellikleri, Sınıflandırma ve Hücre Yapısı.....	2
2.2. Tarihçe	4
2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	5
2.4. Patojenite ve Virülans Faktörleri	7
2.5. Virülans Faktörleri	7
2.5.1. Adezyon	8
2.5.2. Maya-Hif dönüşümü (Dimorfizm).....	9
2.5.3. Fenotipik dönüşüm.....	9
2.5.4. Biyofilm.....	10
2.5.5. Enzimler	11
2.6. Klinik Önemi.....	17
Mukokutanöz Kandidoz.....	17
2.7. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tanısı	18
2.7.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	19
2.6.2. Direkt Mikroskopik İnceleme	20
2.7.3. Kültür	21
2.7.4. Kültür Sonrası Tanımlama	22
2.6.4.5. Serolojik Testler	25
2.8. Antifungal İlaçlar ve Direnç	28
2.8.1. Azoller.....	30
2.8.2. Ekinokandinler	33
2.8.3. Polienler.....	34
2.8.4. Alilaminler	35
2.8.5. Diğer Ajanlar	36
2.9. Antifungal Duyarlılık Testleri	37
2.9.1. Mayalar için sıvı mikrodilüsyon yöntemi.....	38

2.9.2. Disk difüzyon testi yöntemi	39
2.9.3. Ticari test yöntemleri	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Suşların Seçimi, Saklanması ve Canlandırılması	43
3.2. <i>Candida Albicans</i> İzolatlarının Tanımlanması.....	43
3.2.1. Germ tüp testi	43
3.2.2. Mısır unu-tween 80 agarda mikroskopik değerlendirme	44
3.3. Proteinaz varlığının gösterilmesi	45
3.4. Flukonazol için Antifungal Duyarlılık Testi.....	46
3.5. Quantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT)	50
4. BULGULAR	54
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇLAR	73

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada en sık görülen invaziv sistemik mikoz etkenleri *Candida* türleridir (1). Bu sistemik mikozların önemli bir parçası olan kandidemilerde en sık karşılaşılan patojen tür *C. albicans*'tır (2,3). *C. albicans* pek çok farklı çevresel koşulda yaşayabilme özelliğine sahip bir mikroorganizmadır. Bu yeteneği nedeniyle insan vücudunda pek çok bölgede çoğalabilmekte ve özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüzeysel enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (4–6).

Candida albicans'ın flukonazol duyarlılığı ile ilgili son 20 yılda çalışmalar yapılan incelendiğinde, günümüze yaklaştıkça direnç oranının arttığı görülmektedir (7).

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 karşılaşmaktadır. *Candida* suşlarında azol direncinden sorumlu birçok mekanizma öne sürülmüş ve flukonazol direncinde birden fazla mekanizmanın birlikte rol aldığı belirlenmiştir. Bunların en önemlilerinden biri ilacın hedefi olan lanosterol demetilazda (Erg11p) ve ergosterol biyosentezinde değişikliktir (8).

Son yayınlarda *Candida albicans* virülans faktörlerinden olan proteinaz özelliğinin de flukonazol direnci ile ilişkili olabileceğine dair veriler olsa da, farklı ilaç direncine sahip *C. albicans*'ta *ERG11* ve en önemli proteinaz genlerinden olan *SAP2* ekspresyonu ile ilaç direnci arasındaki ilişki belirsizliğini korumaktadır (9).

Çalışmamız Düzce Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen örneklerin kültürlerinde üreyen edilen *Candida albicans* suşlarını tür düzeyinde tanımladıktan sonra, proteinaz özelliklerini, flukonazol duyarlılık ve tolerans durumlarını belirleyip, bu özelliklerin *ERG11* ve en önemli proteinaz genlerinden olan *SAP2* genlerinin ekspresyon seviyeleri ile ilişkisini incelemeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarların Genel Özellikleri, Sınıflandırma ve Hücre Yapısı

Mantarlar hem bitkilerden hem de hayvanlardan ve diğer organizma gruplarından birkaç önemli açıdan farklı olan ayrı bir yüksek organizma grubudur. Mikoloji, mantarlar alemini, onların genetik, biyokimyasal ve taksonomi özelliklerini ve kullanım alanlarını inceleyen bilim dalıdır. Bu sözcük Yunanca “şapkalı mantarlar” anlamına gelen “mykes” kelimesi kökenlidir (10).

Tarihsel olarak, mantarlar nispeten önemsiz enfeksiyon nedenleri olarak görülüyordu. Bununla birlikte, yirminci yüzyılın başlarından ortalarına kadar, bu mikroorganizmalar, özellikle hasta profillerindeki değişiklikler nedeniyle, önemli hastalık nedenleri olarak kabul edilmeye başlandı (11).

Günümüzde bilinen 100.000'den fazla geçerli mantar türü mevcuttur, ancak keşfedilmemiş türlerin sayısının 1 ila 10 milyon arasında değiştiği ve her yıl yaklaşık 1000 ila 1500 yeni tür tanımlandığı tahmin edilmektedir. Tanımlanan türlerden en az 500'ü insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu organizmaların çoğu normalde doğada saprofit (ölü veya çürümüş organik madde üzerinde yaşayan) yaşarlar. Klinik laboratuvarlarda görülen mantarlar genel olarak oluşturdıkları kolonilerin görünümüne göre mayalar ve küfler olarak iki gruba ayrılır. Mayalar, besiyerinde nemli, kremi, opak veya macunsu koloniler üretirken, küfler, kabarık, pamuksu, yünlü veya tozlu koloniler üretir. Ayrıca hem maya veya maya benzeri faz hem de filamentli formlar sergileyen sistemik mantar patojenleri, dimorfik mantar olarak adlandırılır. Dimorfizm sıcaklığa bağlı olduğundan, genel olarak, bu mantarlar 25°C ila 30°C'de küf formu ve 35°C ila 37°C'de maya formu koloniler üretir (11).

Hif üretmeyen ancak tomurcuklanan hücrelerin gevşek bir şekilde düzenlenmesinden oluşan mantarlara maya denir. Belirli koşullar altında, ana hücrenin tomurcuklanmadan önce devam eden uzaması, yalancı hifa olarak adlandırılan uzun hücrelerden oluşan bir zincirle sonuçlanır. Gerçek bir hifanın aksine, bitişik psödohifal hücreler arasındaki bağlantı belirgin bir daralma gösterir (12).

Maya mantarları içerisinde yer alan *Candida* türleri, kommensal olarak gastrointestinal ve genitoüriner mukozal yüzeyler ile derinin mikrobiyal florasında bulunan fırsatçı tek hücreli patojenlerdir. Konağın enfeksiyona karşı direncinin lokal veya sistemik olarak azaldığı durumlarda patojen olurlar. Bu gibi durumlarda, *Candidalar* insan vücudunun hemen hemen her yerinde yüzeysel, lokal olarak invaziv veya yayılmış enfeksiyona neden olabilirler. Günümüzde *Candida* enfeksiyonlarının prevalansı yüksektir ve hastaların *Candida*'ya duyarlı hale gelmesini kolaylaştıran değişiklikler, bu enfeksiyonların epidemiyolojisinde ve klinik sunumunda farklılıklara ve son 45 yılda insidansında istikrarlı bir artışa yol açmıştır (13–15).

Son yapılan sınıflandırmalarda, *Candida* cinsi; Fungi alemi, *Ascomycota* filumu, *Saccharomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımı, *Saccharomycetaceae* ailesine aittir (4,13,16). *C.albicans*, insan patojeni olan *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* ile beraber ayrı bir filogenetik alt grup olan “CTG clade” içinde yer almakta ve CTG kodonunu, lösin yerine serin olarak çevirmektedir (17). *Ascomycetes* filumunda eşeyli üreme, kese içinde gelişen eşeyli sporların oluşturduğu askospor ile karakterizedir. *Candida* cinsi içerisinde, eşleşme ve mayoz bölünmenin intakt olduğu haploid türler (*Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* gibi) ve seksüel yapıların gözlenmediği diploid türler (*C. albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candia tropicalis*, *C. parapsilosis*) yer almaktadır. Moleküler incelemeler ile tüm bu türlerin aynı filuma ait oldukları gösterilmiştir (18,19).

Candida 'lar; eşeyli üreme göstermeyen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* gibi *Deuteromycetes* sınıfı-*Cryptococcales* takımı içinde yer alanların yanı sıra; eşeyli üreme gösteren *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* gibi *Ascomycetes* sınıfı *Saccharomycetales* takımı içinde yer alanlarla yaklaşık 200 kadar tür içeren heterojen bir grup oluştururlar (15,20). Bu sayı yeni teknolojik gelişmelerin etkisiyle; bilinen türlerin yeniden adlandırılması ve yeni türlerin keşfiyle değişebilmektedir. Cins içerisinde *C. albicans*, mukozal ve sistemik kandidoz tablolarında sıklıkla izole edilen patojen türdür (4).

Candida 'lar Gram pozitif boyanma özelliğindedirler (10). Sabouraud dekstroz agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C'de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli, uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat yada parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar (5,11,21).

Candida türleri ökaryotik, genellikle oval veya yuvarlağımsı olup, 3 ile 6 µm büyüklüğünde, tomurcuklanma ile üreyen tek hücreli maya mantarlarıdır. Tomurcuklanan bu hücreler blastokonidya adını alır ve büyüyerek hif formu oluştururlar (14,21,22). Blastokonidyalılar birbirlerinden ayrılmadan uzayıp aralarında boğumlar bulunan hücre zincirleri yaparak yalancı hifleri oluştururlar (20,21). Gerçek hifler ise maya hücresi veya hifin bir dalından oluşabilir ve duvarları birbirine paralel olup, boğumlanma oluşturmazlar (20,21). *C. glabrata* hariç, tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir (14,21).

Candida albicans, insanlarda başlıca mantar patojeni ve mukozal ve sistemik mantar enfeksiyonunun en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir ve *Candida* türlerinin en iyi karakterize edilenidir (4). *Candida albicans* Corn Meal Agar'da (CMA) klamidospore yapıları oluşturur. Klamidosporelar yuvarlak, oldukça kırılğan ve dirençli aseksüel sporlardır. Klamidospore oluşumu ve bunun hif, psödohif ve diğer mantar yapılarıyla ilişkisi, *Candida* izolatlarının CMA üzerine inoküle edilmesiyle incelenebilir. CMA'ya inoküle edilen maya mantarlarının büyüme paterni mikroskopta doğrudan incelenebilir. Bu patern *Candida* izolatlarının tür ayrımı için kullanılabilir (23)..

Candida 'ların hücre duvarları bakterilerden farklı yapıdadır. Hücre duvarı içeriğinde polisakkaritler, mannan, glukan ve kitin bulunur. Glukan ve kitin komponentleri *Candida* hücre duvarı yapısının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (24). Hücre duvarının altında ana yapı elemanı ergosterol olan bir hücre membranı bulunur. Bu ergosterol bazı antifungal ilaçlar için hedef yapıdır. *Candida* 'ların sitoplazmasında diğer ökaryotik canlılarda olduğu gibi çeşitli organeller bulunur. Aynı zamanda *Candida* 'ların sitoplazmasındaki en büyük organeller vakuollerdir. Bu vakuoller hücre içi proteinlerin taşınmasında, iyon konsantrasyonu ve osmotik basıncın düzenlenmesinde görev alırlar (16).

2.2. Tarihçe

Mantar enfeksiyonlarıyla ilgili bilinen en eski belge ayakta miçetomadam bahseder ve MÖ 2000-1000 tarihlerine ait Hindu kutsal yazıtı olan Samhita'da bulunmaktadır. Hipokrat ve Galen (MÖ 400-300) pamukçuk şeklindeki lezyonları tanımlamıştır. Roma'lı ansiklopedist Aulus Cornelius Celsus, Vatikan Kütüphanesi'nde korunmakta olan 1772 tarihli De Re Medica'sında favus, yangılı ringworm ve ağızda kandidiyazdan bahsetmiştir. Bundan dolayı da irinli tinea capitis "kerion Celsus" olarak da adlandırılır (10,25)..

15. yüzyılın sonunda Syphilis şiiirinin sahibi hekim G. Fracastoro hastalıklarda germ teorisini ortaya atmış, pandemilerin çok küçük parçacıkların veya sporların doğrudan temasla taşınarak uzak mesafelere yayılması yoluyla gerçekleştiği kuramsallaştırılmıştır (26).

Antonie van Leeuwenhoek 1683'te diş kirini incelediği mikroskobunda maya hücrelerini görmüştür. 1771'de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini bildirmiştir. Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing ve Theodor Schwann 1836 -1838 yılları arasında mayaların yaşayan bir organizma olduğunu ve bunların mantar olarak tanımlanmasını savunmuşlardır (27).

E. Fries (1794-1878), bugünkü mantar sistematığının esasını kurmuş, "Systema Mycologicum" eserini hazırlamıştır (10).

1839 yılında Bernhard von Langenbeck, ilk kez bir hastanın ağız lezyonlarında mantar varlığını göstermiş, 1841 ve 1842'de Berg ve Gruby pamukçuğun fungal kökenli olduğunu yayınlamışlardır. 1849'da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda da olabileceğini göstermiştir (17).

Hansen 1888'de bu lezyonlardaki mantarı *Monilia* türü olarak sınıflamış, Zoph ise 1890'da *Monilia albicans* adını vermiştir. 1923'de Roth Berkhout pamukçuk etkeni mikroroganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirmiş ve *Candida* ismini önermiştir. 1853'te Charles-Philippe Robin pamukçuk etkeni olan mantarı "*Oidium albicans*" olarak isimlendirmiştir. O dönemden beri 100'den fazla isimle adlandırılan mantara şimdiki adı olan "*Candida albicans*" ise 1923 yılında Berkhout tarafından verilmiştir. 1954'te Paris'te düzenlenen 8. Uluslararası Botanik Kongresi'nde ise "*Candida*" tür adı resmen kabul edilmiştir (14,28).

2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Mantarlara bağlı gelişen enfeksiyonların dünya çapında bir milyardan fazla kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Fungal enfeksiyonlar nazokomiyal ve toplumla ilişkili olarak iki kategoriye ayrılabilir. Nazokomiyal mantar enfeksiyonları neredeyse her zaman fırsatçı mikozlardır. Toplumla ilişkili mantar enfeksiyonları ise sadece fırsatçı mikozları değil, aynı zamanda endemik mikozları da içerir (13).

Günümüzde 1500'ün üzerinde maya türü tanımlansa da bunların az bir kısmı uygun ortamda hastalığa neden olma yeteneğine sahiptir. Maya enfeksiyonları oluşması için intravenöz kateterler, yanıklar, cerrahi, diyabetes mellitus, geniş spektrumlu antibiyotik ve

steroid kullanımı, nötropeni, AIDS ve hücrel immün yetmezlikler gibi bazı risk faktörlerinin ihtiyaç vardır. İnvaziv maya enfeksiyonlarının büyük çoğunluğundan *Candida*'lar, invaziv *Candida* enfeksiyonlarının %90'dan fazlasından da beş tür sorumludur. Bu türler *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'dir (29,30).

Mantar enfeksiyonlarının yaklaşık %15-30'u hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlardır. Bağışıklığı baskılayıcı tedavi gören hasta sayısındaki artış, invaziv mikozların insidansını artırmaktadır (31). Ülkemizde yapılan epidemiyolojik bir çalışmaya göre, her yıl, ülke toplam nüfusunun yaklaşık %2,21'nin ciddi mantar enfeksiyonlarından etkilendiği öngörülmektedir (32).

Dünyada en sık görülen invaziv sistemik mikoz etkenleri *Candida* türleridir (26). Bu sistemik mikozların önemli bir parçası olan kandidemilerde en sık karşılaşılan patojen tür *C. albicans*'tır. (2,3). *C. albicans* pek çok farklı çevresel koşulda yaşayabilme özelliğine sahip bir mikroorganizmadır. Bu yeteneği nedeniyle insan vücudunda pek çok bölgede çoğalabilmekte ve özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüzeysel enfeksiyonlardan hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (4-6).

Candida türlerinin insan kommensalleri olarak prevalansı örneklenen bölgeye, popülasyona ve örnekleme yöntemine göre önemli ölçüde değişir. İnsan patojenleri olarak bilinen *Candida* türleri, gastrointestinal sistemde, mukokutanöz membranlarda, deride ve tırnakların altında norma flora üyesi olarak bulunur. İnsan hastalıklarıyla en sık ilişkilendirilen tür olan *C. albicans*, omurgalılar dışında hava, tatlı su, deniz suyu ve toprak gibi çeşitli kaynaklardan da elde edilmektedir. Nadiren gıda maddeleri ve fomitlerde, özellikle de giysiler, yatak takımları ve diş fırçaları gibi insanlarla doğrudan temas etmiş olan maddelerde canlı kalabilir (13,33). İnsanların GI kanalından en yaygın olarak izole edilen maya türü de *C. albicans*'tır. Ardından daha az sıklıkla *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* gelir (6).

Oral mikrobiyomun analizi, üç mantarın, *C. albicans*, *Cladosporium cladosporioides* ve *S. cerevisiae*'nin sağlıklı yetişkinlerin %25'inden fazlasını kolonize ettiğini göstermektedir (6,34).. Oral *Candida* kolonizasyonunun prevalansının sağlıklı kişilerde %2-37 ve hastanede yatan hastalarda %13-76 arasında olduğu bildirilmektedir (35). Düşük CD4 sayıları olan HIV ile enfekte hastalar (36), stomatitli protez kullanıcıları (37), diyabetik hastalar (38), antineoplastik kemoterapi alan hastalar (39,40) ve çocuklar gibi belirli popülasyonlarda oral kolonizasyon daha yüksek olabilir(41). Diyabetikler arasında, sigara içme ve takma dişlerin varlığı gibi faktörler de bu kolonizasyonu teşvik eder (13,38). İnsanların neredeyse %100'ü

bağırsaklarında bir veya daha fazla *Candida* türü taşıyabilir ve bağırsakların herhangi bir noktasında taşınan mayaların sayısı, hastalık veya konakçının mikrobiyal baskılama mekanizmalarının azaldığı durumlarda ağızda ve dışkıda saptanabilen seviyelere çıkabilir. Sağlam deri *Candida* türleri tarafından nadiren kolonize edilir ve deri örneklerinde baskın olan türler *C. albicans* yerine *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis*'tir (13). Ellerin veya fomitlerin sıklıkla kaynak olduğu nozokomiyal salgınlar dışında, kişiden kişiye bulaşmanın hastalık gelişimi üzerinde ihmal edilebilir bir etkisi vardır. Hastane ortamı, *Candida* türleri ile kolonizasyonun gelişmesini, kolonize olan daha az virülan türlerin daha virülan türlerle yer değiştirmesini kolaylaştırabilir (42). İnvaziv maya enfeksiyonları çoğunlukla hastanın immün durumu ilişkilidir; bu nedenle hastalığa neden olan mayalar, hastalığın oluşabileceği konak savunma sistemi bozukluğunda mevcut olmalıdır (6,43).

2.4. Patojenite ve Virülans Faktörleri

Bir organizmanın hastalık yapma yeteneği patojenite olarak tanımlanır. Virulans ise patojen mikroorganizmaların hastalık yapma gücüdür (44). Bir mantarın enfeksiyon oluşturabilmesi, konak ile arasındaki etkileşimin sonucu olarak gerçekleşir. Bu durum mantarın enfeksiyon oluşturma yeteneğine, konağın enfeksiyona karşı yanıtına ve konakta predispozan faktörlerin varlığına bağlı olarak değişkenlik gösterir (45)..

Konağın durumu, *Candida* patojenitesinin belirlenmesinde birincil öneme sahiptir. Aslında, *Candida* türleri fırsatçı patojenler olarak kabul edilir ve hastalığın meydana gelmesi için konak savunmasında bir bozulma olması gerekir. Bağırsak translokasyonu veya merkezi venöz kateterler yoluyla kan dolaşımına ulaşan *C. albicans* suşlarının, konak savunmalarıyla nasıl etkileşime girdiğini ve derin dokuları istila etmek için intravasküler bölmeden nasıl çıktığını gösteren kapsamlı bir model açıklanmıştır (46). Bununla birlikte, hastalığa neden olma kabiliyetine katkıda bulunan ve türler arasındaki patojenite farkını açıklayan organizma ile ilişkili faktörler vardır (13).

2.5. Virülans Faktörleri

Candida türlerinde çok sayıda virülans faktörü mevcuttur. Bu faktörler enfeksiyonun tuttuğu farklı bölgelerde ve enfeksiyonun farklı evrelerinde roller oynayabilir. Bilinen virülans

faktörlerinden bazıları adezyon, maya-hif dimorfizmi, fenotipik dönüşüm, biyofilm oluşturma, hidrolitik enzimler, normal veya ateşli vücut ısısında yaşayabilme (37°-39°C), konaktaki mikrodeğişikliklere hızlı uyum sağlayabilmedir (47). Ayrıca ortam pH'ı (48,49), kalsinörin (kalsiyumla düzenlenen bir sinyal enzimi) (50) ve konakçı dokuya (veya plastik yabancı cisimlere) ilk bağlanma ve ardından proliferasyona izin veren çoklu yapışma mekanizmaları yer alır. Bunlar, epitel hücrelerine kararlı bağlantılar oluşturmak için gereken hife özgü bir yüzey proteini olan Hwp1'i (51), tomurcuklanan mayadan filamentli bir forma geçişi düzenleyen genlerdeki mutasyonları (52), bir *C. albicans* yüzey proteinini (53) ve mannosil transferazı kodlayan bir geni (INT1) içerir (13,54).

2.5.1. Adezyon

Candida türlerinin çeşitli dokulara ve cansız yüzeylere yapışması enfeksiyonun erken evrelerinde önemli kabul edilmektedir. Çeşitli *Candida* türlerinin tutunma kapasitesi, deneysel modellerdeki virülans dereceleriyle doğrudan ilişkilidir. Adherans (ya da bağlanma), spesifik (ligand-reseptör etkileşimi) ve spesifik olmayan (elektrostatik, van der Waals kuvvetleri) mekanizmaların bir kombinasyonu ile sağlanır (55).

C. albicans ile ilgili son araştırmalar, bu mantarın çeşitli konak dokulara yapışmak için kullandığı birçok mantar adezini tanımlamıştır (56–58). Özellikle aglütinin benzeri sekans (ALS) gen ailesi, yoğun ilgi görmüştür. ALS gen ailesi, proteinlerin merkezi bölgesinde korunmuş ardışık tekrarların varlığı ile karakterize edilen en az sekiz üye içerir (57). Proteinlerin C-terminali, proteinleri mantar hücre duvarına bağlayan bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlantı bölgesi içerir (13).

Candida'daki adezinler ile diğer patojen mantar adezinleri arasında benzerliğin olmaması ilgi çekicidir. *Candidalar*ın substratlara adezyon yeteneği, her bir mantarın tipik olarak tutunduğu bölge için spesifiktir. *C. albicans*; *A. fumigatus* veya *C. neoformans*'ın aksine, konak dokulara yapışacak şekilde benzersiz bir şekilde yerleşir (13).

Candida'nın hücre yüzeyinin bileşimi, hücreye karşı bağışıklık tepkisini değiştirebilir. Hücre yüzeyindeki mannoproteinlerin glikozilasyon tipi ve derecesi, hücrenin hidrofobikliğini ve dolayısıyla kandidaların epitel hücrelerine yapışmasını etkileyebilir. *C. albicans*'ın germ tüpleri hidrofobikken, tomurcuklar veya blastoconidia hidrofiliktir. *C. albicans*'ın çeşitli glikoproteinleri de iyi anlaşılmamış mekanizmalarla mikroorganizmaya karşı bağışıklık yanıtını baskılar (55).

2.5.2. Maya-Hif dönüşümü (Dimorfizm)

Dimorfizm mayalarda, özellikle de *C.albicans*'ta, tek hücreli maya formundan psödohif ve bazen gerçek hif morfolojisine dönüşüm olarak bilinen önemli bir virulans faktörüdür. *Candida* türleri için, mikroçevredeki değişikliklere cevap vermenin bir yoludur. *Candida albicans*'ın hifleri, oluklar ve porlar boyunca büyümelerine izin veren ve epitelyal yüzeylere infiltre olmasına yardımcı olan tigmotropizm (dokunma hissi) sergiler (55).

Maya-hif dönüşümünün ilk aşaması germ tüp oluşumudur. Çeşitli formların (tomurcuklanan mayalar, psödohifler ve hifler) büyümesini tetikleyen faktörler; mikro çevrenin pH'ı, karbon ve nitrojen mevcudiyeti, oksijenlenme, serum, hormonlar ve enfekte konak içindeki *Candida* hücrelerinin yoğunluğudur (13,59).

Hif dönüşüm süreçlerin düzenlenmesinde birkaç genin yer aldığı düşünülmektedir. *C. albicans*'ta dimorfizmin klinik önemi bazen abartılmıştır. Maya formlarının komensal durumla ilişkili olduğu halde yalnızca hif formlarının istilacı olduğu doğru değildir: her iki form da konakçı dokulara nüfuz edebilir ve her iki form da potansiyel virülans faktörü niteliğindedir (13,60). Hem maya hem hif formları da insanlarda enfeksiyonun ilerlemesinde rol oynar. Tek hücreli tomurcukların devam eden oluşumu ve ayrılması, anjiyoinvazyonu takiben mayanın hematogen yayılmasını kolaylaştırabilir. Buna karşılık, filamentleşme hife dönüşüm *Candida* türlerinin dokuları istila etme yeteneğini artırır (13,17).

2.5.3. Fenotipik dönüşüm

Candida türlerinin bir morfolojik tipten diğerine hızla geçişi fenotipik geçiş olarak adlandırılmaktadır. Katı besiyerindeki *C. albicans* kolonileri, özellikle uzun inkübasyon sürelerinden sonra bazen şekil farklılıkları gösterir. Bir koloni formundan diğerine dönüşüm, genellikle tek bir koloniden sıralı alt kültürlerde yüksek sıklıkla (10^{-2}) meydana gelir. Orijinal fenotipik forma geri dönüş çok nadirdir. Bu dönüşüm sıklığı, gen mutasyonundan kaynaklanamayacak kadar yüksektir. Ayrıca fenotipik değişikliklerin oluşumu yoğun çevresel faktörlere bağlanamayacak kadarda düşüktür (13).

C. albicans kolonileri düzgün, halka, yıldız, çizgili, şapka, buruşuk, tüylü gibi morfolojik değişimler gösterirler. Bu dönüşüm, stres altında iken kendiliğinden gelişir ve hücre

yüzeyi özelliklerinde ve kolonilerin görüntülerinde ve de metabolik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkar; tüm bu değişimler enfeksiyon sürecinde daha virülan ve etkin olmak üzere düzenlenmektedir. Maya-hif geçişinden farklı olarak, fenotipik dönüşüm sürecinde, aynı çevresel koşullar altında aynı popülasyondaki bazı hücreler birbirinden değişik fenotipler sergilerler. Güncel olarak en iyi çalışılmış olan dönüşüm, kolonilerdeki WO-1 (White-opaque) (beyaz-opak) fenotipidir. Bu süreçte beyaz, oval ve düzgün koloniler, gri ve buruşuk kolonilere dönüşmektedir. Mikroskopik olarak, beyaz hücreler oval iken, opak hücreler uzamış ve fasulye şeklinde görünürler (61).

Katı kültür ortamlarında gözlemlenen farklı geçiş fenotiplerinin; tomurcuk ve hif oluşumu, hücre duvarı glikoproteinlerinin ifadesi, proteolitik enzim salgılanması, nötrofillerin oksidatif hasarına duyarlılığı ve antifungal duyarlılık ve dirençteki farklılıkları temsil ettiği artık bilinmektedir. Fenotipik geçiş, organizmanın mikro çevresindeki değişikliklere hızla uyum sağlamasına izin vererek, hayatta kalma, dokuları istila etme ve konak savunmasından kaçma yeteneğini kolaylaştırır. Bu şekilde fenotipik dönüşüm *Candida* türlerinin virülansına katkıda bulunur (55).

2.5.4. Biyofilm

Birçok mikroorganizma tek başına yaşamak yerine, ekolojik ortamlarında belirli substratlar üzerinde karmaşık topluluklar halinde büyür. Canlı veya cansız bir yüzeye bağlanmış halde bulunan ve dış polimerik bir matriksle çevrili olan mikrobiyal topluluklar biyofilm olarak adlandırılır. *C. albicans*, santral venöz kateterler, periton diyaliz kateterleri, üriner kateterler, eklem protezleri, yapay kalp kapakçıkları, pacemakerlar, ventriküloperitoneal şantlar ve arteriyovenöz fistüller gibi materyallerin üzerinde kolonize olarak biyofilm oluşturabilir ve ciddi enfeksiyonlara neden olabilir (13,62). *Candida* türlerinin yabancı cisimler üzerinde biyofilm oluşturması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynaması hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilmesi nozokomiyal mantar enfeksiyonları açısından önemli bir durumdur. Biyofilm varlığının yüksek mortalite ile ilişkili olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (63,64).

Biyofilm oluşumu, genetik olarak kontrol edilen bir olgudur, üç temel aşamada oluşumu gerçekleşir (65):

- Substrata bağlanma ve maya hücresi kolonizasyonu,
- Bazal tabaka oluşturmak üzere maya hücrelerinin büyümesi ve çoğalması,

- Psöдохif, hif uzaması ve bununla eş zamanlı bir hücre dışı matriks üretimi

Son veriler, *C. albicans* hücrelerinin belirli bir yüzeyin varlığını algılayabildiğini ve yanıt olarak biyofilm oluşumuna yol açan bir transkripsiyonel program başlattığını göstermektedir. Örneğin, bir polistiren yüzeyle temas ettikten sonra 30 dakika içinde maya hücreleri, yüzey temasıyla doğrudan ilişkili olan farklı bir transkript profili başlatır (13,66).

Daha ileri çalışmalar, biyofilmi organize eden mikrop topluluklarında, gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde quorum sensing'in (hücre-hücre konuşması) rolünü ortaya koymuştur. Bu sayede aşırı çoğalma ve besin maddeleri için rekabet kontrol edilir, ayrıca biyofilmin sağlamlaşmasına katkı sağlanır (61).

Biyofilmlerdeki antifungal aktivite, serbest yaşayan maya hücrelerine göre farklı olduğundan, bunun *Candida* enfeksiyonlarının klinik yönetimi üzerinde doğrudan etkileri vardır. Azol akış pompası genleri olan CDR1 ve MDR1, yüzey temasından sonraki altı saat içinde transkripsiyonel olarak indüklenir (67). Bu temas indüksiyonu, biyofilm hücrelerindeki azol direncinin artışıyla açıklamaya yardımcı olabilir (68). Biyofilmler, maya hücresi, psöдохif ve hif dahil olmak üzere *C. albicans*'ın üç formunu da içerir. Biyofilmi oluşturan mayaların ilaç direnci, bu heterojenitesinde ile açıklanabilir (69).

2.5.5. Enzimler

Candida türlerinin çeşitli enzimleri salgılama yeteneği de organizmanın patojenitesini etkileyebilir. *Candida* suşlarının dokulara penetrasyonunda rol oynayan önemli virülans faktörleri proteinaz, fosfolipaz, hiyaluronidaz, kondroitin fosfataz, kitinaz, esteraz, glukoamilaz, lipaz ve çeşitli glikolitik enzimlerdir. Bu enzimler arasında özellikle patogeneizde rol oynayan iki önemli grup proteinaz ve fosfolipazlardır (70). Birkaç *Candida* türü, enfeksiyona karşı savunmada yer alan konakçı proteinleri hidrolize eden ve mayaların bağ dokusu bariyerlerini aşmasına izin veren aspartil proteinazlar salgılar. Benzer şekilde, fosfolipazlar, insanlarda enfeksiyona neden olan çoğu *Candida* türü tarafından üretilir. Bu enzimler konak hücrelere zarar verir ve doku invazyonunda önemli kabul edilir (55).

Mantarın aracılık ettiği konak hücre hasarı, mantar virülansının önemli bir sonucudur. Mayalar konak hücre zarlarını bozarak membranının işlev bozukluğuna ve sonunda hücre ölümüne neden olur (71–73).

Fosfolipidler ve proteinler, konak hücre zarının ana kimyasal bileşenlerini temsil eder. Bu proteinleri hidrolize edebilen fosfolipazlar ve proteinazlar gibi enzimler, konak hücre zarını parçalama süreçlerinde yer alırlar. Bir çok fungal patojen, konak hücre membranının protein veya lipid bileşenini hedefleyen bu tür hücre dışı proteinleri salgılar. Sekretuar proteinler, mantar virülansından sorumlu faktörlerin önemli bileşenleridir. Bu mantar sekretuar proteinleri iki ana gruba ayrılmıştır: Fosfolipidleri hidrolize eden fosfolipazlar ve peptit bağlarını hidrolize eden proteinazlar (47,73–75).

2.5.5.1. Salgısal Asit Proteinazlar

Candida albicans'ın proteini tek nitrojen kaynağı olarak kullanmasını sağlayan proteolitik aktivite ilk olarak 1965 yılında tanımlanmıştır (76). Staib, *C. albicans* ile ilişkili bir proteolitik aktiviteyi gösteren ilk bilim insanıdır. Sonraki çalışmalar, biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerin ayrıntılı tanımlanmasına ve SAP kristal yapısının aydınlatılmasına yol açmıştır (73). Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan enzim, çok sayıda aspartik asit rezidüleri içerdiği için American Society for Microbiology tarafından 1993 yılında salgısal aspartik proteinaz adı ile kabul edilmiştir (77). Bunlar, pepstatin tarafından özgül olarak inhibe edildiği için, aynı zamanda bir “karboksil proteinaz”dır (78). Geni tanımlayan ‘SAP’ ve ilgili proteini tanımlayan ‘Sap’ kısaltmaları yaygın olarak kabul edilmektedir (79).

C. albicans'ta tanımlanan proteinazlar diğer mantarlarda da virülans faktörü olabilmektedirler. Salgılayıcı aspartik proteinazlar(SAP) ile ilgili proteolitik aktiviteler en az üç *Candida* türünde (*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) ve bazı *Aspergillus* türlerinde bulunmuştur (73).

Salgılanan aspartil proteinazlar, *Candida* enfeksiyonu durumunda hif üretimi, adezyon ve invazyon dahil olmak üzere çok önemli biyolojik aktivitelere aracılık ederler (80). SAP; protein denatürasyonu, gen regülasyonu, immünojenik tepkiler oluşturma, enzim inhibitörlerine dirençli olma gibi patojenik özellikleri yoluyla hayati önem kazanır (81–83).

Salgısal asit proteinazın virülans faktörü olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* kökenleri kullanılarak yapılmış ve yapılan çeşitli çalışmalarda proteinaz enzimi üretmeyen kökenlerin üretenlere oranla virülanslarının düşük olduğu, zayıf patojen oldukları ya da patojen olmadıkları gösterilmiştir (84).

Sap'lerin, konak hücre yüzey moleküllerini parçalayarak ve dokuyu bozarak *Candida* enfeksiyonlarının yayılmasına izin verirler. Sap'ler, konak hücre yüzeylerini değiştirmede, bağışıklık sistemi tepkilerini etkilemede ve ayrıca *Candida* hücrelerinin dokuya daha fazla yapışması ve istilasına izin vermede kritik faktörler olabilir (13,73). Salgılanan aspartil

proteinazlar (SAP'ler), albümin, hemoglobin, keratin ve salgısal immünoglobulin A gibi birçok insan proteinini lezyon bölgelerinde bozar (85). Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteden kaçmak için konağın bağışıklık sisteminin hücrelerine ve moleküllerine saldırabildiğine dair kanıtlar da vardır. *C. albicans*'ta yüksek hidrolitik aktivite olduğu bulunmuştur. Bu aktivite, Saps için en az 10 üyeli multigen ailelerine atfedilir. Bu gen ailelerinin farklı üyeleri, çeşitli *Candida* enfeksiyonlarında farklı şekilde düzenlenir (79).

Sap'lerin in vitro aktivitesi, sığır serum albümini (BSA) ile test edilir, ancak diğer substratlar da tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda saptanan gözlemler, Sap'lerin kandidal patojenitedeki olası rolüne ilişkin ipuçları sağlamıştır (73). Örnek olarak:

1. Bir çalışmada Asidik pH'ta proteolitik aktivite en yüksek *C. albicans*'ta saptanmış, ardından *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* bulunmuştur. Proteolitik aktivitenin sırası, bu türler arasında virülans sırası ile ilişkilidir: *C. albicans* en öldürücüdür, ardından *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gelir. Bu türlerin proteolitik aktiviteleri patojeniteleri ile ilişkili olduğundan, SAP'lerin *Candida* türlerinin önemli virülans belirleyicileri olabileceği öne sürülmüştür (73)

2. Başka bir araştırmada fare modelinde gerçekleştirilen deneysel kandidiyaz, daha patojenik *C. albicans* suşlarının, daha az patojenik suşlara göre daha yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğunu gösterdi (86). Daha sonra yapılan benzer çalışmalarda da *C. albicans* suşlarının proteolitik aktivitesi ile virülansı ve öldürücülüğü arasında korelasyon gösterilmiştir (87,88).

3. Yine yapılan klinik bir çalışma, vajiniti olan hastalardan izole edilen *C. albicans*'ın, vajiniti olmayan sağlıklı hastalardan izole edilenlere göre 1,7 kat oranında daha yüksek SAP üretimine sahip olduğunu göstermiştir (89).

4. Proteolitik olmayan mutant suşların farelerde daha az patojenik olduğu bulunmuştur (90,91). Ayrıca, proteolitik aktivitenin yarısını geri kazanan suşlar, neredeyse vahşi tip kadar öldürücü saptanmıştır (91). Benzer şekilde, proteinaz eksikliği olan bir suşun, proteolitik vahşi tip suşa kıyasla 1000 kat daha az öldürücü olduğu belirlenmiştir(47).

5. Yine deneysel olarak enfekte farelerin bir SAP inhibitörü olan pepstatin ile tedavisi, kandidal enfeksiyona karşı belirgin bir koruyucu etkiye neden olduğu tespit edilmiştir (92–94).

Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, salgısal proteinazlara olan ilgiyi artırmış ve bir SAP'nin saflaştırılmasına, çeşitli SAP'leri kodlayan genlerin klonlanmasına yol açmıştır (73).

Salgısal asit proteinaz enzimleri incelendiğinde, moleküler ağırlıkları, primer dizilimleri, izoelektrik noktaları ve biyokimyasal özellikleri farklı olan izoenzimlere sahip oldukları görülmüştür (95). Şimdiye kadar yürütülen çoğu çalışma, SAP protein

ekspresyonunun düzenlenmesi ve SAP aktivitesinin in vitro indüksiyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. SAP aktivitesinin, BSA, hemoglobin, keratin, kazein veya kollajen dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin varlığında ve asidik pH'ta indüklendiği görülmüştür (101,104,105). Proteolitik aktivite, *C. albicans*'a ait en az 10 üyeli bir multigen SAP ailesine atfedilir. Bu proteinazlardan sekizi (Sap1-8) hücre dışı boşluğa salgılanırken, Sap9 ve Sap10 zara bağlı GPI proteinleridir. Tipik aspartik proteinazlar olan bu izoenzimlerin çoğu asidik pH aralığında optimal aktiviteye sahiptir (79). Hem hücre döngüsü hem de çevresel koşullar SAP aktivitesini etkiler. SAP1, SAP2 ve SAP3 aynı suşta eksprese edilir; ancak bunların ekspresyon paterni, hücrenin opak-beyaz-switch fenotipine göre değişmektedir. SAP1 ve SAP3, opak hücrelerde; SAP2 ise *C. albicans*'ın WO-1 türü beyaz maya hücrelerinde eksprese edilir (98). SAP 2p'nin *Candida* türleri arasında en bol bulunan proteinaz olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle SAP proteinleri için açıklanan tüm özellikler SAP2p'yle ilişkilidir (73,99).

Northern blot analizi ile de doğrulanan bir çalışma da SAP1'in daha çok fenotipik dönüşüm esnasında eksprese edildiği gösterilmiştir (100). SAP gen ailesinin yedi (SAP1-7) üyesinin mRNA çalışmaları, SAP1 ve SAP3 ekspresyonunun, *C. albicans*'ın beyaz ve opak formları arasındaki fenotipik geçişle değiştiğini göstermiştir. Ayrıca yakın ilişkili SAP4, 5 ve 6'nın genlerinin ekspresyonunun, serumla indüklenen mayadan hife geçiş sırasında ve yalnızca nötr pH'ta olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada test edilen suşlarda SAP7 mRNA saptanmamıştır (101).

İn vitro çalışmalar, SAP 1, 2 ve 3'ün yalnızca maya formundaki hücreler tarafından eksprese edildiğini, SAP4-6 ifadesinin ise hiflerle sınırlı olduğunu göstermektedir. SAP 4, 5 ve 6'nın ekspresyonu nötr pH'ta mayadan hifaya geçiş yapan *C. albicans*'ta tespit edilmiştir. SAP7'nin ekspresyonu, laboratuvar koşullarında tespit edilmemiştir. 25°C'de büyütülen maya hücrelerinde SAP8 transkriptleri tespit edilmiştir ve SAP9'un tercihen daha sonraki büyüme fazlarında eksprese edildiği düşünülmüştür (73).

Hem bir in vitro oral kandidiyaz modeli kullanılarak hem de oral kandidiyaz hastalarından alınan klinik numuneler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, *Candida albicans*'ta SAP1-8 genlerinin sırasıyla en fazla SAP1 ve daha sonra azalan sıklıkla SAP3, SAP6, SAP2 ve SAP8 olarak yayıldığı gösterilmiştir. Kandidiyaziste bol miktarda bulunan SAP proteini SAP2 olmasına rağmen, SAP2 RNA ancak geç enfeksiyonlarda görülür. Bu çalışmalar, SAP ifadesinin zamansal düzenleme altında olduğunu göstermektedir (102). SAP9 gen ürünleri

henüz *C. albicans* kültürlerinden izole edilmemiş olmasına rağmen, SAP9 transkriptleri daha çok SAP8 ekspresyonunun azaldığı geç büyüme fazlarında gözlenmiştir (73,103).

SAP geni maya-hif dimorfizmi ve fenotipik değişim ile de ilişkilidir. SAP1, SAP2, SAP3 izoformları sadece maya formunda, SAP4, SAP5, SAP6'nın nötral pH'da hifal formda, SAP9, SAP10'nun her iki formda bağımsız bulunduğu gösterilmiştir. SAP genleri ile ilgili çalışmalar da en çok SAP2 geni üzerinde durulmuştur. İnsan epidermis modelinde SAP1 ve 2'nin üretiminin invazyonda, SAP8'in penetrasyonda, SAP6'nın hifal uzamada gerekli olduğu saptanmıştır (104).

SAP genlerinin in vitro ekspresyonunun detaylı analizi, tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren ortamda, 30–37°C'de, *C. albicans* maya formunda eksprese edilen ana proteinaz geninin SAP2 olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 25°C'de SAP8 proteini ve SAP8 transkript seviyeleri artar. Bu da bu genin ekspresyonunun sıcaklıkla düzenlendiğini düşündürür. SAP9 ve SAP10'un ekspresyonu, çevresel koşullardan bağımsız görünmektedir. Bunlar, yapısal olarak tüm büyüme formlarında eksprese edilir. SAP4–SAP6 genleri neredeyse tamamen nötr pH'ta hif oluşumu sırasında eksprese edilir (79). Ayrıca 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla enzim denatürasyonu gerçekleşir (85).

SAP enzimleri genellikle pH 2,5-4,5'te optimum aktiviteye sahiptirler. pH'ın 7'nin üzerine çıkarılması, dimerizasyonu içeren geri dönüşümsüz alkali denatürasyona neden olur (85). Salgısal asit proteinazın geniş bir substrat özgüllüğü sergilemektedir. *Candida* proteinazı, albumin, hemoglobin, kazein, müsin ve kollajen gibi birçok insan proteinini parçalayabilmektedir (105) Ayrıca insan IgG1, IgA1, IgA2 ve mukoz membranların major Ig'i olan salgısal IgA'yı parçalama yeteneğinde olduğu ve bu parçalanmanın genellikle ağır zincirde olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra muhtemel hedefler arasında $\alpha 2$ makroglobulin, koagülasyon faktör X ve anjiotensinojen de yer almaktadır (79,104).

Gelecekte, *Candida* enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü, SAP ailesi gibi virülans faktörlerini inhibe etmek için özel olarak modüle edilmiş farmakolojik veya immünolojik araçlarla sağlanabilir (79).

SAP2 en sık eksprese edilen SAP genidir; proteinaz içeren ortamda logaritmik büyüme sırasında neredeyse tüm *C. albicans* suşlarında eksprese edilir ve bu gen ailesinin karmaşıklığının anlaşılmasından önce yapılan çoğu çalışma, büyük olasılıkla bu proteinazın özelliklerini ve karakteristiklerini tanımlamıştır (105).

Tablo 1. *C. albicans* 'ın salgısal aspartik proteinazları (73)

Gen Ailesi	Beyaz /Opak Maya Formu	Sıcaklık Ve Mantar Formu
SAP1	Opak formda eksprese edilir.	25°C
SAP2	Hem opak, hem maya form	25°C' de maya formunda ekprese edilir, 37°C'de hif formunda ekprese edilmez
SAP3	Opak form	25°C
SAP4-6	-	37°C, hif formunda eksprese edilir.
SAP7	Sessiz veya çok zayıf ekspresyon	
SAP8-9	Hem opak, hem maya form	25°C

2.5.5.2. Fosfolipazlar

Fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerin bir veya daha fazla ester bağlantısını hidrolize etme kabiliyetine sahip heterojen bir enzim grubudur. Bu enzimler fosfolipitleri parçalayarak hücre lizisini indükler ve böylece doku invazyonunu kolaylaştırır. Hücre dışı fosfolipazlar, *C. albicans*'ın yanı sıra, *Aspergillus fumigatus* veya *Cryptococcus neoformans* ve *Clostridia* türleri, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* türleri, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* ve *Entamoeba histolytica* gibi birçok patojenik mantar, bakteri ve protozoa için de virülans faktörleri olarak kabul edilirler. Fosfolipaz aktivitesi, mantarlarda hifin büyüyen ucunda yoğunlaşır ve hücre dışı fosfolipazın doku istilasını için gereklidir. (79,106,107).

Kosta ve ark. (108) ve Werner (109), *C. albicans*'ı yumurta sarısı veya lesitin içeren besiyerinde üreterek ve lipid parçalanma ürünlerini analiz ederek hücre dışı fosfolipazların salgılandığını ilk defa gösterdiler. Daha sonra, serum ve koyun eritrositlerini içeren ortam kullanılarak birçok patojenik *C. albicans* suşunda fosfolipaz aktivitesi bulunmuştur (73).

Biyolojik zarların ana bileşeni olan fosfolipid molekülündeki hedefe etki şekline göre farklı fosfolipazlar tanımlanmıştır. Örneğin fosfolipaz A, fosfolipaz B, fosfolipaz C ve fosfolipaz D gibi farklı alt sınıflar *C. albicans*'ta tespit edilmiştir (79,99,110,111). Yapılan çalışmalar *C. albicans*'ın yayılması için fosfolipazların gerekli olabileceğini göstermektedir (79).

2.6. Klinik Önemi

Candida türleri insanda ağız, gastrointestinal sistem ve vajende endojen mikrobiyota üyesi olarak bulunurlar. Bu türler ile gelişen enfeksiyonlar, aft, vulvovajinit, onikomikoz ve kutanöz kandidoz gibi yüzeysel enfeksiyonlardan kandidemi şeklinde görülen fırsatçı invaziv enfeksiyonlara kadar değişebilmektedir (112).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Candida* türlerinin, büyük ölçüde kontaminant olarak kabul edilen nadir patojenlerden, geniş bir yüzeysel ve derin hastalık yelpazesine neden olan önemli ve yaygın insan patojenlerine doğru ilerlediğini göstermiştir (107).

Candida albicans insanlarda kandidozun en sık etkenidir. Kan dolaşımıyla dokulara yayılarak hızlı üreme gösterir. *Candida albicans*'ın etken olduğu başlıca üç klinik tablo; mukokutanöz, kutanöz ve sistemik enfeksiyonlardır (102).

Mukokutanöz Kandidoz

Oral kavite ve vajinal mukoza, mukoz membran kandidozunda en sık tutulan bölgelerdir. İnsanda kandidozun en sık klinik tablolarından biri, pamukçuk olarak da bilinen oral kandidozdur. 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 Gram boyalı direkt mikroskopik incelemede, karakteristik olan yalancı hif ve blastokonidyanın görülmesi ile tanımlanabilir. Uzun süre antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen 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 tamamında rastlanır (102).

Kutanöz Kandidoz

Deri enfeksiyonları sıklıkla el, ayak ve parmak araları, kasık çizgileri ve kadınlarda meme altı gibi nemli kıvrımlı bölgelerde gelişir. Onikomikoz veya paronişi, tırnak çevresindeki deri katlantısının enfeksiyonuna verilen isimdir. Sık gözlenen bir diğer klinik tablo da, yenidoğanda bebek bezi dermatidir. Kronik mukokutanöz kandidoz; deri ve mukoz membranlarda, lökosit fonksiyonu veya endokrin sistemin baskılanması gibi çeşitli genetik bozukluklar sonucu gelişen fırsatçı bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyonun gelişiminde rol

oynayan hazırlayıcı faktörler arasında; hipogamaglobulinemi varlığı veya yokluğu ile seyreden timik displazi, hipoparatiroidizm ve fagositlerde fagositoz sonrası mayaların öldürülememesine yol açan miyeloperoksidaz eksikliği ile karakterize kronik granümatöz hastalık yer alır (102).

Yaygın Kandidoz

Sistemik kandidoz, diğer klinik tablolardan daha nadir görülür. Öncelikle düşkün hastalarda, neoplazi ve immun sistemi baskılayan hastalıkların varlığında, son dönemde gelişir. Organ transplantasyonu sonrası, özellikle de akut rejeksiyon sendromu sırasında da enfeksiyon görülebilir (102).

Üriner Sistem Kandidozu

Çok nadirdir. Ya mesane enfeksiyonunun yukarı çıkışı ya da uzak bir primer enfeksiyonun hematogen yayılımı sonucu gelişen sistit ve piyelonefrit tabloları şeklinde ortaya çıkar. Glomerülde histolojik olarak psödohif ve blastokonidya kümeleri gözlenebilir. Na⁺ ve H⁺ iyon değişimine bağlı olarak düşen pH ile oluşan mikroçevre, mayanın burada çoğalmasına olanak sağlar (102).

Fungemi ve Endokardit

Candida albicans, fungeminin en sık görülen etkenidir. Kan izolatlarının %50-60'ını oluşturur. Fungemilerin birçoğu intravasküler kateterle ilişkilidir. *Candida* endokarditi en sık, önceden kalp kapak hastalığı olan kişilerde gözlenir (102).

***Candida* Menenjit**

Gastrointestinal veya solunum sistemi enfeksiyonlarının yayılmasına, enfektif kalp kapağından kaynaklanan septik emboliye, travmaya ya da nörocerrahi komplikasyonuna sekonder olarak gelişen *Candida* menenjit, nadir gözlenen bir klinik tablodur. Yapılan çalışmalarda kalıcı serebrospinal şant ile ilişkisi gösterilmiştir (102).

2.7. *Candida* Enfeksiyonlarının Tanısı

Kandidiyazisin laboratuvar tanısı, uygun klinik materyalin temin edilmesini ve ardından doğrudan mikroskopik inceleme, kültür ve diğer biyokimyasal, serolojik, moleküler testleri içerir (4).

Günümüzde giderek artan sayıda mantar patojeniyle ilgili ciddi enfeksiyonlar rapor edilmektedir. Hemen hemen her mantar, bağışıklığı baskılanmış bir konakçıda ölümcül bir mikoza neden olabilir. Yüksek riskli bağışıklığı baskılanmış hastalarda, fırsatçı mantar enfeksiyonlarının erken teşhisine öncelik verilmesi önemlidir. Riskli hastalarda bu tür enfeksiyonların başarılı erken teşhis edilmesi ve yönetilmesi, büyük ölçüde klinisyenleri, mikrobiyologları ve patologları içeren bir ekip yaklaşımına bağlıdır (13).

2.7.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Her tür enfeksiyöz süreçte olduğu gibi, mantar enfeksiyonunun laboratuvar tanısı numunelerin klinik laboratuvara uygun şekilde iletilmesine bağlıdır. Kültür ve mikroskopik inceleme için örneklerin seçimi, yalnızca klinik muayene ve radyografik çalışmalardan elde edilen bilgilere değil, aynı zamanda belirli bir enfeksiyon türüne neden olabilecek en olası mantar patojeninin değerlendirilmesine de dayanır (13,55).

Numuneler aseptik olarak veya numune alınacak alanın uygun şekilde temizlenip dekontaminasyonundan sonra alınmalı, hızla laboratuvara ulaştırılmalıdır. Numuneler, mümkün olduğunca steril, sızdırmaz bir kapta ve klinik öykü ile sunulmalıdır. Ne yazık ki laboratuvara gönderilen birçok örnek ya yetersiz miktarda ya da kalitesiz ve klinik bilgi eksikliğiyle birlikte olup tanı koymada yetersiz kalmaktadır. Klinik bilgiler, numune işleme ve sonuçların yorumlanması açısından laboratuvar çalışmalarına rehberlik etmede çok önemlidir. Özellikle balgam, bronşiyal sıvı ve cilt gibi steril olmayan bölgelerden alınan örneklerin sonuçlarını yorumlarken hasta ile ilgili klinik bilgiler yararlı olmaktadır. Ayrıca klinik bilgiler, laboratuvar personelini potansiyel olarak tehlikeli bir patojenle karşı karşıya olabilecekleri konusunda uyarır. Mantarların çoğu, taşıma besiyerinde getirilen örneklerden üretilir. Yine de taşıma besiyeri bileşenlerinin mantarların gözlemlenmesini engelleyebileceğinden bu tür materyallerin doğrudan mikroskopik incelemesi önerilmez. Genel olarak, örnekleri işlemede bir gecikme kaçınılmazsa, kültür için numune kısa bir süre için 4°C'de güvenli bir şekilde saklanabilir (13,55).

Bakteriyolojik inceleme için alınan örneklere benzer şekilde, mantar enfeksiyonlarının teşhisinde diğerlerinden daha iyi olan bazı örnekler vardır. Swap örnekleri mikolojik kültür ve mikroskopik inceleme için uygun değildir. Kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer steril vücut sıvıları kültürleri, klinik belirti ve semptomlar bu bölgelerin hematogen yayılımını veya tutulumunu düşündürüyorsa yapılmalıdır. Deri lezyonlarından biyopsi alınmalı ve materyal

hem histopatolojik inceleme hem de kültür için gönderilmelidir. Oral veya vajinal mukozal enfeksiyonların tanısı, hastanın klinik durumu ve mukozal kazıntı veya sekresyonların doğrudan mikroskopik incelemesi ile daha iyi konabilir. Benzer şekilde, gastrointestinal sistemin mantar enfeksiyonlarının tanısı, tek başına kültür yerine biyopsi ve ilgili dokunun histopatolojik incelemesi ile daha iyi konur. Alt solunum yolu veya idrar örnekleri alınırken, flora ile kontaminasyonu en aza indirmek için özen gösterilmelidir. Yirmi dört saatlik balgam veya idrar örnekleri mikolojik inceleme için uygun değildir (5,13,55).

2.6.2. Direkt Mikroskopik İnceleme

Doku kesitlerinin ve klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesinin mantar enfeksiyonlarını teşhis etmenin en hızlı ve uygun maliyetli yollarından biri olduğu kabul edilir. Dokudaki mayaların veya hif yapılarının mikroskopik tespiti bir saatten daha kısa sürede gerçekleştirilebilirken, kültür sonuçları günler hatta haftalarca elde edilemeyebilir. Mikroskopik inceleme, çoğu zaman birçok mantarın tanımlanması için gereken tek şeydir. Mantara bağlı olarak cins ve türlerin tanımlanması, karakteristik yapıları tasvir etmek için daha ayrıntılı mikroskopik inceleme gerektirir (55).

Mantarları doğrudan klinik materyalde tespit etmek ve karakterize etmek için bir dizi farklı boyama ve mikroskopik teknik kullanılabilir. Klinik mikoloji laboratuvarında en sık kullanılan yaklaşımlar, preparatların floresan veren kalkoflor beyazı, Gram boyama veya Giemsa boyalarıyla boyanmasıdır. Kalkoflor beyazı, mantarların hücre duvarlarındaki kitin tabakasını boyayarak mantarların daha kolay ve daha hızlı tespiti için kullanılan floresan veren bir boyadır. Belirli durumlarda mantar; ayırt edici bir morfolojiye sahip olduğu için, mikroskopi ile yalnızca tespit edilmeyebilir, aynı zamanda tanımlanabilir. Ancak bazen *Candida*, *Trichosporon* veya bir *Mucor* ailesi üyesinin dokudaki morfolojik görünümü, enfeksiyon teşhisini sağlayabilse de, enfeksiyona neden olan gerçek mantar türleri, kültür sonuçlanana kadar bilinmemektedir. Mantarları doğrudan klinik materyalde tespit etmek ve karakterize etmek için bir dizi farklı boyama ve mikroskopik teknik kullanılabilir (55).

Klinik materyalin, Gram, Giemsa, periyodik asit-Schiff (PAS) veya Calcofluor boyaları ile doğrudan mikroskopik incelemesi, *Candida*'da görülen tomurcuklanan maya hücreleri- psödohif karakteristik kombinasyonunu hızla tanımlayabilir. Kandidemiden şüphelenilen hastalarda, mikroskopta özellikle maya araması istenirse kan yaymalarının Wright-Giemsa boyası incelenmesiyle erken tanı konulabilir. Gram boyama, *Candida* veya *Cryptococcus* gibi

mayaların ve *Aspergillus* gibi küf mantarların tespiti için kullanışlıdır. Maya mantarları tipik olarak Gram pozitifdir ancak parsiyel boyanabilir veya Gram negatif görünebilir. Hematoksilen ve eozin (H&E), Gomori metenamin gümüşü (GMS) ve periyodik asit-Schiff (PAS) boyaları dahil olmak üzere sitolojik ve histolojik boyalar, çeşitli sıvı ve dokularda *Candida*'yı tespit edebilir. Bununla birlikte, birkaç mantar elemanı beraber olduğunda H&E boyası yetersiz olabilir. Bu durumda, GMS ve PAS boyaları daha az miktardaki mantarı tespit edebilir ve morfolojilerini daha iyi tasvir eder. Gerektiğinde, *Candida*'ya özgü immünofloresan boyalar, olası bir histolojik tanımlamayı doğrulayabilir (13,55).

Fikse edilmiş dokunun histolojik incelemesi, mantarın dokuyu istila edip etmediğini veya sadece yüzeysel olarak bulunup bulunmadığını belirleme fırsatı sağlar; bu bilgi enfeksiyon ve kolonizasyon arasında ayırım yapılmasına yardımcı olur. Doğrudan mikroskopik inceleme ile doku ve klinik materyaldeki spesifik mantar elemanlarının saptanması, klinik örneğin kültürü için en uygun yöntemin seçilmesinde ve sonuçların anlamlı olup olmadığını belirlemede genellikle faydalı olur. Mikroskopi, kültürden daha az duyarlıdır ve negatif mikroskopik inceleme mantar enfeksiyonunu ekarte etmez (13,55).

Tüm *Candida* türleri, tek tek, zincirler halinde veya küçük, gevşek kümeler halinde yuvarlak-oval tomurcuklanan, 3-6 µm çapında maya hücreleri oluşturur. Çoğu *Candida* türü, dokuyu istila ederken hem yalancı hif hem de gerçek hif oluşturur. Psödohifler aslında uzamış ve birbirinden ayrılmamış blastokonidia zincirleridir. Septadaki belirgin daralmalardan tanınabilirler; ayrıca, psödohifal dallanma yalnızca septasyon bölgesinde meydana gelir. Gerçek hiflerde septa yoktur veya çok az görülür. Blastokonidia, her iki hif türünün kenarları boyunca gelişir (5).

2.7.3. Kültür

Bir mantar enfeksiyonunu teşhis etmenin en duyarlı yolu, genellikle mantarın kültürde üretilmesi olarak kabul edilir. Çoğu durumda, etiyolojik ajanı spesifik olarak tanımlamak ve endike ise çeşitli antifungal ajanlara in vitro duyarlılığı belirlemek için kültür gereklidir. Mantarların klinik materyalden optimum şekilde üretilmesi, yeterli ve uygun klinik numune varlığına ve az miktarda olan ve yavaş üreyen organizmaların da üreyebileceği kültür yöntemlerinin kullanılmasına bağlıdır. Tıbbi açıdan önemli tüm mantarları izole etmek için tek bir besiyeri yeterli değildir ve genellikle seçici ve seçici olmayan en az iki tür besiyerinin

kullanılması gerekir. Seçici olmayan besiyeri, hızla büyüyen maya ve küflerin yanı sıra daha yavaş büyüyen güç üreyen mantarların büyümesine izin verir. Mantarlar, bakteriler için kullanılan çoğu besiyerinde ürer; ancak üremeleri yavaş olabilir ve beyin kalp infüzyon (BHI) agar veya SABHI (Sabouraud dekstrozu ve BHI) agar gibi daha zenginleştirilmiş bir besiyeri gerekir (13,55).

Candida türleri 35°C'de kloramfenikol ve gentamisin içeren Sabouraud agar (pH 5.6) gibi standart mikolojik besiyerlerinde ve kanlı agar, beyin-kalp infüzyon agar ve triptoz agar dahil birçok bakteriyel besiyerinde iyi ürerler. Sikloheksimid, kandidal büyümeyi inhibe ettiği için *Candida* türleri ile ilgili laboratuvar araştırmalarına dahil edilmemelidir. Bakterilerle kontamine olabilecek numuneler, antibiyotiklerle desteklenmiş SABHI veya BHI gibi seçici besiyerlerine (penisilin artı streptomisin sıklıkla kullanılır) inoküle edilmelidir (55). Bakteriyel büyümeyi engelleyen ve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* ve *C. krusei*'nin tahmini tanımlamasını sağlayan CHROMagar *Candida*® gibi koloni rengine göre *Candida*'yı ayırt edebilen besiyerleri kullanılarak tür tanımlaması için gereken süre kısaltılabilir (13).

Oral lezyon, vajen veya idrardaki maya kültürleri kromojenik besiyerinde en az 48 saat, rutin besiyerinde ise beş ila yedi gün tutulurlar. Ekim yapılmış besiyerleri, dehidrasyonu önlemek için gaz geçirgen bantla kapatılmalıdır. Bir mantar izolatının klinik öneminin belirlenmesi, hastadan sorumlu klinisyene danışılarak yapılmalıdır (5,107).

Kültürde maya benzeri mantarları küflerden ayırt etmek, bir mantar izolatını tanımlamanın ilk adımıdır. Koloni morfolojisi genellikle iyi bir ipucu sağlar. Maya benzeri mantarlar opak ve macunsu koloniler oluşturur. Küfler ise doku renk bakımından farklı büyük, iplikli koloniler oluşturur (55). *C. albicans* krem renkli, düzgün yüzeyli ve macunsu koloniler şeklinde görünür. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde (kanlı veya çikolata agar gibi) koloninin sınırında yaygın uzantılar gelişir. CHROMagar'da *C. albicans* kolonileri yeşil renkte görülür (5).

Maya tanımlaması genellikle ek biyokimyasal ve fizyolojik testler gerektirirken hem mayaların hem de küflerin tanısı, özel immünolojik, moleküler ve proteomik yöntemlerle konulabilir (55).

2.7.4. Kültür Sonrası Tanımlama

2.7.4.1. Germ Tüp Testi

Germ tüp testi “Reynolds-Braude fenomeni” olarak bilinir. Tıbbi önemi olan *Candida* türleri arasında *C. albicans* ve *C. dubliniensis* germ tüp üretir. Bu türlere ek olarak, *C. africana*’da da germ tüp oluşumu gözlenir. Germ tüpü testi pozitif olan klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin %90’ı *C. albicans*’dır. Laboratuvarların çoğu germ tüp pozitif mayaları daha fazla test yapmadan *C. albicans* olarak rapor ederler (23).

Eğer bir izolat, monomorfik tek tip bir maya kolonisi oluşturuyorsa, geleneksel olarak tanımlamada ilk adım, germ tüp oluşumunu göstermektir. Germ tüp, maya hücresinin filamentöz uzantısına verilen isimdir ve ana maya hücresinin yaklaşık yarısı genişliğinde ve üç dört katı uzunluğundadır. *C. albicans* tarafından üretilen germ tüp gerçek hif yapısının ilk başlangıç fazıdır ve başlangıç yerinde, yalancı hif için karakteristik olan daralma bulunmaz. Germ tüp oluşumu gözlemlendiğinde *C. albicans* ön tanımlaması yapılabilir. Tüm *C. albicans* suşları germ tüp oluşturmaz; bu yüzden, germ tüp oluşumu gözlenmediğinde, kültür biyokimyasal testlere tabi tutulmalı ve mısır unlu agara ekim yapılmalıdır (102).

Germ tüp testi için genel olarak insan serumu kullanılsa da birçok laboratuvar, insan serumu kullanımı ile ilişkili güvenlik sorunları nedeniyle yumurta akı, tükürük, koyun serumu, pepton suyu ve triptikaz soya suyu gibi alternatif proteinli ortamlara kaymıştır. İnkübasyonun ikinci saatinde germ tüp oluşumu anlamlı kabul edilir. Germ tüp oluşumu negatif demek için minimum 10 alanın incelenmesi ile gerekir (23).

2.7.4.2. Mısır Unlu Agarda Üreme Şekilleri

Tween 80’li mısır unlu agar, *Candida* türlerinin üretilmesinde ve mikroskopik özelliklerinin değerlendirilerek ayırt edilmesinde kullanılır. Klamidospor oluşumu ve bunun hif, psödohif ve diğer mantar yapıları ile ilişkisi, birincil kültürden *Candida* izolatlarının Mısır Unlu agar üzerine ekilmesiyle incelenebilir. Mısır unlu agar plak tekniği aynı zamanda 'Dalmau plak yöntemi' olarak da bilinir. Mısır unlu agarına tween-80 (polisorbate) eklenmesi klamidospor oluşumunu ve psödohif, hif ve blastokonidia gelişimini destekler (5). Klamidospor oluşumu için mısır unlu agarına ek olarak pirinç özü agarı, kazein agarı, ayçiçeği tohumu agarı, tütün agarı ve Staib agarı gibi başka besiyerleri de kullanılabilir.

C. albicans’ta, rutin primer besiyerlerinde maya hücreleri, yuvarlak-oval (3.5–7 X 4–8 µm) görülür. Cornmeal-Tween 80 agar’da (Dalmau plak tekniği ile) 25°C sıcaklıkta 72 saatte, psödohifler (ve bazı gerçek hifler) yuvarlak blastokonidia kümeleriyle oluşur. Karakteristik

olarak büyük, kalın duvarlı, genellikle tek terminal klamidosporlar oluşur. Lamel kenarına yakın kenarlarda daha fazla görülürler. 30–37°C’de klamidospor oluşumu inhibe olur (5).

C. dubliniensis'te klamidospor oluşumu *C.albicans*'tan farklıdır. *C. dubliniensis*'te klamidosporlar, *C. albicans*'ta tek tek hifal (veya psödohifal) uçlardan ziyade aynı askıdaki hücreye çiftler, üçlüler veya daha büyük kümeler halinde bağlanır. Yine de suştan suşa paternler çeşitli olabilir. Bu iki türün ayrımı için ek testler gerekir (23).

2.6.4.3. Kromojenik Agarda üreme özellikleri

Kromojenik besiyerinin kullanıma sunulması, mayaların doğrudan ve hızlı tanımlanmasını kolaylaştırmıştır ve özellikle karışık kültürlerin saptanması ve ayrılması için faydalıdır. Bu besiyerleri, türe özgü enzimler tarafından hidrolize edilen kromojenik substratlar ve ortama bağlı olarak ikinci bir enzim olan β glukozidaz veya fosfataz içerir. Bu da, koloni özelliklerine ve renk gelişimine dayalı olarak mayaların tür düzeyinde tanımlanmasına neden olur (12).

CHROMagar, klinik açıdan önemli mayaların izolasyonu için kullanılan ayırıcı ve seçici bir besiyeridir. Besleyici bazı pepton ve glikozdur. Kloramfenikol bakterileri inhibe ederek ortamı seçici hale getirir. İçeriğindeki kromojenik karışım, birçok maya türünün farklılaşmasına olanak tanır. Örneğin *C. albicans* sarı yeşil ile mavi yeşil koloniler oluşturur. Koloni morfolojisinin yanı sıra ayırt edici renk paternlerinin, maya türlerinin tahmini tanımlanmasında güvenilir olduğu gösterilmiştir (12).

2.6.4.4. Biyokimyasal Testler

Candida türlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek diğer testler karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleridir. Substrat asimilasyonu, bir organizmanın kimyasal olarak saf substratların varlığında büyümesine dayanır ve mayaların ve maya benzeri mantarların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır. Belirli bir izolatin, tek karbon kaynağı olarak bir dizi karbonhidratı asimile etme yeteneği, geleneksel olarak *Candida* türlerini tanımlamada kullanılmıştır. Bu testin popüleritesi, yöntemin göreceli basitliğine, düşük maliyetine ve standartlaştırılmış protokollerin hazır bulunmasına bağlanabilir (113).

Karbohidrat fermantasyonu, *Candida* türlerini ayırt etmek için yararlı bir test olmasına rağmen, bu testin karbonhidrat asimilasyon testinden daha az duyarlı olduğu ve dolayısıyla daha az güvenilir olduğu düşünülmektedir. Fermantasyon testleri genellikle sıvı ortamda yapılır ve asit ve/veya karbondioksit üretiminin gösterilmesine dayanır. Bu fizyolojik testlerin

gerçekleştirilmesi, özellikle yüksek miktarda numunenin çalışıldığı laboratuvarlarda zaman alıcı ve zahmetli olduğundan, artık rutin olarak yapılmamaktadır (113).

Candida albicans için glikoz, maltoz, galaktoz, ksiloz, trehaloz asimilasyon testleri; glukoz, maltoz, galaktoz, trehaloz fermentasyon testleri pozitifdir (12).

2.6.4.5. Serolojik Testler

Ciddi mantar enfeksiyonları için hızlı, duyarlı ve spesifik tanı testleri, terapötik önlemlerin zamanında ve odaklanmış şekilde uygulanmasına izin verecektir. Bu nedenle, antikorların ve antijenlerin, metabolitlerin ve mantara özgü nükleik asitlerin saptanmasına yönelik testler büyük ilgi görmektedir. Birkaç istisna dışında, bu tür testler hala referans laboratuvarları ile sınırlı kalsa da son yıllarda bu alanların birçoğunda önemli ilerleme kaydedilmiştir. Serumda antikor (Ab) ve/veya antijen (Ag) titrelerinin belirlenmesi, mantar enfeksiyonlarının teşhisinde ve hastanın tedaviye yanıtını izlemede faydalı olabilir. Ancak antikorlara yönelik çoğu test, histoplazmoz ve koksidioidomikoz harici invaziv mantar enfeksiyonlarının teşhisi için hem duyarlılıktan hem de özgüllükten yoksundur. Serum veya diğer vücut sıvılarında mantar hücre duvarı ve sitoplazmik antijenler ve metabolitlerin saptanması, invaziv mantar enfeksiyonunun serolojik tanısını sağlamanın en doğrudan yoludur. Bu yaklaşımın en iyi örnekleri, *C. neoformans* ve *H. capsulatum*'un polisakarit antijenlerinin tespiti için piyasada bulunan testlerdir. *Aspergillus* galaktomannan ve *Candida* mannan ve anti-mannan tespitine yönelik immünolojik testler artık piyasada mevcuttur (55,114).

Tablo 2 . İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında antijenik, biyokimyasal ve moleküler markerlar (55)

Markerin bulunduğu yer	Markerlar
Hücre Duvarı veya Kapsül Komponenti	Mannanlar
	1,3-β-glukanlar
	Kitin
Sitoplazmik antijenler	Enolaz
	HSP-90'nın 47-kD yıkım ürünü
Metabolitler	d-Arabinitol
Genomik DNA Sekansları*	Aktin

	Kitin sentaz
	P450
	ITS
	Ribozomal RNA genleri

*Tüm sekanslar PCR ile tespit edilmiştir.

HSP-90, heat shock protein-90; *ITS*, internal transcribed spacer.

Son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında *Candida* türlerine özgül antikor ve antijenler, metabolitleri ve hücre duvarı bileşenlerini saptamaya yönelik testler geliştirilmiştir (Tablo 2). Bu testler özel hasta gruplarında kandideminin doğrulanmasında yardımcıdır (115). Kandidoz olgularında antijen ölçümü antikor ölçümüne göre daha yararlıdır (116). Serolojik açıdan antikor tarama testleri kolonizasyon-enfeksiyon ayrımını yapamaması, gözlenen çapraz reaksiyonlar ve özellikle immün yetmezlikli hasta grubunda yeterli antikor yanıtı oluşmaması gibi nedenlerle başarısızdır. Antijen testleri ile mannan, galaktomannan, asit proteaz, enolaz, *C. albicans*'ın ısıya duyarlı antijenleri gibi sitoplazmik antijenler aranmaktadır. Duyarlılığı çok yüksek olmayan bu testler, diğer tanı yöntemleriyle desteklenmelidir (12,16,21,117).

2.6.4.6. Moleküler Testler

Mantar enfeksiyonunun saptanması için ideal moleküler yöntemler, ciddi enfeksiyonun erken saptanmasını sağlayarak hastanın zamanında tedavi edilmesini sağlar. Ayrıca kolonizasyon ya da kolaylıkla tedavi edilebilecek yüzeysel enfeksiyonları invaziv veya yaygın, hayatı tehdit eden yayılmış enfeksiyonlardan ayırt eder; bilinen patojenik mantarların çoğunu saptar; uygun tedaviyi daha iyi ele almak için cins ve tür düzeyinde ayrım yapar. Ek olarak, insan, bakteriyel, viral ve protozoon DNA dizileri ile çapraz reaktivite olmaması, etkili bir moleküler deneyde gerekli olan önemli bir faktördür. Son olarak, hastalık seyrinin ve tedavinin etkinliğinin izlenmesine izin veren kantitatif yöntemler, klinisyenlerin tedaviyi hastalık yanıtına uygun şekilde değiştirme olasılığını artırır (73).

Moleküler yöntemleri kullanarak enfeksiyonların tanısını koymaya yönelik erken girişimler, klinik numunede bulunan az miktardaki hedef DNA ile ilgili teknik sınırlamalar nedeniyle başarılı olmamıştır. 1980'lerde polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) gelişmesiyle bu engel aşılmıştır. PCR tekniği, küçük miktarlarda spesifik dizilerin tespit edilebilir seviyelere amplifikasyonuna izin verir. Bugüne kadar, patojenik mantarların teşhis amacıyla PCR kullanımı en çok *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* için incelenmiştir. Diğer mantar patojenlerinden DNA saptamak için PCR kullanımına ilişkin sınırlı sayıda çalışma vardır. Mantar DNA dizileri son birkaç on yılda incelendikçe, hem yüksek

düzeyde korunmuş bölgeler hem de türe özgü değişken bölgeler için problemler keşfedilmiş ve tanımlanmıştır (73).

Klinik örneklerde mantar DNA'sının saptanması ve tanımlanması için ilk moleküler yaklaşım 1990'da bildirilmiştir (118). Bu çalışmada, *Candida* türlerinde bulunan ancak muhtemelen bakteri veya insanlarda bulunmayan sitokrom P450 lanosterol-14 alfa-demetilazdan (mevcut terminoloji ERG11, Cyp51A) bir gen bölgesi araştırmışlardır. Bu genin özelliği, *C. albicans* içinde tek kopya halinde bulunmasıdır (114).

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) klinik materyalde mantara özgü nükleik asitleri doğrudan tespit etmek için uygulanması, mantar enfeksiyonlarının hızlı teşhisi için büyük umut vaat etmektedir. Çeşitli hedef sekanslar araştırılmış ve daha yaygın fırsatçı ve sistemik mantar patojenlerinin çoğu için potansiyel tanısal değere sahip oldukları bulunmuştur (Tablo 2). Gerçek zamanlı, gen çipi teknolojisi ve nanoteknolojinin manyetik rezonans tespiti ile birleştirilmesi gibi son gelişmeler, çoğu mikoloji laboratuvarında henüz mevcut olmasa da, bu teknolojinin geniş çapta kullanımını kolaylaştıracaktır. İnvaziv kandidiyazis tanısında PCR'nin yakın tarihli bir meta-analizi, test numunesi olarak tam kanın, multilokus panfungal hedeflerin (ör. rRNA, P450 gen hedefleri) ve mililitrede 10 koloni oluşturan birimden (CFU/ml) yüksek olmayan bir in vitro saptama sınırının kullanılmasının optimum duyarlılık ve özgüllük sağladığını bulunmuştur (55).

Şu anda piyasada ticari olarak birkaç PCR testi bulunmaktadır: *Candida* ve *A. fumigatus*'un çeşitli türlerini tespit edebilen Septifast by Roche (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN); MycAssay (Myconostica, Cambridge, BK) ve invaziv aspergilloz tanısı için AsperGenius (PathoNostics, Maastricht, Hollanda) bunlardan bazılarıdır. Kandidiyazis için en umut verici testlerden biri, beş *Candida* türünü kültüre ihtiyaç duymadan doğrudan tam kanda tespit edebilen T2*Candida* testidir (T2Biosystems, Lexington, MA). Hem iyi hassasiyete hem de özgüllüğe sahiptir ve pozitifleşme süresini kısaltmıştır. T2*Candida* testinin tespit sınırı 1(bir) CFU/ml'dir (55).

Candida albicans ve diğer kandida türleri, mantar enfeksiyonlarının çoğundan sorumlu olmasına rağmen, diğer mantar türleri de benzer klinik gösterebilir. Bu da yalnızca mantar DNA'sını saptamakla kalmayan, aynı zamanda enfeksiyöz ajanı belirlemek için kullanabilen moleküler testlere odaklanmaya yol açmıştır. Yapılan çalışmalarda spesifik mantarları ayırt etmek veya tanımlamak için üç ana teknik araştırılmıştır: Restriksiyon fragmanı uzunluk

polimorfizmi (RFLP), amplikonun türe özgü bir prob ile hibridizasyonu ve tek iplikli konformasyonel polimorfizm (SSCP) analizi. Hedefe veya kullanılan restriksiyon enzimine bağlı olarak, bu tekniklerin tümü, insan DNA'sının parmak izi alınmasında kullanılabenzer mantar DNA parmak izi sağlayabilir. RFLP teknikleri, farklı türlerde veya gruplarda bulunan restriksiyon bölgelerinin konumlarındaki küçük farklılıklara dayalı olarak değişen uzunluklarda fragmanlar üreten amplifiye edilmiş DNA ürünlerini ayırır. SSCP'nin temel stratejisi, amplikondaki baz çifti farklılıklarının saptanmasıdır. Türe özgü problemlerin PCR'den türetilen amplikonlarla hibridizasyonu, muhtemelen mantar türlerini ayırt etmenin en spesifik yöntemidir. Bununla birlikte, her bir potansiyel patojen için prob gerekliliği, bu teknolojinin yararlılığını en sık görülen türlerle sınırlamaktadır. Kullanılan spesifik teknolojiye bağımsız olarak, PCR veya diğer amplifikasyon yöntemlerinin kullanımı çok sayıda laboratuvar tarafından araştırılmaktadır ve çoğu araştırmada PCR'nin duyarlılığının şu anda kullanılan diğer teşhis teknolojilerinden genellikle daha iyi olduğu görülmektedir (73).

2.8. Antifungal İlaçlar ve Direnç

Araştırmacılar uzun ve yavaş gelişme döneminden sonra, geçtiğimiz on yıl, kimyasal modifikasyon yoluyla (triazoller) kullanılan bir antifungal sınıfının spektrumunun genişlemesine, önemli bir yeni antifungal ajan sınıfının (ekinokandinler) piyasaya sürülmesine ve bazı antifungaller kullanılırken yeni yöntemler (amfoterisin B'nin lipit bazlı formülasyonları) geliştirilmesine tanık oldu (12).

Bu gelişmeler, başta aspergilloz ve kandidiyazis olmak üzere birçok invaziv mantar enfeksiyonunun tedavisine yönelik standartları değiştirmiştir. Şu anda sistemik uygulama için mevcut olan dört ana antifungal ilaç ailesi mevcuttur: Alilaminler, azoller, ekinokandinler ve polienler (12).

Tablo 3. Antifungallerin hücredeki hedefleri, etki ve direnç mekanizmaları (12)

Antifungal Ajan		Hücredeki Hedefi	Etki Mekanizması	Direnç Mekanizması
Triazoller	Flukonazol	- ERG11 - Sterol $\Delta 22$ desaturase (ERG5)	Ergosterol biyosentezini inhibe eder	- ERG11 hedefi nedeniyle değişen ilaç afinitesi - ERG11'in up regülasyonu - CDR ve MDR çoklu ilaç taşıyıcılarının up regülasyonu - Biyofilm oluşumu
	Vorikonazol			
	İtrakonazol			
	Posakonazol			
	Ravukonazol			
Polyenler	Amphotericin B Nistatin	Ergosterol	Geniş aköz porlar oluşturur	- Sterol azalması - Biyofilm oluşumu
Ekinokandinler	Caspofungin Mikafungin Anidulafungin	b-1,3 glukan sentaz (Fks1, Fks2)	b-1,3 glukan sentezini inhibe ederek hücre duvarı bütünlüğünü bozar	- Glukan sentazın Fks1 ve/veya Fks2 alt ünitelerinin modifikasyonu - Biyofilm oluşumu
Alilaminle	Naftifin Terbinafin	Squalen epoksidaz (Erg1)	Sterol biyosentezini inhibe eder	ERG1 modifikasyonu
5- Florositozin		Nükleik asit sentezi inhibisyonu	Nükleik asit ve protein sentezi inhibisyonu	- Uracil pyrophosphorylase (Fur1) - Cytosine deaminase (Fcy1) - Cytosine permease (Fcy2)

2.8.1. Azoller

Bu geniş sentetik ajan grubu, dermatofit enfeksiyonlarının ve yüzeysel kandidiyazis formlarının topikal tedavisinde etkili olan birçok bileşik içerir. Bir kısmı (triazoller) sistemik uygulama için de uygundur. Bu grubun üyeleri, ortak olarak, N-karbon'lu bir imidazol veya triazol halkasına sahiptir (12).

Azol bileşikleri, mayalarda, ERG11 (Cyp51A) geni tarafından kodlanan fungal sitokrom P450 bağımlı enzim lanosterol 14- α -demetilazı inhibe ederek etki eder. Bu enzim, lanosterolün mantar hücrelerinin zarındaki başlıca sterol olan ergosterole dönüştürülmesinden sorumludur. Bu inhibisyon çeşitli toksik metillenmiş sterollerin birikmesine ve ergosterolün tükenmesine ve ardından zar yapısı ve işlevinin bozulmasına neden olur. Bu etki esas olarak fungistatiktir. Ancak vorikonazol ve itraconazol, *Aspergillus* ve diğer bazı küf türlerine karşı fungisidal etkiler gösterebilir (12).

Azollere dirençli suşlarda birden fazla mekanizma birlikte görev alır. En önemli direnç mekanizmalarından biri ERG11 geninde meydana gelen mutasyonlardır. Bu gende çok sayıda nokta mutasyonlar bildirilmiştir (119). Bazı aminoasit değişiklikleri, demetilazın aktif bölgesinde yapısal değişikliklerle azalmış hedef afinitesine ve buna bağlı olarak azol direncine sebep olur. Ayrıca *Candida*'larda transkripsiyon faktöründeki mutasyonlara bağlı olarak ERG11 geninin aşırı ekspresyonu veya bu enzimin intrinsik veya edinilmiş bazı mekanizmalarla azollere afinitesinin azalması azol direnci oluşturan bir başka durumdur (120). MDR ve CDR genleri tarafından kodlanan çoklu ilaç dışı akış taşıyıcılarının aktivasyonu yoluyla, hücre dışına aktif flukonazol akışı, ilacın hücre içinde birikiminde azalma; ayrıca $\Delta 5,6$ sterol desatüraz aktivitesinin kaybı gibi ergosterol biyosentez yolunda yer alan diğer enzimlerdeki değişiklikler azol direncine katkıda bulunabilir (12,121,122).

Flukonazol ve posakonazol dışındaki azoller, insan hepatik sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından büyük ölçüde metabolize edilir ve safra veya idrarda inaktif metabolitler olarak elimine edilir. Bir flukonazol dozunun %90'ından fazlası, ağırlıklı olarak değişmemiş ilaç olarak idrarla atılır, bu da onu duyarlı türlerin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde faydalı kılar (123).

2.8.1.1. Flukonazol

Flukonazol, hem oral hem de parenteral formülasyonlarda bulunan suda çözünür bir bis-triazoldür. Profilaksi olarak ve maya enfeksiyonlarının tedavisinde, özellikle kandidiyazis ve kriptokokoz tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Flukonazol, *Candida* türlerinin çoğuna ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı aktiftir (124,125). Ancak *Candida krusei* izolatları flukonazole doğal olarak dirençlidir ve *Candida glabrata* da azalmış duyarlılıktadır (125). Aktivite spektrumu birkaç dimorfik mantarı da içerir (*B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.* ve *H. capsulatum*) (126). Flukonazolün *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* ve *Mucor* ailesindeki küflere karşı etkinliği yoktur (127,128).

Mukozal veya derin yerleşimli kandidiyaz formları olan hastalarda kısa süreli flukonazol tedavisi sırasında *C. albicans*'ta direnç geliştiğine dair çok az rapor vardır (129). Buna karşılık, birçok *C. glabrata* suşu, tedavi sırasında hızla flukonazole dirençli hale gelir (130). AIDS'li kişilerde, oral veya özofagus enfeksiyonu için tekrarlanan düşük doz flukonazol tedavisinin ardından *C. albicans*'ın dirençli suşları ortaya çıkmıştır (12).

Flukonazol, mukozal ve sistemik kandidiyazis, koksidioidomikoz ve kriptokokoz tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nötropenik hastalarda kandidozun önlenmesi ve AIDS'li kişilerde kriptokokal menenjit nüksünün önlenmesi için de kullanımı yaygındır. Flukonazol, histoplazmoz ve sporotrikoz tedavisinde bir alternatiftir, ancak itrakonazolden daha az etkilidir (12).

2.8.1.2. İtrakonazol

İtrakonazol, oral veya parenteral uygulama için mevcut olan lipofilik bir triazoldür. Özellikle yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ve deri altı ve sistemik enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (12).

İtrakonazolün bir tedavi kürünün bitiminden sonra haftalar ila aylar arasında ciltte ve tırnaklarda kaldığı bulunmuştur, böylece dermatofit enfeksiyonları ve onikomikoz için aralıklı tedavi rejimlerine izin verir (12).

İtrakonazol, *Candida* türleri, *Aspergillus* türleri, birçok dematiyöz küf, dermatofitler ve dimorfik mantarlar (*B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *T. marneffe* ve *S. schenckii*) dahil olmak üzere geniş bir patojenik mantar spektrumuna karşı iyi

bir aktiviteye sahiptir. *Pseudallescheria boydii*'ye ve Mucoraceae ailesindeki küflerin çoğuna karşı etkisizdir (12).

Tedaviyi takiben *A. fumigatus*'un itraconazole dirençli suşları bildirilmiştir. cyp51a, TR/L94H'de edinilmiş bir mutasyona bağlı olarak artan itraconazol direnci raporları mevcuttur. Bu mutasyon artık Avrupa, Çin ve Hindistan'dan izole edilenlerde tanımlanmıştır ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde ciddi bir sorun haline gelmiştir (12).

2.8.1.4. Ketokonazol

Ketokonazol, oral veya topikal kullanım için formüle edilmiş lipofilik bir ilaçtır. Sistemik uygulama için halen mevcut olan tek imidazoldür, ancak artık topikal bir ajan olarak kullanılmaktadır (12).

Ketokonazol, dermatofitlere ve dimorfik mantarlara (*B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* ve *S. schenckii*) karşı faydalı aktiviteye sahiptir. *Candida* türlerine karşı da aktiftir. Daha az toksik, daha etkili alternatiflerin mevcudiyeti nedeniyle, ketokonazol artık az kullanılmaktadır. Ketokonazol, dermatofitoz, kutanöz kandidiyazis, pityriasis versicolor ve seboreik dermatit için yararlı bir topikal ajan olmaya devam etmektedir (12).

Ketokonazole karşı edinilmiş direnç nadirdir, ancak 1980'lerde *C. albicans*'a bağlı kronik mukokutanöz kandidiyaz için uzun süreli tedavi gören hastalarda birkaç örnek belgelenmiştir (12).

2.8.1.5. Posakonazol

Posakonazol, şu anda yalnızca oral süspansiyon olarak bulunan ikinci nesil, geniş spektrumlu bir triazol bileşiğidir. İntravenöz bir formülasyon, bir faz I klinik denemesini geçmiştir. Daha iyi biyoyararlanım, ince bağırsakta salınım ve emilim özelliklerine sahip yeni bir tablet de geliştirme aşamasındadır. Posakonazol oldukça lipofiliktir ve itraconazolünkine benzer bir kimyasal yapıya sahiptir (12).

Posakonazol, Aspergillus türlerinin çoğuna, *Candida* türleri, *C. neoformans* ve *Trichosporon* türlerine karşı oldukça aktiftir. Ayrıca *B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum*, *T. marneffei* ve *S. schenckii* dahil olmak üzere bir dizi dimorfik mantara karşı güçlü aktiviteye sahiptir. *P. boydii* ve *Fusarium spp.*'ye karşı daha az aktiftir. Diğer azollerden farklı olarak posakonazol bazı Mucoraceae ailesi küflere karşı önemli aktiviteye sahiptir. Posakonazol bazen

itrakonazol, flukonazol ve/veya vorikonazole direnç gösteren *Aspergillus* ve *Candida* suşlarına karşı etki gösterebilir. TR/L98H mutasyonu taşıyan *Aspergillus* izolatlarında posakonazol direnci gösterilmiştir (12).

2.8.1.6. Vorikonazol

Vorikonazol, oral veya intravenöz uygulama için mevcut ikinci nesil geniş spektrumlu bir triazol bileşigidir. Kimyasal yapısı flukonazolünkine benzer (12).

Vorikonazol çoğu *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *P. Boydii*, *Candida spp.*, *C. neoformans* ve *Trichosporon spp.*'ye karşı oldukça aktiftir. Ayrıca *B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum* ve *T. marneffeii* ve dematiaceous küfler dahil olmak üzere bir dizi dimorfik mantara karşı güçlü aktiviteye sahiptir. Vorikonazol Mucoraceae ailesi küflere karşı etkisizdir (12).

Bazı flukonazol dirençli *Candida* suşları, vorikonazole azalmış duyarlılık göstermiştir. Özellikle flukonazole dirençli tüm *C. glabrata* suşlarının vorikonazole dirençli olduğu görülmüştür. *Aspergillus* izolatları, uzun süreli azol tedavisi sırasında vorikonazol direnci kazanabilir. *A. fumigatus*'ta bir TR/L98H mutasyonunun yanı sıra yeni tanımlanmış bir cyp51a mutasyonuna bağlı olarak vorikonazole çevresel olarak kazanılmış direnç daha sık ortaya çıkmaktadır (12).

2.8.2. Ekinokandinler

Ekinokandinler, mantar hücre duvarını hedef alan yeni bir yarı sentetik lipopeptit antifungal sınıfıdır. Ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisi için üç ekinokandin onaylanmıştır: anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin. Yüksek moleküler ağırlıkları ve düşük oral biyoyararlanımları nedeniyle, bu ilaçlar sadece intravenöz preparatlar olarak mevcuttur. Özellikle kandidiyazis tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (12).

Ekinokandinler, 1,3-b-D-glukan sentaz enzimini inhibe ederek mantar hücre duvarı sentezini bozar. Bu, duyarlı mantarların hücre duvarının temel bir polisakarit bileşeni olan 1,3-b-D-glukan oluşumunun inhibisyonu ile sonuçlanır. İnhibisyon, hücrenin ozmotik parçalanmasına ve sonunda hücre ölümüne yol açar. Ekinokandinler, *Candida* türlerinde üç FKS geni tarafından kodlanan 1,3-b-D-glukan sentazın ana alt birimi olan Fksp'ye bağlanır. Ekinokandinler, *Candida* türleri için fungisidal, ancak *Aspergillus* türleri için fungistatiktir. Klinik izolatlar arasında ekinokandinlere direnç, *Candida* türlerindeki FKS1 geni

mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonlar, ilaç bağlanmasında değişikliklere neden olur ve tüm ekinokandinlere çapraz direnç kazandırır. FKS1 ve FKS2 genlerindeki mutasyonlar, *C. glabrata*'da kaspofungin, mikafungin ve anidulafungine duyarlılığın azalmasından sorumludur (12).

Ekinokandinler sınırlı bir etki spektrumuna sahiptir. Flukonazole dirençli suşlar dahil olmak üzere çok çeşitli *Candida* türlerine karşı oldukça aktiftirler. *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii*, ekinokandinlere göre daha yüksek MİK değerlerine sahiptir, ancak bu değerlerin klinik sonuçları henüz net değildir (95-98). Ekinokandinler, amfoterisin B'ye özünde dirençli olanlar da dahil olmak üzere *Aspergillus* türlerine karşı da aktiftir (58, 91, 96, 99, 100). Ekinokandinler, hücre duvarlarında önemli miktarda 1,3-b-D-glukan bulunmayan *C. neoformans* ve *Trichosporon* türleri ile *Fusarium* türleri gibi mantarlara karşı etkisizdir. Mikafunginin, *B. dermatitidis* ve *H. capsulatum* dahil olmak üzere birçok dimorfik mantarın miselyal formlarına karşı aktif olduğu ancak bu patojenlerin doku formlarına karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir (12).

Ekinokandinlere karşı kazanılmış direnç şu anda nadirdir, ancak ekinokandin tedavisiyle başarısızlık görülen hastaların örneklerinde *Candida* türlerinin bazı dirençli suşları üretilmiştir. Direnç, 1,3-b-D-glukan sentazın FKS1p ve FKS2p alt birimleri içinde, amino asit değişikliklerine yol açan FKS1 ve/veya FKS2 genlerindeki mutasyonların kazanılmasıyla ilişkilendirilmiştir. En yüksek direnç oranları *C. glabrata*'da, özellikle flukonazole zaten dirençli olan suşlarda tespit edilmiştir (12).

2.8.3. Polienler

Polienler, kapalı bir makrolid lakton halkasından oluşan büyük moleküllerdir. Halkanın bir tarafı, değişken sayıda konjuge çift bağ içeren sert bir lipofilik zincirden oluşur ve karşı tarafta benzer sayıda hidroksil grubu vardır. Dolayısıyla molekülün amfipatik yapısının etki mekanizmasında önemli olduğuna inanılmaktadır. Yaklaşık 100 polien antibiyotik tanımlanmıştır, ancak klinik kullanım için çok azı geliştirilmiştir. Amfoterisin B ve lipid formülasyonları, sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Nistatin, natamisin ve mepartrisin oral, vajinal ve oküler mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan topikal polien ajanlardır (12).

Polienler duyarlı mantar hücrelerinin zarlarında sterollere, özellikle ergosterole bağlanarak zar bariyer fonksiyonunun bozulmasına, hücre bileşenlerinin sızmasına, metabolik bozulmaya ve hücre ölümüne neden olur (120). Bir polien olan Amfoterisin B, zar geçirgenleştirici etkilerine ek olarak, hücre zarının lipoperoksidasyonuna bağlı bir dizi oksidatif reaksiyon yoluyla mantar hücrelerinde oksidatif hasara neden olabilir (12).

Amfoterisin B, *Streptomyces nodosus*'un bir fermantasyon ürünüdür. *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *C. neoformans* ve *Mucoraceae* ailesi küfler olmak üzere geniş bir patojenik mantar yelpazesine karşı aktiftir. Ancak *A. terreus* izolatlarının çoğu, *A. fumigatus*'un yeni bir kardeş türü olan *Aspergillus lentulus* izolatları gibi amfoterisin B'ye dirençlidir. *Candida krusei* ayrıca amfoterisin B'ye azalmış duyarlılık gösterir (131). Amfoterisin B, dimorfik mantarlara (*B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum* ve *P. brasiliensis*) ve birçok dematiyöz mantara karşı etkilidir. *P. boydii*, *S. prolificans*, *Fusarium* türleri ve *Trichosporon* türleri genellikle amfoterisin B'ye doğal olarak dirençlidir (12).

Amfoterisin B'ye karşı kazanılmış direnç nadirdir, ancak uzun süreli tedaviyi takiben amfoterisin B'ye dirençli *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* ve *C. lusitaniae* suşları bildirilmiştir (12).

Amfoterisin B'nin üç lipit bazlı formülasyonu, şu anda geleneksel amfoterisin B'ye dirençli veya toleranssız hastalarda invazif mantar enfeksiyonlarının tedavisi için ruhsatlandırılmıştır (12).

2.8.4. Alilaminler

Alilaminler, dermatofitozların topikal ve oral tedavisinde etkili olan bir grup sentetik antifungal bileşiktir. İki ilaç, terbinafin ve naftifin, klinik kullanım için lisanslanmıştır. Naftifin yalnızca topikal bir preparat olarak mevcuttur (12).

Alilaminler, duyarlı mantar hücrelerinin zarındaki başlıca sterol olan ergosterol oluşumunda kritik bir enzim olan skualen epoksidaz'ı inhibe eder. Sonuç olarak membranda skualen birikimi, zarın bozulmasına ve hücre ölümüne yol açar (132).

Terbinafin, oral veya topikal uygulama için mevcut olan lipofilik bir alilamin ilaçtır. Dermatofitlerin neden olduğu yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak

kullanılmaktadır. Uzun süreli maruziyetten sonra bile dermatofitlerde terbinafine direnç gelişimi nadirdir (12) .

Terbinafin, ayrıca *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Blastomyces dermatitidis* ve *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Talaromyces (Penicillium) marneffe*i ve *Sporothrix schenckii*'ye ve dematiyöz mantarlara karşı da bir miktar aktiviteye sahiptir (12).

2.8.5. Diğer Ajanlar

2.8.5.1. Flusitozin

Flusitozin (5-florositozin), sitozinin florlu sentetik bir analogudur ve bir antimetabolit görevi gören mevcut tek antifungal ajandır (12).

Flusitozin, pirimidin metabolizmasını ve dolayısıyla hassas mantar hücrelerinde DNA, RNA ve proteinlerin sentezini bozar. Flusitozin, sitozin permeaz enzimi tarafından bu hücrelere taşınır ve orada sitozin deaminaz tarafından 5-fluorourasile (5-FU) dönüştürülür. Daha sonra iki mekanizma antifungal aktiviteyi açıklar. Birincisi, 5-FU'nun, üridilik asit yerine mantar RNA'sına dahil edilen ve protein sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanan 5-fluorüridin trifosfata dönüştürülmesidir. İkinci mekanizma, 5-FU'nun timidilat sentetaz enzimini bloke ederek mantar DNA sentezinin inhibisyonuna neden olan 5-florodeoksiüridin monofosfata dönüşümüdür. Sitozin deaminazdan yoksun mantarlar, flusitosine doğal olarak dirençlidir (12).

Flusitozin, dar bir etki spektrumuna sahiptir. *Candida* türleri, *C. neoformans* ve kromoblastomikoza neden olan bazı dematiaceous mantarları içerir. Flusitosine karşı birincil direnç, *Candida* türleri arasında çok nadirdir ve izolatların yaklaşık %2 ila 3'ünde görülür (12).

Flusitozin ile monoterapi genellikle *Candida* türleri ve *C. neoformans* arasında direnç indüklenmesine yol açar (12).

2.8.5.2. Griseofulvin

Griseofulvin, *P. griseofulvum* da dahil olmak üzere bir dizi *Penicillium* türünden elde edilen bir antifungal antibiyotiktir. 1958'de tanıtılan oral griseofulvin, dermatofitoz tedavisini değiştirmiştir (12).

Griseofulvin, mikrotübüler proteinlere bağlanan ve mantar hücresi mitozunu inhibe eden fungistatik bir ilaçtır (12). Etki spektrumu deri, tırnak ve saç enfeksiyonlarına neden olan

dermatofitlerle (*Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton spp.*) sınırlıdır. Direnç nadiren bildirilmiştir.

Terbinafin veya itraconazol gibi daha yeni oral ajanlar, tırnak enfeksiyonlarında sıklıkla tercih edilir, ancak griseofulvin, topikal tedavinin uygun olmadığı veya başarısız olduğu deri ve kafa derisinin orta ila şiddetli dermatofitozları için yararlı bir ikinci basamak ajan olmaya devam etmektedir (12).

2.8.5.3. Geliştirme Aşamasındaki Yeni Antifungal Maddeler

Umut vadeden iki geniş spektrumlu triazol bileşiği, isavuconazole ve albaconazole şu anda klinik deneme aşamasındadır (133). Isavuconazole, oral veya intravenöz olarak uygulanabilen suda çözünür bir bileşiktir. İnvaziv kandidiyazis ve kandidemi tedavisi, invaziv aspergilloz tedavisi ve nadir küf enfeksiyonlarının tedavisi için faz III klinik deneylerini tamamlamıştır. Isavuconazole, hem *Candida* hem de diğer maya türlerinin yanı sıra *Aspergillus* türlerine karşı iyi in vitro aktivite gösterir. Albaconazole, yüksek düzeyde biyoyararlanım ve antifungal aktivite sergileyen bir oral ajandır. Tinea pedis için bir faz I çalışmasında değerlendirilmiş ve ayak tırnağı onikomikozunun tedavisi için bir faz II çalışmasını tamamlamıştır (134).

2.9. Antifungal Duyarlılık Testleri

Antifungal duyarlılık testi (AFDT) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında önemi giderek artan bir araçtır. Bu testler, mikroorganizmanın üremesinin belirli bir dereceye kadar inhibe olması için gerekli ilaç konsantrasyonunu (MİK) saptayarak duyarlılığı in vitro olarak belirler. AFDT'nin amacı, hasta tedavisine rehberlik etmek, epidemiyolojik çalışmaları desteklemek ve antifungal ilaç direnci oranlarını izlemek için kullanılabilecek MİK değerlerini güvenilir bir şekilde üretmektir (135).

Sonuç olarak, klinik laboratuvarlardan artık antifungal kemoterapinin seçiminde ve izlenmesinde daha büyük bir rol üstlenmesi istenmektedir. Bu nedenle, doğru ve kestirimci antifungal duyarlılık testleri artık invaziv mantar enfeksiyonu olan hastaların yönetimi sırasında karar vermeyi kolaylaştırmak için zorunlu hale gelmiştir (12).

Referans antifungal duyarlılık testinin temel metodolojisi, 1990'ların başında ilk standardize edilmiş sıvı seyreltme yönteminin (National Committee for Clinical Laboratory

Standards [NCCLS] M27-P), piyasaya sürülmesinden bu yana sabit kalmıştır ve o zamandan beri bir mikrotitre plakasında yürütülen bir mikrodilüsyon yöntemini içerecek şekilde modifiye edilmiştir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Komitesi (CLSI) Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi ve Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Bulaşıcı Hastalıklar Derneği'nin (ESCMID), Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi tarafından yayınlanıp kabul gören referans yöntemler artık iyice yerleşmiştir. CLSI Alt Komitesi, maya ve küflerin sıvı makro ve mikrodilüsyon duyarlılık testi için referans yöntemleri ve ayrıca mayalar ve küfler için disk difüzyon yöntemleri geliştirirken, EUCAST, fermentatif maya ve konidi oluşturan küfler için sıvı mikrodilüsyon yöntemleri geliştirmiştir (12).

Kültürde saptanan her mantar patojeni için duyarlılık testi önerilmemektedir. Steril olmayan vücut bölgelerinden gelen izolatlar genellikle tedavi edilmez ve AFDT gerektirmeyebilir. Bazı patojenler için tercih edilen antifungal ilaç, patojenin doğru tanımlanmasıyla ampirik olarak başlanabilir ve klinik başarısızlık dışında, duyarlılık testi gerektirmeyebilir. Ayrıca, belirlenmiş referans sınır değeri olmayan mantar patojenleri için, bir MİK değeri elde edilebilir ancak net bir klinik yorumu olmayabilir (136).

AFDT özellikle mantar enfeksiyonu invaziv olduğunda, kazanılmış ilaç direncinden şüphelenildiğinde veya beklenmedik bir şekilde tedavi başarısız olduğunda çok değerlidir. Bu durumların her biri için, *in vitro* duyarlılık modelini bilmek klinisyene terapötik seçimler veya değişiklikler yaparken bilgi verecektir. Rutin testler için bu endikasyonlar sadece bazı *Candida* türleri için tanımlanmıştır (137,138).

Antifungal duyarlılık testleri için standardize edilmiş üç yöntem vardır: sıvı dilüsyon, disk difüzyon ve *Aspergillus* için azol agar taraması. Yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler arasında gradyan difüzyonu ve hızlı otomatik cihazların kullanımı yer alır. Duyarlılık testi için yeni metodolojiler geliştirme aşamasındadır (135).

2.9.1. Mayalar için sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Sıvı dilüsyon, bir ilacın *in vitro* aktivitesinin, bilinen bir ilaç konsantrasyonuna sahip sıvı kültürde bir test organizmasına karşı ölçülmesi işlemidir. Geliştirilen ilk metodolojilerden biri olarak, geçmişten beri antifungal duyarlılık testi için en yaygın kullanılan teknik olmuştur. Bu teknikte genel olarak, standart bir ortam, 2 katlı seri içeren bir test tüpü veya mikrotitre

plakası kullanılır. Test edilen mikroorganizmanın büyümesini önceden belirlenmiş bir dereceye kadar azaltan ilaç konsantrasyonu, MİK değeri olarak okunur. İzlenen orijinal yöntem makrodilüsyon iken, mikrodilüsyon klinik laboratuvarlarda rutin kullanım için daha kolay benimsenmiştir. Klinik laboratuvarlarda sıvı mikrodilüsyon testi için kabul edilen, CLSI tarafından belirlenenler ve EUCAST tarafından belirlenenler olmak üzere iki standart vardır (135).

Son zamanlardaki en önemli gelişme, sistemik olarak aktif antifungal ajanlar için türe özgü sınır değerlerin tanıtılması ve CLSI sınır değerlerinin 24 saatlik okumaya dayalı olarak revize edilmesi ve bunları EUCAST tarafından önerilen ve belgede yayınlananlarla uyumlu hale getirmesi olmuştur (12).

2.9.2. Disk difüzyon testi yöntemi

Disk difüzyon testi yöntemi, duyarlılık testine yönelik en eski yaklaşımlardan biridir ve birçok klinik laboratuvarlarda, özellikle kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Disk difüzyon testi ucuzdur, tekrarlanabilir ve yorumlanması kolaydır (135).

Disk difüzyon testi, sabit bir antifungal ilaç konsantrasyonu içeren ticari olarak hazırlanmış kağıt disklerin kullanımını içerir. Disk çevresinde oluşan inhibisyon zonunun çapı, ilacın besiyerindeki difüzyon hızı ve izolatin o ilaca duyarlılığı ile ilgilidir (135).

Bu metodolojinin sınırlaması, bir MİK değeri sağlamamasıdır. Zon çapı yorumlama kriterleri, birçok izolatin MİK değerlerinin bilinen zon çapları ile karşılaştırılmasıyla geliştirilmiştir. Bunun anlamı, disk difüzyon kriterlerinin yalnızca halihazırda sınır değerleri olan mantar/antifungal kombinasyonları için geliştirilebileceğidir. Bu, disk difüzyonun sınır değerleri olan beş tür içinde yer alan *Candida* izolatlarının %90'ından fazlası için yararlı olduğu anlamına gelse de bu yöntem ortaya çıkan türler veya yeni geliştirilen antifungaller için yararlı değildir çünkü sonucu yorumlamanın bir yolu yoktur (135).

Küfler için disk difüzyonunun sıvı mikrodilüsyon ile korelasyonu çok iyi değildir ve sonuçları değerlendirmek için yorumlama kriterleri yoktur, ancak CLSI test için bir standart geliştirmiştir (135).

Teknik olarak basit, ucuz ve çok az ekipman gerektirdiği için disk difüzyon *Candida* küresel sürveyans programları için ideal bir test yöntemidir (135).

2.9.3. Ticari test yöntemleri

Yukarıda açıklanan referans yöntemlere ek olarak, antifungal duyarlılık testleri için ticari olarak temin edilebilen ürünler bulunmaktadır.

2.9.3.1. Gradyan difüzyon şeritleri

Sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyona bir alternatif, gradyan difüzyon şeritlerinin kullanılmasıdır. Bunlar, bir tarafında önceden tanımlanmış, kurutulmuş bir antifungal ilaç gradyanı içeren, diğer tarafında ise bir konsantrasyon ölçeği ile işaretlenmiş ince plastik veya nitroselüloz şeritlerdir. Gradyan difüzyon şeritleri mantar hücrelerinin veya konidiaların ekildiği besiyerine yerleştirildikten sonra, 24 ila 48 saat inkübe edilir ve antifungal bu süre zarfında agar içine yayılır. Mantarların elips şeklindeki büyüme çizgisinin şeritle kesiştiği nokta MİK değerini gösterir. Tüm onaylanmış antifungal ilaçlar için şeritler mevcuttur.

2.9.3.2. Sensititre yeastone assay

Sensititre YeastOne (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA [eski adıyla TREK Diagnostic Systems]), kolorimetrik antifungal panel, ticari olarak hazırlanmış bir sıvı mikrodilüsyon plakasıdır. Diğer sıvı mikrodilüsyon biçimleri gibi, YeastOne paneli de antifungal ilacın seri dilüsyonlarını içeren 96 oyuklu bir plakadan oluşur. Kuyucuklar ayrıca kolorimetrik büyüme göstergesi resazurin (alamarBlue) içerir, bu nedenle mantar gelişimi ve MİK tayini, tanımlanmış bir büyüme miktarı yerine kuyucuktaki renk değişikliğine dayanır. Bu yöntem, testin nadiren yapıldığı bir klinik laboratuvarında kullanım için idealdir.

2.9.3.3. Vitek 2 maya panelleri

Vitek 2 maya duyarlılık paneli (bioMérieux, Hazelwood, MO, ABD), klinik ilişkili *Candida* türleri için bir MIC değeri belirlemek üzere spektrofotometrik okumaları kullanan, AFDT'ye yönelik otomatik bir yaklaşımdır. Kartlar, besiyerinde kurutulmuş antifungal ilaç konsantrasyonları içeren kuyucuklar içerir. İzolat, salin içinde standardize edilmiş bir konsantrasyona ayarlanır ve kart bir Vitek 2 kart okuyucu/inkübatör makinesine yerleştirilir. Her kuyucuktaki büyüme, bir optik tarayıcı tarafından 36 saate kadar (ortalama 12

ila 14 saat) izlenir ve karttaki her antifungal için yorumlama kriterlerli ile birlikte bir MİK değeri içeren bir rapor oluşturulur (135).

Bu yöntemin sağladığı otomasyon, yüksek test hacmine sahip klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için idealdir. Özel mikoloji eğitimi gerektirmez ve sıvı mikrodilüsyonla karşılaştırılabilir doğru sonuçlar üreten hızlı bir AFST yöntemidir (135).

2.9.3.4. Akım sitometrisi

Akım sitometrisi veya floresanla aktive olan hücre sınıflandırması (FAHS), antifungal duyarlılık testinde kullanım için değerlendirilmiş mevcut bir teknolojidir. Bir dizi antifungal ilaç seyreltmesi ve bir floresan boya ile boyama işleminin ardından, mantar hücrelerinin bir akım sitometresi kullanılarak floresanları ölçülür. Floresanstaki değişiklikler, hücre yaşayabilirliğindeki değişiklikler olarak yorumlanır ve bu nedenle antifungal kaynaklı hasarın bir göstergesidir (135).

Bu yöntemin referans AFDT yöntemleri ile karşılaştırmaları *Candida* türleri üzerine odaklanmıştır ve çok sayıda tür üzerinde çok sayıda antifungal için ümit verici sonuç vermektedir (139–141) Bununla birlikte, CLSI yöntemiyle yüksek uyuma rağmen, akım sitometrisinde, özellikle *C. krusei*'de çok büyük hatalar bildirilmiştir. Ayrıca, sonuçlar sıvı mikrodilüsyon ile kıyaslandığında en az bir gün yerine birkaç saat içinde elde edilse de şu anki haliyle FAHS emek yoğunudur, yüksek düzeyde teknisyen uzmanlığı gerektirir ve kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda pratik olmaz (135).

2.9.3.5. Maldı-tof kütle spektrometresi

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF), protein profillerini doğrudan klinik izolatlardan saptar ve hem bakteri hem de mantarların tanımlanması için klinik mikrobiyoloji laboratuvarında temel bir araç haline gelmiştir (142). Bu teknoloji, AFDT'de de uygulanmak üzere araştırılmıştır. Genel olarak, bir izolat, bir antifungal ilaç konsantrasyonuna maruz bırakılır ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilir ve ilaca maruz kalmamış bir kontrol suşa kıyasla proteomdaki herhangi bir değişiklik, antifungal kaynaklı hasarın bir göstergesi olarak yorumlanır (143).

Duyarlılık testinde kullanım için MALDI-TOF kütle spektrometresi geliştirmenin potansiyel avantajları, mevcut CLSI metodolojisi tarafından açıklandığı gibi görsel okumada mevcut öznelliğin ortadan kaldırılması ve sonuç alma süresinin kısılmasıdır. Ancak klinik laboratuvarlarda yaygın olarak uygulanmadan önce ek çalışma gereklidir (135).

2.9.3.6. Agar bazlı antifungal tarama

Fungal izolatların, antifungal ajanlar içeren standart agarda büyüme yetenekleri açısından taranması, çeşitli durumlarda yararlı bir stratejidir. Böyle bir teknoloji olan X-Plate, bir petri plakasının dört çeyreğine dökülen *Candida* CHROMagar'ı (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) kullanan kombine bir tanımlama-duyarlılık testi testidir. Dört farklı çeyreğin her biri ayrıca farklı bir flukonazol konsantrasyonu içerir: 0 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml veya 64 µg/ml. *Bu sistem, bir Candida türünün doğrudan klinik bir numuneden koloninin rengi aracılığıyla varsayımsal olarak tanımlanmasına ve ilacın varlığına göre flukonazol direncinin kategorize edilmesine izin verir. Çeşitli duyarlılık profillerine sahip C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis ve C. tropikalis ile test edildiğinde X-Plate CLSI sıvı mikrodilüsyon ile %100 uyum göstermiştir (144).*

2.9.3.7. PAO tabanlı kültür

Gözenekli alüminyum oksit (PAO), altıgen bir dizide düzenlenmiş silindirik gözeneklerden oluşan petek benzeri bir malzemedir. PAO, ilaç direncini ölçmek için yeni bir yöntem olarak araştırılmıştır. Genel olarak, bir izolat, belirli bir antifungal ilaç konsantrasyonu içeren bir RPMI plakasına yerleştirilen bir PAO şeridi üzerine alt kültürlenir. Bir süre sonra PAO şeridi mikroskopik olarak analiz edilir ve mikrokoloni alanındaki herhangi bir değişiklik, ilaç aktivitesi veya inaktivitesi ile ilişkilendirilir. Geleneksel testler için 24 saatin aksine, sonuçlar yaklaşık 3,5 ila 7 saat sonra hazır olur. Bu teknoloji, rutin testlerde kullanım kolaylığı için otomatikleştirilebilir ve diğer mantarlara uyarlanabilir (135).

2.9.3.8. IMC (İzotermal mikrokaleorimetri)

İzotermal mikrokaleorimetri (IMC), bir kimyasala tepki olarak ısı akışının ölçüsüdür. AFDT bağlamında mikro kalorimetri, mikrobiyal metabolizma ile ilgili olduğu için ısı üretiminin kesin miktarının ölçüldüğü ve daha sonra mikrobiyal büyümedeki değişikliklerle ilişkilendirildiği bir yöntemdir. Kısaca, organizmayı, büyüme ortamını ve antimikrobiyal ilacın seri seyreltilerini içeren şişeler, bir IMC cihazı içinde muhafaza edilir. Büyüme kontrolü tarafından üretilen toplam ısıyı belirli bir dereceye kadar engelleyen en düşük ilaç konsantrasyonu hesaplanır ve MHIC (minimal heat inhibitor concentration) olarak adlandırılır. Teorik olarak bu yöntem, rutin klinik testlerde ve yeni antifungal ilaçların test edilmesinde yüksek verimli kullanım için otomatikleştirilebilir (135).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2022.04.01.1354 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmamızın etik kurul onayı, Düzce Üniversitesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 2022/133 karar no ile 04.07.2022 tarihinde alınmıştır.

3.1. Suşların Seçimi, Saklanması ve Canlandırılması

Bu çalışmaya 01.08.2021- 01.08.2022 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 127 adet *Candida albicans* suşu dahil edildi. Suşların seçiminde enfeksiyon ve kolonizasyon ayrımı yapılmadı. Aynı hastaya ait birden fazla örnek olması durumunda, ilk örnekten izole edilen suşlar dışındaki örnekler kullanılmadı. Tüm suşlar için izole edildikleri SDA (Condalab, İspanya) besiyerinden alınan saf koloniler brain-heart infüzyon broth (Plasmatec) içeren eppendorf tüpüne konuldu. 24 saat 37°C etüvde bekledikten sonra çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı. Çalışma süreci başladığında eppendorf tüpleri 37 °C etüvde 2 saat bekletildi ve SDA besiyerine ekim yapılarak 37 °C 'de 18-24 saat inkübe edildi. Üremesi olmayan suşlara ait eppendorf tüpleri 24 saat daha etüvde bekletilerek yeniden ekim yapılarak mikroorganizmaların üremeleri sağlandı.

3.2. *Candida Albicans* İzolatlarının Tanımlanması

Üremesi sağlanan *Candida* suşlarının identifikasyonu aşağıdaki testler uygulanarak yapılmıştır.

3.2.1. Germ tüp testi

Test edilecek maya kolonisinden az bir miktar alınarak, 0,5 ml tavşan veya insan serumu içeren test tüpünde süspanse edildi. Test tüpü 35°C'de 2 saati geçmemek üzere inkübe edildi. 3. Maya-serum süspansiyonundan pastör pipeti ile bir damla lama damlatıldı, bir lamelle kapatıldı ve mikroskopik olarak germ tüp varlığı araştırıldı. İnceleme ışık mikroskopunda 40x objektif ile yapıldı. İncelemede ana hücreden çıkan ve başlangıç noktasında boğumlanma yapmayan, uzunluğu boyunca belirgin kabarık olmayan, filamentöz uzantılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp görülen örnekler *Candida albicans* lehine düşünülerek diğer tanımlama işlemlerine devam edildi (102).

3.2.2. Mısır unu-tween 80 agarda mikroskopik değerlendirme

Mayaların mikroskopik morfolojisini incelemek için Dalmau plak yöntemi kullanıldı. Mısır unu-Twen 80 agara (Condalab, İspanya), saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze bir miktar alınarak özeyi dibe kadar batırmadan ve besiyerini yırtmadan çizgi şeklinde ince ekim yapıldı. Ekimi seyreltmek için ilk çizgiye paralel üç veya dört çizgi daha yapıldı.

Ekim çizgilerinin üzerine lamel kapatılarak oda sıcaklığında 24-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ışık mikroskopunda 10x ve 40x objektif ile hif ve spor yapıları incelendi. Psöдохiflerin uçlarında ve yan dallarında görülen yuvarlak, kalın duvarlı, büyük klamidosporlar ile hif birleşim yerlerindeki blastospor kümeleri görülen örnekler *C. albicans* olarak değerlendirildi. (5)

Şekil 1. Işık mikroskopunda 40x büyütmede klamidospor görüntüsü



3.2.3.Kromojenik Besiyeri ile Değerlendirme

İzolatların kromojenik agarda identifikasyonu için Chromagar *Candida* (Condalab, İspanya) besiyeri kullanıldı. SDA besiyerinde üremiş olan kolonilerden öze ile alınarak kromojenik besiyerine ekim yapıldı. 35 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra koloni rengi yeşil olan üremeler *Candida albicans* lehine değerlendirildi (5)

3.2.4. Otomatize sistem ile identifikasyon

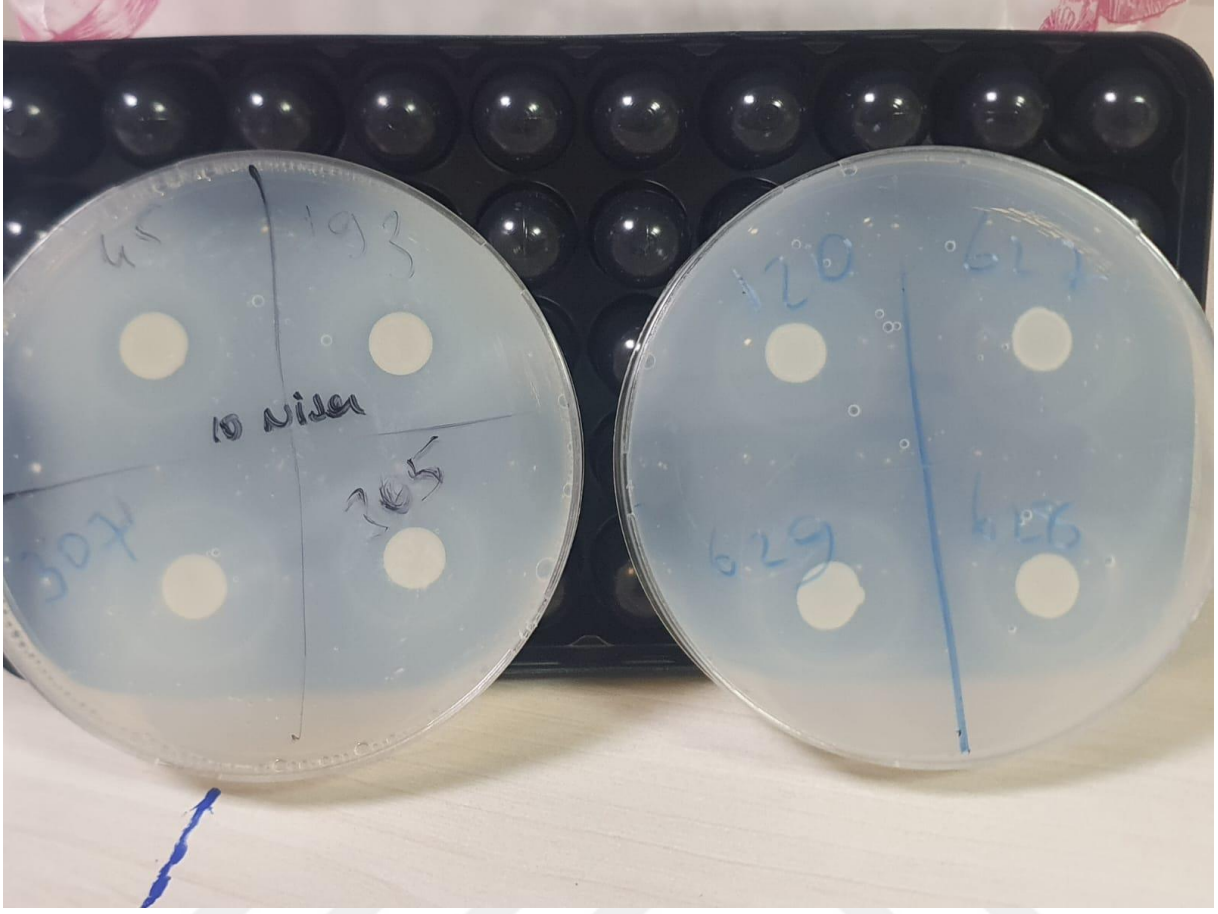
Suşların tanımlanması için ayrıca Vitek 2 (bioMerieux, France) otomatize sistem kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, 24 saatlik taze kültürden steril öze yardımıyla yeterli miktarda saf üremiş maya kolonisi alınarak 3 ml steril % 0,45'lik sodyum klorür (NaCl) ile 12 x 75 mm'lik temiz plastik polistiren test tüpleri içerisinde sulandırıldı. McFarland 2,0 bulanıklığında olacak şekilde ayarlandı. *Candida* süspansiyonu içeren test tüpleri özel kasetlere, Vitek 2 ID-YST kartları ise komşu yuvaya yerleştirildi. Bu kartlara karşılık gelen süspansiyon tüplerinden kartlara yeterli sıvı emilimi olduktan sonra, kart üzerindeki barkodlar okutularak cihaza yerleştirildi. Yaklaşık 15-18,5 saat içerisinde cihazdan identifikasyon sonuçları alındı.

3.3. Proteinaz varlığının gösterilmesi

Proteinaz aktivitesi iki farklı içerikteki besiyeri ile test edildi. İzolatların proteinaz aktivitesinin araştırılması için %1'lik sığır serum albumini (BSA) içeren besiyeri kullanıldı. Bunun için bir litre distile su içinde 2 g BSA (Sigma-Aldrich), 1,45 g YNB (Difco Laboratories, Detroit, MI, ABD), 20 g glikoz ve 20 g agar içeren besiyeri hazırlandı. (145,146) Agar ve glikoz 900 ml distile su içinde karıştırdı ve otoklavda sterilize edildi. BSA ve YNB 100 ml distile suda eritilerek 0,22 µm'lik kağıt filtreden (İsolab) geçirildi. Otoklavdan çıkıp 50 °C'ye kadar soğumuş olan ilk karışma eklendi. İkinci besiyeri için ise aynı ölçülerdeki malzemelere ek olarak 1 gr KH₂PO₄ ve 0,5 gr MgSO₄.7H₂O da kullanıldı. Her iki şekilde hazırlanan çözeltiler 9 cm'lik petri kaplarına döküldü. 4 °C'de saklandı.

Test edilecek maya suşları için stok kültürler SDA besiyerine ekildi. 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen saf koloniler öze ile alınarak steril distile suda 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlandı. Bu süspansiyondan mikropipet ile 10 mikrolitre alınarak bir besiyerine en fazla 4 suş olacak şekilde konuldu ve besiyerleri 37 °C'de 1 hafta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan üreme zonunun ve etrafında protein parçalanmasına bağlı oluşan şeffaf bölgenin çapları ölçüldü. Proteinaz aktivitesi; koloni çapı ile koloni etrafında oluşan şeffaf zon çapının toplamının koloni çapına oranı ile belirlendi ve Prz değeri olarak ifade edildi. Prz değeri 1.0 ise negatif; 0.9-1 ise 1+; 0.89-0.8 ise 2+; 0.79-0.7 ise 3+ ve ≤ 0.69 ise 4+ olarak değerlendirildi (147).

şekil 2. BSA besiyerinde 1 haftalık inkübasyon sonrası görüntü



3.4. Flukonazol için Antifungal Duyarlılık Testi

Çalışmaya dahil edilen izolatların antifungal duyarlılıkları, sıvı mikrodilüsyon yönteminde referans yöntemlerden biri olan EUCAST E.DEF 7.3.2 (148) kılavuzu önerilerine göre çalışıldı ve yorumlandı. Çalışmada kalite kontrol amacıyla *C. albicans* ATCC 90028 suşu kullanıldı.

Test düz tabanlı kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarında gerçekleştirildi. Yöntemin basamakları aşağıdaki gibi uygulandı.

3.4.1. Besiyeri Hazırlanması

Besiyeri olarak glutaminli, bikarbonatsız, %2 glikoz içeren RPMI 1640 (Capricorn Scientific, Almanya) kullanıldı. Son konsantrasyon 0.165 mol/L ve Ph 7.0 olacak şekilde 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Goldbio, ABD) kullanıldı. RPMI 1640 içeriği Tablo 4'te listelenmiştir. Maya inokulumu eklendiğinde %50 [1:1] dilüsyon elde edebilmek için besiyeri 2 kat yoğunlukta hazırlandı. Hazırlık aşamaları şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Tablo 4'teki malzemeler 900 ml distile su içine kondu.
2. İçerik iyice çözünene kadar karıştırıldı.
3. Karıştırma esnasında, 25 °C'de 1 M sodyum hidroksit eklenerek pH 7.0' a ayarlandı.
4. Son hacmi 1000 ml'ye tamamlamak için gereken su eklendi.
5. 0.22 µm membran filtreden geçirilerek sterilizasyon yapıldı.
6. Çalışma gününe kadar 4 °C'de saklandı.
7. Kullanmadan önce kanlı ve EMB besiyerlerine ekim yapılarak sterilite kontrolü yapıldı.

Tablo 4. RPMI 1640 besiyeri içeriği

Malzemeler	Miktar
Distile su	900 ml
RPMI 1640	20,8 g
MOPS	69,06 g
Glukoz	36 g

3.4.2. Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmada antifungal etken madde olarak; flukonazol (Cayman Chemical, ABD) kullanıldı. Antifungal ilaç miktarı aşağıdaki formüle göre ayarlandı:

$$\text{Ağırlık (g)} = [\text{Hacim (L)} \times \text{Konsantrasyon (mg/L)}] / \text{Potens (mg/g)}$$

Toz flukonazol, kalibre edilmiş bir analitik terazide ve terazi hassasiyetinden en az 10 kat fazla olacak miktarda tartıldı. Antifungal ilaç stok çözelti konsantrasyonu, hedef konsantrasyondan 200 kat yüksek olacak şekilde hazırlandı. Stok solüsyonda çözücü olarak DMSO (Sigma) kullanıldı. Karıştırıcı üzerinde 1 saat karıştırılarak tozun tamamının çözüldüğü gözlemlendi. İşlem gününe kadar -70 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2. Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Mikrodilüsyon plakalarında kullanılacak olan RPMI, maya inokulumu eklendiğinde %50'lik bir seyreltmeye izin vermek için son konsantrasyonun 2 katı yoğunlukta hazırlandı. Stok solüsyondan çalışma solüsyonlarını hazırlamak için gerekli aşamalar şu şekildedir:

1. -70 °C dondurucudan antifungal ilaç stok tüpü alındı. Çözülmesi için en az bir saat beklendi.
2. Tablo 5'teki miktarlarda DMSO dokuz tüpe dağıtıldı. İlk tüple beraber toplam 10 tüp çalışma solüsyonu elde edildi.
3. Son konsantrasyonun 200 katı (12800 mg/L) bir seyreltme serisi oluşturmak için Tablo 5'teki adımlar izlendi.
4. 9,9 mL iki kat yoğunluklu RPMI on tüpe dağıtıldı.

DMSO içinde 200 kat antifungal ilaç konsantrasyonu içeren tüplerin her birinden 100 µL alındı ve 9,9 mL RPMI içeren on tüpe aktarıldı (1:100 seyreltme). Böylece istenen final flukonazol konsantrasyonun 2 katı elde edilmiş oldu. İnokulum süspansiyonu ile 1:1 dilüsyon yapıldığında tablodakilerin yarısı olan son konsantrasyona ulaşıldı.

Tablo 5. Nihai konsantrasyonu 0,125-64 mg/L olan antifungal seyreltme serisi hazırlanmasına yönelik ISO (Uluslararası Standardizasyon Örgütü) Şeması

Adım	Konsantrasyon (mg/L)	Kaynak	Antifungal hacmi (µL)	DMSO hacmi (µL)	Ara konsantrasyon (mg/L)	Son konsantrasyon (mg/L)*
1	12 800	Stok	200	0	12,800	128
2	12 800	Stok	100	100	6,400	64
3	12 800	Stok	50	150	3,200	32
4	12 800	Stok	50	350	1,600	16
5	1600	Adım 4	100	100	800	8
6	1600	Adım 4	50	150	400	4
7	1600	Adım 4	50	350	200	2
8	200	Adım 7	100	100	100	1
9	200	Adım 7	50	150	50	0.5
10	200	Adım 7	25	175	25	0.25

* 2 kat yoğunluklu RPMI ile 1/100 dilüsyondan sonra konsantrasyon (mg/L)

3.4.3. Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması

Yaklaşık 300 µL kapasiteli, düz tabanlı 96 kuyucuklu, steril plastik mikrodilüsyon plakları kullanıldı. Mikrodilüsyon plaklarının her sütununun 1 ila 10 numaralı kuyucuklarına,

flukonazolun karşılık gelen konsantrasyonunu (2 x son konsantrasyon) içeren tüplerin her birinden 100 µL dağıtıldı. Sütun 11 ve 12'nin her kuyucuğuna 100 µL iki kat yoğunluklu RPMI %2 besiyeri konuldu. Aynı gün kullanılmayacak olan plaklar çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.4.4. İnokulum hazırlanması

Doğru ve tekrarlanabilir antifungal duyarlılık testleri için inokulumun standardizasyonu önemlidir. Nihai inokulum $0,5 \times 10^5$ ile $2,5 \times 10^5$ CFU/mL arasında olmalıdır.

Maya inokülümü için, tüm suşlar testten önce 18-48 saat boyunca SDA besiyerinde 37 °C'de inkübe edildi. Kültürlerden ≥ 1 mm çapında beş ayrı koloni en az 3 mL steril distile su içinde süspanse edilerek inokulum hazırlandı. Süspansiyon yaklaşık 2.000 rpm'de bir vorteks karıştırıcı ile 15 saniye boyunca homojenleştirildi. 530 nm dalga boyunda bir spektrofotometrede absorbansı ölçerek ve gerektiği zaman steril distile su ekleyerek hücre yoğunluğunu 0,5 McFarland yoğunluğuna ayarlandı. Böylece $1-5 \times 10^6$ CFU/mL'lik bir maya süspansiyonu elde edildi. $1-5 \times 10^5$ CFU/mL elde etmek için steril distile su ile 10 kat dilüsyon yapıldı.

3.4.5. Mikrodilüsyon plaklarına inokülasyon

Mikrodilüsyon plakasının ilk 11 sütunundaki kuyucuklarına 100 µL $1-5 \times 10^5$ CFU/mL maya süspansiyonu konuldu. 12. sütundaki kuyucuklara ise sterilite kontrolü olarak, inokulum hazırlarken kullanılan distile sudan 100'er µL konuldu.

3.4.6. Mikrodilüsyon plaklarının inkübasyonu

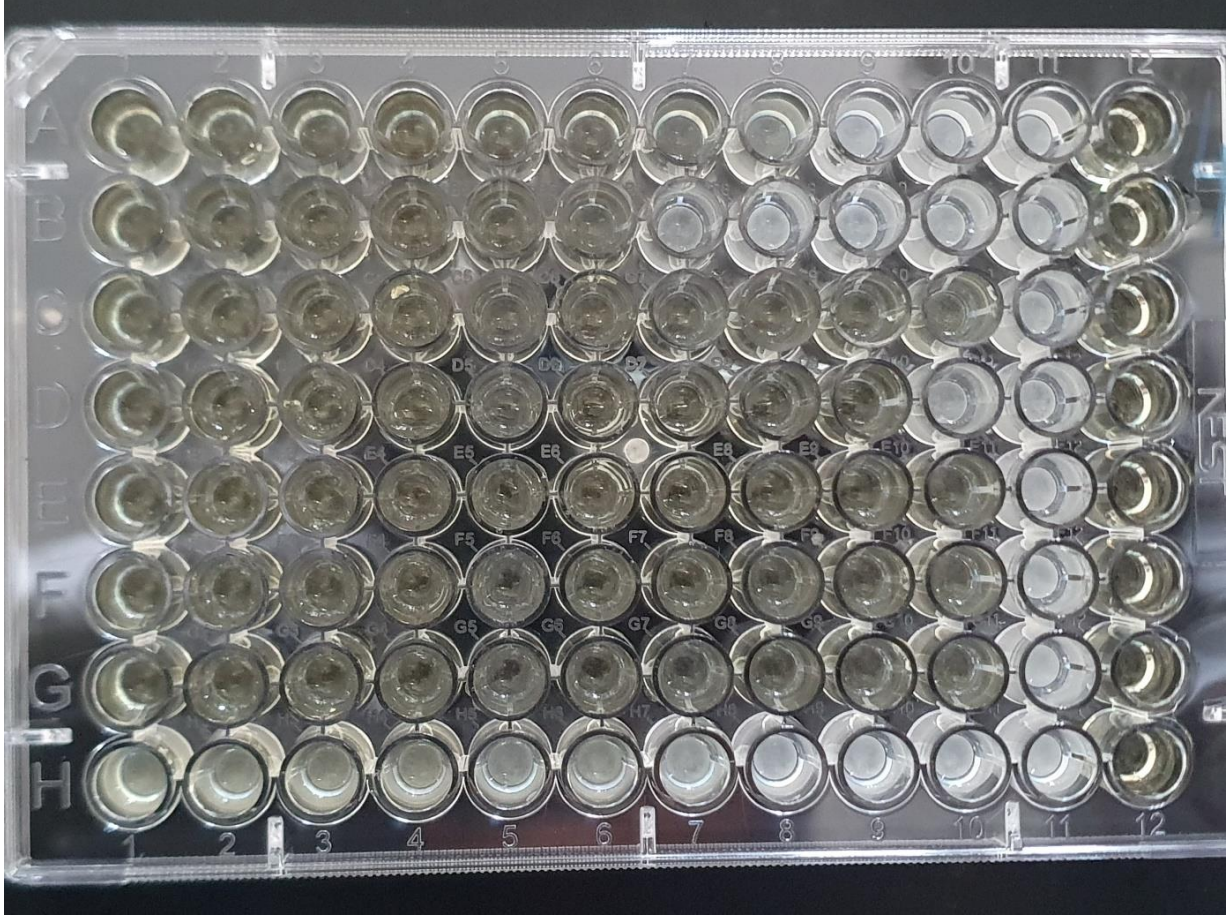
Mikrodilüsyon plakları 35 °C'de 48 saat boyunca inkübe edildi. 48 saat sonunda pozitif kontrol kuyucuğundaki üremesi 0,2'lik absorbansa ulaşamayan testler geçersiz kabul edildi.

3.4.7. Sonuçların değerlendirilmesi

Mikrodilüsyon plakları bir spektrofotometrik mikropalak okuyucu ile 450 nm dalga boyunda değerlendirildi. İlk okuma 24 saat sonunda yapıldı ve MİK değerleri belirlendi. İnkübasyon süresi, suşların tolerans özelliğini de test edebilmek için 48 saate tamamlandı ve 48. saatte yeni bir okuma yapıldı. MİK değeri, negatif kontrol kuyucuğuna göre $\geq 50\%$ büyüme inhibisyonu sağlayan en düşük ilaç konsantrasyonudur.

Klinik direnç sınır değeri olarak, flukonazol için $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ dirençli (R), $4 \mu\text{g/ml}$ doza bağımlı duyarlı (DBD) ve $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ duyarlı (S) olarak değerlendirildi(148)

Şekil 3. 48 saat inkübasyon sonunda bir mikrodilüsyon plağı



3.5. Quantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT)

3.5.1. RNA Eldesi

Suşlardan RNA izolasyonu için Hybrid-R™ (GeneAll®, Kore) kiti kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

1. Bir öze dolusu *Candida* kolonisi alındı ve 2 ml'lik tüpe konuldu. Mikrohomojenizasyon yapıldı ve 1 ml Buffer P eklendi.
2. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyon yapıldı.
3. karışıma 200 μl Chloroform isoamyl eklendi, ters çevrilerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

4. 12000 devirde, 4 C°'de 15 dakika santrifüj edildi ve tüpün üzerinde kalan sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı.
5. Eşit hacimde Buffer RB eklendi ve ters çevrilerek iyice karıştırıldı.
6. Lizat, spin kolona dikkatlice aktarıldı. 12000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi. Geçiş fazı atıldı ve spin olon tekrar toplama tüpüne konuldu. Bu basamak, örneğin kalan kısmıyla 1 defa daha tekrar edildi.
7. 700 µl Yıkama Tamponu I eklendi, 12000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi ve geçiş fazı atıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
8. 600 µl Yıkama Tamponu II eklendi, 12000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi ve geçiş fazı atıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
9. Kalan yıkama tamponun temizlenmesi için en yüksek devirde 1 dakika daha santrifüj gerçekleştirildi. Mini spin kolon, yeni bir 1,5 ml'lik tüpe transfer edildi.
10. 50-100 µl ılıtılmış, RNA içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj yapıldı.
11. Saflaştırılmış RNA, hemen kullanılacaksa -20 C°'de, daha uzun süreli depolama için ise -70C° veya -80C°'de saklanabilir.

3.5.2. cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentez fazına geçildi.

cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit (A.B.T.TM, Türkiye) kullanıldı. Kit içeriği Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. cDNA sentez kiti içeriği

İçerik	Hacim
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	50 µl
10X Reaction Tamponu	250 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	25 µl
20X dNTP mix (2.5 mM each)	50 µl
Random hexamer (50 µM)	100 µl

RNase içermeyen su	2 ml
--------------------	------

Kit bileşenleri bir mikrotüp içerisinde, tablo 7 ‘deki öneriler doğrultusunda karıştırıldı. Tüp kısa süre santrifüjlendi. Revers transkriptaz reaksiyonuna kadar buz üzerinde bekletildi.

Tablo 7. cDNA sentezi için kullanılan mastermiks içerikleri ve volümleri

20 µl Revers Trankripta Reaksiyonu için	Hacim
10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
RNase içermeyen su	3,5 µl
RNA Örneği	10 µl

Revers transkriptaz reaksiyonu için 10’ar µl mastermix ve 10 µl Rna örneği tüplere dağıtıldı. Hava kabarcıklarını gidermek ve içeriği karıştırmak için kısa süre santrifüj edildi. Tablo 8’de gösterilen koşullarda cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları

RT adımları	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus
1.adım	25	10 dakika	1
2.adım	37	120 dakika	1
3.adım	85	5 dakika	1
4.adım	4	∞	1

3.5.3.Real time qPCR

cDNA elde edildikten sonra real time qPCR aşamasına geçildi. Bunun için 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (A.B.T.™ , Türkiye) kiti kullanıldı. Housekeeping gen olarak ACT1, referans suş olarak *Candida albicans* ATCC 90028 kullanıldı.

Çalışmamızda kullanılan primer dizileri Tablo 9’da, Real time qPCR için kullanılan mastermiks içerikleri Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Real time qPCR’da kullanılan primer dizileri

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
ERG11-F	ACTCATGGGGTTGCCAATGTT
ERG11-R	GAGCAGCATCACGTCTCCAA
ACT1-F	AGGTTTGGAAGCTGCTGGTA
ACT1-R	ACG TTCAGCAATACCTGGGA
SAP2-F	AACAACAACCCACTAGACATCACC
SAP2-R	TGACCATTAGTAACTGGGAATGCTTTAGGA

Tablo 10. Real time qPCR için kullanılan mastermiks içeriği

20 µl PCR reaksiyonu için	Hacim
A.B.T. TM 2X qPCR SYBR- Green MasterMix	10 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA örneği	2 µl
RNase İçermeyen Distile Su	6 µl

MasterMix hazırlandıktan sonra, tablo 11’deki reaksiyon koşullarında, Montania 4896 (Anatolia geneworks, Türkiye) cihazında real time qPCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 11. Real time qPCR reaksiyon koşulları

PCR Adımı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denaturasyonu	95	300 saniye	1
Denaturasyon	95	10-30 saniye	25-40
Bağlanma	55-68	10-60 saniye	
Erime Eğrisi	65-95	2-5 saniye/adım	1

3.5.4. Rölatif Kantitasyon Hesaplama

Relatif ekspresyonlar $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile hesaplandı. Referans olarak ACT1 geni, normalizasyon için *Candida albicans* ATCC 90028 suşu kullanıldı.

3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS v.22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı ile yapılmıştır. Sayısal verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiş, grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U test kullanılmış, kategorik verilerin analizi ise Fisher-Freeman-Halton testi ile yapılmıştır. Korelasyon analizi için Spearman's rho kullanılmıştır. Sayısal verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortanca değer, minimum-maksimum ile kategorik veriler sayı ve yüzde olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada toplam 127 adet *Candida albicans* suşu değerlendirilmiştir. Örneklerin 79'u (%62) kadın, 48'i (%38) erkek hastalara aittir. Hastaların yaş aralığı 0-93 olup, yaş ortalaması 55,8 ve ortanca değeri 63'tür. Çalışmamızdaki mayaların 56'sı (%45) yataklı servislerden, 47'si (%37) polikliniklerden, 24 (%18)'ü ise yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. Çalışılan mayaların örnek türüne göre dağılımı Tablo 12'da gösterilmiştir.

Tablo 12. Suşların örnek türüne göre dağılımı

Örnek Türü	Sayı	%	P değeri
İdrar	84	66,1	p<0,001
Vajen	17	13,3	
Balgam	12	9,4	
Kan	3	2,3	
Yara	3	2,3	
DTA*	3	2,3	
Kan kateter	1	0,78	
BAL**	1	0,78	
Periton	1	0,78	
Plevra	1	0,78	
Apse	1	0,78	
Toplam	127	100	

*Derin Trakeal Aspirat, **Bronkoalveolar Lavaj

Tür düzeyinde tanımlama sonrası elde edilen 127 adet *Candida albicans* suşuna, KH_2PO_4 ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ve içermeyen 2 (iki) ayrı BSA besiyerinde proteinaz aktivitesi bakılmıştır. Sonuçların okunması esnasında, bu kimyasalları içermeyen besiyerlerindeki değerlendirme, içeren besiyerlerindeki değerlendirmeye göre, daha az bulanıklık olduğundan daha kolay olmuştur. Her iki besiyerinde ölçülen zon çapları birbiri ile aynı olmuştur. Toplam 127 suştan 103 tanesinde (%81,1) proteinaz pozitifliği saptanmıştır. Suşların proteinaz aktivitesine göre sınıflandırılması Tablo 13’de yer almaktadır.

Tablo 13. Suşların proteinaz aktivitesine göre dağılımı

Proteinaz aktivitesi	Sayı (n)	%
4+	91	71,65
3+	11	8,66
2+	0	0
1+	1	0,78
Negatif	24	18,89

İzole edilen 127 *Candida albicans* suşuna sıvı mikrodilüsyon antifungal duyarlılık testi yapılmıştır. Spektrofotometrik mikropak okuyucu 24. saatte ile 450 nm dalga boyunda değerlendirilen sonuçlara göre 127 izolattan 123 (%96,86) tanesi ve *Candida albicans* ATCC 90028 suşu flukonazole duyarlı, dört adet (%3,14) suş dirençli bulunmuştur. Suşların MİK değerlerine göre dağılımı tablo 14’de yer almaktadır.

Tablo 14. Suşların flukonazol MİK değerlerine göre dağılımı

MİK değeri	Sayı (n=127)		%
	n	%	
0,125	63	49,60	*96,86
0,25	46	36,22	
0,5	7	5,51	
1	4	3,14	
2	3	2,36	
16	3	2,36	**3,14
32	1	0,78	

*Duyarlı suşların oranı,**Dirençli suşların oranı

İzolatların 24. Saat MİK değerleri kaydedildikten sonra toleranslarını değerlendirebilmek için inkübasyon süreleri 48 saate uzatıldı ve 48 saat sonunda yeniden değerlendirilme yapıldı. Bu süre sonunda toplam 127 suşun 38 (%29,92) tanesinde MİK değerlerinin yükseldiği gözlenirken, 89 (%70,08) tanesinde ise değişim olmadı. MİK değerleri yükselmesi sonrası duyarlı profilden doz bağımlı duyarlı profile geçen 3 (üç) suş oldu, diğer suşların duyarlılık profili değişmedi. Ölçülen MİK değerinde değişim olan suşların sayısı ve kaç dilüsyon değişim kaydedildiği Tablo 15’de gösterildi. Flukonazole dirençli suşların ikisinde MİK değerlerinde bir dilüsyon yükselme olurken, diğer ikisinde değişiklik gözlenmedi.

Tablo 15. İzolatların 48. Saatte ölçülen flukonazol MİK değerlerinin 24. Saatte ölçülene göre değişim durumları

MİK yükselme seviyesi	Toplam suş	%
Bir dilüsyon yükselme	33	25,98
İki dilüsyon	4	3,14
Üç dilüsyon	1	0,78
Yok	89	70,07
Toplam	127	100

İzolatların 48. saatte yapılan MİK ölçümlerinde gelişen yükselmeler ile flukonazole olan duyarlılık arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p=0,637$). Bu durum Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. Flukonazol duyarlılığı ve 48. saat MİK yükselmesi ilişkisi

MİK yükselmesi 48. saat sonucu	Duyarlılık durumu		Toplam (n)	p değeri
	S (n)	R (n)		
Yok	87	2	89	0,637
1kat	31	2	33	
2 kat	3	0	3	
3 kat	2	0	2	

Çalışma suşlarının proteinaz değerleri negatif, 1+, 2+, 3+ ve 4+ olarak gruplandırılmıştır. Bu gruplara göre suşların antifungal duyarlılık değerleri incelenmiş; ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,718$). 2+ proteinaz değeri olan suş saptanmamıştır. Suşların flukonazole duyarlılık durumlarına göre proteinaz değerleri karşılaştırılması tablo 17’de gösterilmiştir.

Candida albicans suşlarının, hesaplanan proteinaz değerleri herhangi bir sınıflama yapılmadan ve MİK değerleri sayısal olarak incelenerek istatistiksel analiz yapıldığında da, anlamlı bir sonuç sonuç vermediği görülmüştür (p=0,454)

Tablo 17. İzolatların flukonazole duyarlılık durumlarının proteinaz aktiviteleri ile ilişkisi

Proteinaz değeri		MİK		Toplam (n)	P
		S (n)	R (n)		
Yok	n	24	0	24	0,718
1+	n	1	0	1	
3+	n	11	0	11	
4+	n	87	4	91	

Çalışılan 127 izolatın 44 tanesinin ERG11 VE SAP2 gen ekspresyon seviyeleri qPCR ile çalışıldı. PCR yapılan 44 suşun ERG11 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde; 25 suşun ATCC suşuna göre daha fazla, 14 suşun daha az ERG11 ekprese ettiği görülmüştür. 5 suşta ise ERG11 ekspresyonu görülmemiştir. Ekspresyon seviyelerinin ATCC' ye göre kat değişimleri Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. İzolatların *Candida albicans* ATCC 90028’e göre ERG11 ekspresyon seviyeleri

Suş numarası	ERG11 kat değişimi
6	2,4
16	1,19
29	333,15
63	1,06
67	2,05
94	3,42
128	4,41
206	2,59
325	5
384	1,91
391	2,21
416	2,7
464	67,65
483	3,79
486	1,34
496	5,98
546	10,71
577	1,04
613	2,48
629	11,96
633	1,25
638	1,01
645	4,09
712	72,01
721	15,14

PCR yapılan 44 suşun SAP2 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde; 13 suşun ATCC suşuna göre daha fazla, 12 suşun ise daha az SAP2 ekprese ettiği görülmüştür. 19 suşta ise SAP2 ekspresyonu

görülmemiştir. SAP2 ekspresyon seviyelerinin ATCC' ye göre kat değişimleri tablo 19'te gösterilmiştir.

Tablo 19. İzolatların *Candida albicans* ATCC 90028'e göre SAP2 ekspresyon seviyeleri

Suş numarası	SAP 2 kat değişimi
16	1,3
29	168,9
45	1,04
67	4,44
128	4,23
206	2,38
384	1,95
486	1,39
496	2,28
546	2,08
613	46,21
635	1,43
712	12,82

PCR sonuçlarına göre hem ERG11'i hem de SAP2'yi ATCC suşuna göre daha fazla eksprese ettiği saptanan toplam 11 suşun ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, ERG11 ve SAP2 değerleri arasında orta düzeyde pozitif yönlü korelasyon bulunmuştur ($p:0,029$, $r:0,655$) .

Ortak olarak ERG11 ve SAP2 pozitifliği gösteren 26 suşun ekspresyon seviyeleri incelendiğinde de, ERG11 ve SAP2 değerleri arasında orta düzeyde pozitif yönlü korelasyon görülmüştür ($p<0,001$).

ERG 11 ve SAP2 ekspresyonu grupsal ilişkisi (negatif, ATCC'den az ekspresyon ve ATCC'den fazla ekspresyon olmak üzere 3 grup) tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. Suşların ERG11 ve SAP2 ekspresyon durumlarının birbirleri ile ilişkisi

ERG11 ekspresyonu	SAP2 ekspresyonu			Toplam	p
	Negatif (n)	ATCC'den az (n)	ATCC'den fazla (n)		
Negatif (n)	3	1	1	5	0,074
ATCC'den az (n)	5	8	1	14	
ATCC'den fazla (n)	8	6	11	25	
Toplam (n)	16	15	13	44	

Suşların ERG11 ekspresyon seviyeleri ve flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak bağlantılı olduklarına dair bir değer bulunmamıştır. Flukonazole duyarlılıkların ERG11 ekspresyonu ile grupsal (negatif ekspresyon, ATCC suşundan az ekspresyon ve ATCC suşundan fazla ekspresyon olmak üzere 3 grup) karşılaştırılması Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21. Flukonazole duyarlılıkların ERG11 ekspresyonu ile grupsal (negatif ekspresyon, ATCC suşundan az ekspresyon ve ATCC suşundan fazla ekspresyon olmak üzere üç grup) karşılaştırılması

ERG11 ekspresyonu		Duyarlılık		Toplam	p
		S	R		
Negatif	n	5	0	5	>0,999
ATCC'den az	n	13	1	14	
ATCC'den fazla	n	22	3	25	
Toplam	n	40	4	44	

44 adet *Candida albicans* suşundan, ATCC suşuna göre fazla ERG11 eksprese ettiği bulunan 25 suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri ile flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır (p:0,358) ERG11 ekspresyonu olmayan beş negatif suş çıkarılarak kalan 39 suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri yapılan hesaplamada ERG11 ekspresyonu ve flukonazole duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,817).

Suşların SAP2 ekspresyon seviyeleri ve flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak bağlantılı olduklarına dair bir değer bulunmamıştır. Flukonazole duyarlılıkların SAP2 ekspresyonu ile grupsal (negatif ekspresyon, ATCC suşundan az ekspresyon ve ATCC suşundan fazla ekspresyon olmak üzere üç grup) karşılaştırılması Tablo 22’de gösterilmiştir.

Tablo 22. Flukonazole duyarlılıkların SAP2 ekspresyonu ile grupsal karşılaştırılması

SAP2 ekspresyonu	Flukonazole Duyarlılık		Toplam	P
	S	R		
Negatif (n)	15	1	16	0,6
ATCC’den az (n)	14	1	15	
ATCC’den fazla (n)	11	2	13	
Toplam	40	4	44	

44 adet *Candida albicans* suşundan, ATCC suşuna göre fazla SAP2 eksprese ettiği bulunan 13 suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri ile flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır (p:0,358). SAP2 ekspresyonu olmayan 19 negatif suş çıkarılarak kalan 25 suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri ile yapılan hesaplamada, ERG11 ekspresyonu ve flukonazole duyarlılık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,554).

127 adet *Candida albicans*'tan PCR yapılan 44 suş, proteinaz değerlerine göre sınıflandırıldı. Proteinaz pozitifliğinin, suşların ERG11 ekspresyon seviyesi gruplarına göre durumları tablo 23'te gösterilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır.

Tablo 23. İzolatların ERG11 ekspresyon durumlarının proteinaz varlığı ile ilişkisi

ERG11 ekspresyonu	Proteinaz varlığı		p değeri
	Yok	4+	
Negatif (n=5)	2	3	0,415
Ekspresyon değeri ATCC suşundan daha düşük pozitif olanlar (n=14)	4	10	
Ekspresyon değeri ATCC suşundan daha düşük pozitif olanlar (n=25)	13	12	

ERG11 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri de, suşların proteinaz özelliği ile karşılaştırılmıştır. 44 adet suştan ERG11 ekspresyonu saptanan 39 tanesinin 22'sinde proteinaz pozitifliği varken, 17 tanesi proteinaz negatif bulunmuştur. Proteinaz pozitifliği ve ERG11 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunmamıştır ($p=0,126$).

ERG11 ekspresyon seviyesi incelenen 44 örnekten, ATCC suşuna göre daha fazla gen ekprese ettiği saptanan 25 suşun ekspresyon seviyeleri de, proteinaz varlığına göre incelendi. Bu suşların 12 tanesi proteinaz pozitif, 13 tanesi ise proteinaz negatifti. İstatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,328$).

44 adet suşun proteinaz pozitifliğinin, suşların SAP2 ekspresyon gruplarına göre durumları Tablo 24'de gösterilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır.

Tablo 24. İzolatların proteinaz aktivitelerinin SAP2 ekspresyonu ile ilişkisi

SAP2 ekspresyonu	Proteinaz varlığı		Toplam	P
	Yok	4+		
Negatif (n)	9	7	16	0,409
ATCC suşundan az ekspresyon (n)	5	10	15	
ATCC suşundan fazla ekspresyon (n)	5	8	13	
Toplam (n)	19	25	44	

SAP2 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri de, suşların proteinaz özelliği ile karşılaştırılmıştır. 44 adet suştan SAP2 ekspresyonu saptanan 28 tanesinin 10'unda proteinaz pozitifliği varken, 18 tanesi proteinaz negatif bulunmuştur. Proteinaz pozitifliği ve SAP2 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunmamıştır ($p=0,811$).

SAP2 ekspresyon seviyesi incelenen 44 örnekten, ATCC suşuna göre daha fazla gen ekprese ettiği saptanan 13 suşun ekspresyon seviyeleri de, proteinaz varlığına göre incelendi. Bu suşların 8 tanesi proteinaz pozitif, 5 tanesi ise proteinaz negatifti. Karşılaştırmalı değerler Tablo 24'te gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,242$).

127 adet *Candida albicans*'tan PCR yapılan 44 suş, 48. saat MİK ölçümlerindeki değişim değerlerine göre sınıflandırıldı. Bu değişimlerin ERG11 geni ekspresyon seviyeleri ile ilişkisi incelendi. 44 adet suşun ERG11 ekspresyon seviyesi gruplarına (negatif ekspresyon, ATCC suşundan az ekspresyon ve ATCC suşundan fazla ekspresyon olmak üzere üç grup) göre MİK değişim durumları Tablo 25'te gösterilmiştir.

Tablo 25. İzolatlarda 48. Saat MİK yükselmesinin ERG11 ekspresyonu ile ilişkisi

ERG11 ekspresyon seviyesi	48. saat MİK yükselmesi		Toplam	p
	Yok	Var*		
Negatif (n)	3	2	5	0,066
ATCC suşundan az ekspresyon (n)	11	3	14	
ATCC suşundan fazla ekspresyon (n)	10	15	25	
Toplam (n)	24	20	44	

*MİK seviyesinde 48.saatın sonunda bir dilüsyon yükselme olanlar

Ayrıca 44 suştan ERG11 ekspresyonu saptanan 39 suşun (21'i MİK değişimi negatif, 18'i pozitif), ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri ile suşlardaki MİK değişimi varlığı karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,037$).

ERG11 ekspresyon seviyesi ATCC suşuna göre fazla saptanan 25 *Candida albicans* suşunun 10 tanesinde 48. Saat MİK değişimi pozitifken, 15 tanesinde değişim gözlenmedi. Bu 25 suşa ait ERG11 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri ile yapılan istatistiksel analizde, MİK değişimi ile aralarında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p=0,618$).

127 adet *Candida albicans*'tan PCR yapılan 44 suş, 48. saat MİK ölçümlerindeki değişim değerlerine göre sınıflandırıldı. Bu değişimlerin SAP2 geni ekspresyon seviyeleri ile ilişkisi incelendi. 44 adet suşun SAP2 ekspresyon seviyesi gruplarına (negatif ekspresyon, ATCC suşundan az ekspresyon ve ATCC suşundan fazla ekspresyon olmak üzere üç grup) göre MİK değişim durumları Tablo 26'da gösterilmiştir.

Tablo 26. İzolatlarda 48. Saat MİK yükselmesinin SAP2 ekspresyonu ile ilişkisi

SAP2 ekspresyon seviyesi	48. saat MİK yükselmesi		Toplam	P
	Yok	Var		
Negatif (n)	9	7	16	>0,999
ATCC suşundan az ekspresyon (n)	8	7	15	
ATCC suşundan fazla ekspresyon (n)	7	6	13	
Toplam (n)	24	20	44	

Ayrıca 44 suştan SAP2 ekspresyonu saptanan 28 suşun (15'i MİK değişimi negatif, 13'ü pozitif), ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri ile suşlardaki MİK değişimi varlığı karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,747$).

SAP2 ekspresyon seviyesi ATCC suşuna göre fazla saptanan 13 *Candida albicans* suşunun 6 tanesinde 48. Saat MİK değişimi pozitifken, 7 tanesinde değişim gözlenmedi. Bu 13 suşa ait SAP2 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri ile yapılan istatistiksel analizde, MİK değişimi ile aralarında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p=0,116$).

5. TARTIŞMA

İnvaziv mantar enfeksiyonları sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olup en sık karşılaşılan etkenler *Candida* ve *Aspergillus* türleridir. Günümüzde geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve immünsüpresif ilaçların yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren nötropeniler, artan kateter kullanımı ve artan majör kardiyak ve abdominal cerrahi gibi girişimsel işlemler nedeniyle *Candida* türleri fırsatçı hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ön sıralarda yer almaktadırlar (149). *Candida* enfeksiyonlarındaki bu artışa bağlı olarak antifungal ilaç kullanımının artması sonucunda gözlenen antifungal direnç sorunu, bu ilaçlara direnç mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalara hız kazandırmıştır (150). Çalışmamızda *C. albicans* suşlarındaki flukonazol direncinin, suşların proteinaz aktivitesiyle ve ERG11/ SAP2 genleri ile ilişkisi incelenmiştir.

Azol grubu anti fungaller *Candida albicans* 'ın tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Ancak uzun süreli kullanımlarında azollere direnç gelişmektedir. Wang ve ark. (151), 2022'de Çin'de yaptıkları bir antifungal direnci surveyans çalışmasında, *C. albicans* flukonazol direnci oranını %4,16 saptamışlardır. ABD'de 621 *C. albicans* izolatı ile yapılan bir çalışmada flukonazol direnç oranı %0,5 bulunmuştur (152). Gültekin ve ark. (153) çeşitli hasta örneklerinden izole ettikleri *Candida* izolatları ile yaptıkları 2010 tarihli çalışmada hiçbir *C. albicans* suşunu flukonazole dirençli bulmamıştır.. Erdem ve ark. (154) 2012'de nazokomiyal enfeksiyonları inceledikleri bir çalışmada, *C. albicans* suşlarındaki flukonazol direnci oranını %1,6 bulmuşlardır. Adı geçen çalışmada antifungal direnç oranlarının, değişik coğrafi bölgelerden bildirilen çalışmalar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise *C. albicans* suşlarındaki flukonazol direnci oranı %3,16 dır. Bu oran antifungal direncin coğrafi bölgeler arasındaki farklılıkları göz öüne alındığında literatürle uyumlu bulunmuştur.

Azol grubu antifungaller, mantar hücresinde ergosterol biyosentetik yolundaki 14 alfa demetilazı (ERG11 tarafından kontrol edilirler) hedef alırlar. Ergosterol, mantar hücre zarının önemli bir bileşenidir; sentezinin kesintiye uğraması 14a-metil sterollerin birikmesine neden olur. Bu da membran stabilitesini, geçirgenliğini ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesini engeller. ERG11 geninin fazla ekspresyonu *C. albicans* suşlarında yaygın azol direnç mekanizmalarından biri kabul edilir (155,156). Suchodolski ve ark. (156) 2022 yılında yaptıkları bir çalışmanın sonucuna göre *C. albicans*'ta ERG11 ekspresyonunun artmasının,

ergosterol üretiminin artmasına katkıda bulunduğunu ve suşların ilaç direncini arttırdığını bildirmiştir. Feng ve ark. (157) 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada; *C. albicans* suşlarında ERG11 ekspresyonunu, flukonazole dirençli suşlarda, duyarlı suşlara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek ($p < 0,05$) bulmuşlardır ve *C. albicans* izolatlarında azollere karşı direncin ERG11 genindeki mutasyonlarla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Franz ve ark. (155) azol dirençli *C. albicans* suşları ile yaptıkları çalışmada, artmış ERG11 ekspresyonu seviyesinin flukonazol direnci ile korele olduğunu bulmuş bulmuşlar ve *C. albicans*'ın flukonazol direnci geliştirmek için ERG11 ekspresyonu dahil farklı mekanizmalar kullandığını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise ERG11 overekspresyonu ile azol direnci arasında önemli bir ilişki olmadığı gösterilmiştir(158,159). Örneğin; Park ve Perlin (158), 32 azol dirençli *C. albicans* suşu ile yaptıkları çalışmada, ERG11 overekspresyon oranını % 12 bulmuşlar, azol direnci ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görmemişlerdir. White ve ark. (159) flukonazole duyarlı ve dirençli suşları eşit sayıda alarak yaptıkları bir çalışmada, ERG11 ekspresyonu ve flukonazol direnci arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır. Adı geçen çalışmada *C. albicans* izolatlarında ERG 11 gen mutasyonun sıklıkla meydana geldiğini ve dirençle güvenilir bir şekilde ilişkili olmadığını azol direnci fenotipiyle sonuçlanan mekanizmaların çeşitlili olabileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, 44 adet *Candida albicans* suşundan, ATCC suşuna göre fazla ERG11 ekprese ettiği bulunan 25 suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri ile flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, ERG 11 ekspresyonu ile flukonazol direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır ($p:0,358$). Yukarıda belirtilen araştırmalar göz önüne alındığında (154–157) çalışmamızda saptadığımız bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur. Ancak literatürde belirtilen mutasyonlar ile farklı direnç mekanizmalarının varlığı da düşünüldüğünde; çok sayıda dirençli *Candida* suşu kullanılarak yapılacak çalışmaların ERG11 ekspresyon seviyesinin duyarlılıkla ilişkisini tanımlamaya daha fazla katkısı olabileceğini düşündürmüştür.

İlk kez Staib tarafından 1969'da tanımlanan aspartil proteinazlar *C. albicans* tarafından salgılanan hidrolitik enzimler olup, önemli virülans faktörleri olarak kabul edilmiştir. Bunlar, enfeksiyonun farklı aşamalarında sırayla ifade edilen ve aspartil proteinazlar (Sap) gen ailesi tarafından kodlanan 10 üye içerir. Bunlardan Sap2 ana *C. albicans* proteinazıdır (160). *C. albicans* için önemli bir virülans faktörü olan Sap2, mukozal yüzeydeki makromoleküler proteinleri parçalayarak kendi büyümesi için besin sağlayabilir ve aynı zamanda *C.*

albicans'ın konakçıya yapışma ve istila etme yeteneğini artırabilir. Sap2'nin en dikkat çekici özelliklerinden biri parçalayabildiği proteinlerin çeşitliliğidir. Müsin ve salgısal immünoglobulin A (IgA) gibi mukozal yüzeyleri koruyan moleküller dahil olmak üzere birçok insan proteinini parçaladığı bilinmektedir. *C. albicans* proteinaz ailesine ilişkin yapısal çalışmalar, tek nitrojen kaynağı olarak proteinin varlığında in vitro en çok salgılanan protein olan Sap2 üzerinde yoğunlaşmıştır (47)

Gerges ve ark.(161), 181 *C. albicans* izolatu ile yaptıkları bir çalışmada, RT-qPCR ile yapılan analizde suşların %69,6'sında SAP2 gen ekspresyonu saptamıştır. Adı geçen çalışmada proteinaz üretimi ile flukonazol direnci arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.

Feng ve ark. (9) 50 adet *C. albicans* suşu ile yaptıkları bir çalışmada, flukonazol dirençli suşlarda SAP2 ekspresyonunu duyarlı suşlardakinden önemli ölçüde daha yüksek ($p < 0,05$) bulmuşlardır. Adı geçen çalışmada suşların SAP2 ve *ERG11* mRNA ekspresyonları da karşılaştırılmış ve aralarında pozitif lineer bir korelasyon görülmüş ve çalışmada elde edilen bulguların *C. albicans*'ın azol direnç mekanizmalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmeye yardımcı olabileceği ve *C. albicans*'ın neden olduğu hastalıkların klinik tedavisi için yeni bir yön sağlayabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda 44 adet *Candida albicans* suşundan, ATCC suşuna göre fazla SAP2 ekprese ettiği bulunan 13 (%29,5) suşun ekspresyonlarının sayısal değerleri ile flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır ($p:0,358$). Literatürle bulgularımız arasındaki saptadığımız uyumsuzluk olduğu görülmüş, bunun sebebinin çalışmamızda kullanılan azol dirençli köken sayısının az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Salgısal aspartil proteinazlar (Sap), *Candida* enfeksiyonu durumunda hif üretimi, adezyon ve invazyon dahil olmak üzere çok önemli biyolojik aktivitelere aracılık ederler (80). Sap; protein denatürasyonu, gen regülasyonu, immünojenik tepkiler oluşturma, enzim inhibitörlerine dirençli olma gibi patojenik özellikleri yoluyla *Candida albicans* için hayati önem kazanır (81–83). Sap; albümin, hemoglobin, keratin ve salgısal immünoglobulin A gibi birçok insan proteinini lezyon bölgelerinde bozar (85). Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteden kaçmak için konağın bağışıklık sisteminin hücrelerine ve moleküllerine saldırabildiğine dair kanıtlar da vardır. *C. albicans*'ta yüksek hidrolitik aktivite olduğu bulunmuştur. Bu aktivite,

Sap'lar için en az 10 üyeli multigen ailelerine atfedilir. Bu gen ailelerinin farklı üyeleri, çeşitli *Candida* enfeksiyonlarında farklı şekilde düzenlenir (79)

Mashaly ve ark. (162), 2022 yılında Mısır'da 88 *C. albicans* izolatu ile yaptıkları çalışmada, suşların proteinaz enzim aktivitesi pozitifliği oranını %77,3 bulmuşlardır. Ayrıca 29 izolatta (33%) flukonazol toleransı saptamışlar ve tolerans ile proteinaz üretme yeteneğinin belirgin pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Adı geçen çalışmada proteinazın flukonazol toleransı ile korelasyonunun, *Candida albicans* virülansının ekspresyonunda ve flukonazol toleransında rol alan kalsinörin yolu gibi yollara bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Patil ve ark. (163) 17 suş ile yaptıkları çalışmada %67 proteinaz pozitifliği saptamışlardır.

Gerges ve ark.'nın (161) çalışmasında, *C. albicans* izolatlarının % 63.2'sinde proteinaz aktivitesi saptanmış, bunlardan %52'si hafif ve %11.3'ü kuvvetli proteinaz üreticisi olarak tanımlanmıştır. Adı geçen çalışmada farklı araştırmalarda farklı proteinaz üretim oranlarının saptanmasının, enfeksiyonun türü ve bölgesindeki farklılıklara ve ayrıca virülans faktörlerinin ekspresyonunu ile enfeksiyonun evresine atfedilebileceğini bildirmişlerdir. Feng ve ark. (9) bir proteinaz inhibitörü olan ritonavirin azol dirençli suşlara etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, işleme alınan 50 *C. albicans* suşunun tamamının proteinaz aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır. Öksüz ve ark. (164) bir çalışmalarında *C. albicans* suşlarında proteinaz aktivitesi pozitifliğini %56,7 bulunmuştur. Yenişehirli ve ark. (147) 147 örnekle yaptıkları çalışmada bu oranı %81 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda toplam 127 suştan 103 tanesinde (%81,1) proteinaz pozitifliği saptanmıştır. Suşların %71,65'i kuvvetli, %8,66'sı orta, %0,78'i ise zayıf proteinaz aktivitesine sahip bulunmuştur. Sonuçlarımız literatürle uyumludur.

Feng ve ark. (9), çeşitli antifungallere dirençli *Candida albicans* suşları ile yaptıkları çalışmada, flukonazol dirençli suşlarda proteinaz aktivitesi değerleri ile anlamlı bir ilişki bulmazken, aynı çalışmada, farklı antifungallere çapraz direnç gösteren suşlarda ise proteinaz değerleri diğer gruplara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Özkan ve ark. (165) bir çalışmada, *C. albicans* suşları ve flukonazol MİK değerleri arasındaki ilişkiyi incelemiş; aralarında anlamlı bir istatistiksel değer bulmamıştır.

Çalışmamızda da *Candida albicans* suşlarının proteinaz varlığı “negatif, +1, +2, +3 ve +4” olarak gruplandırılmıştır. Bu gruplara göre suşların flukonazol duyarlılık durumları incelenmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p: 0,718). Hesaplanan proteinaz ve MİK değerleri sayısal olarak incelenerek istatistiksel analiz yapıldığında da, suşların proteinaz

özelliğinin flukonazol duyarlılığı ile bağlantısı bulunamamıştır ($p=0,454$). Sonuçlarımız literatürle uyumlu görünmektedir.

Literatürde ERG11 ekspresyon seviyelerinin suşların proteinaz aktivitesi ile ilişkisini inceleyen fazla çalışma yoktur. Said ve ark. (166), 2022 yılındaki çalışmalarında, flukonazol dirençli *Candida* suşlarında proteinaz aktivitesi ve ERG 11 ekspresyon seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Çalışmamızda suşların proteinaz aktivitesi ve ERG11 ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunmamıştır ($p=0,126$). Dirençli suş sayısı artırılarak planlanacak yeni bir çalışmada farklı sonuçlar alınabileceğini düşünüyoruz.

Dünyada ERG11 ve SAP2 ilişkisini inceleyen çalışma sınırlı sayıdadır. Feng ve ark.'ın (9) 50 adet *Candida albicans* suşu ile yaptıkları bir çalışmada, SAP2 ve ERG11 mRNA ekspresyonları arasında pozitif lineer bir korelasyon bulunmuştur. Çalışmamızda aynı anda ERG11 ve SAP2 pozitifliği gösteren 26 suşun ekspresyon seviyeleri incelendiğinde de, bu çalışmayla uyumlu şekilde, ERG11 ve SAP2 değerleri arasında orta düzeyde pozitif yönlü korelasyon görülmüştür ($p<0,001$).

Antifungal ilaç direnci üzerine yapılan çalışmalar, antifungal ilaç tedavilerine etkisi olan ilaç duyarlılığındaki azalmaları anlamamıza katkıda bulunmuştur; ancak antifungal ilaç direncinin yanı sıra, antifungal ilaçlara tolerans da yeterince araştırılmamıştır. Antifungal tolerans, mantar hücrelerinin, hücre büyümesini inhibe etmeye yeterli ilaç konsantrasyonlarının (yani MİK üstü ilaç konsantrasyonlarının) varlığında hayatta kalma kapasitesi olarak anlaşılabilir. Azol sınıfı ajanlara karşı toleransın, ilaç tedavilerinin etkinliğini sınırladığı için önemlidir. Bu nedenle, antifungal ilaç direncine ek olarak, gelecekte antifungal ilaç toleransı mekanizmalarının da ele alınması gerekli olacaktır (122)

Mashaly ve ark. (162), 2022 yılında Mısır'da 88 *C. albicans* izolatı ile yaptıkları çalışmada flukonazol tolerans oranını %33 bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada flukonazol toleransı ile proteinaz üretimi arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür

Çalışmamızda, 127 adet *C.albicans* suşunda, 48 saate uzatılmış inkübasyonda duyarlı profilden dirençliye profile dönüşen suş olmamıştır. Sadece üç adet suş duyarlı durumdan 'doz bağımlı duyarlı' duruma geçmiştir. İzolatların %25,98'inde bir dilüsyon %3,14'ünde iki dilüsyon ve %0,78'inde üç dilüsyon MİK yükselmesi olmuştur.

PCR yaptığımız 44 suştan, ERG11 gen ekspresyonu olan 39 suş incelendiğinde MİK yükselmesi varlığı ve ERG11 ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (**p=0,037**). SAP2 ekspresyonu ile MİK yükselmesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır (p=0,116).

Bu sonuçlar, *C. albicans*'ın azol dirençli mekanizmalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmemize yardımcı olabilir ve *C. albicans*'ın neden olduğu hastalıkların klinik tedavisi için yeni bir yön gösterebilir.



6. SONUÇLAR

Son yıllarda dünya genelinde *Candida* enfeksiyonlarında bir artış vardır. Buna bağlı olarak antifungal ilaç kullanımının artması sonucunda gözlenen antifungal direnç sorunu, bu ilaçlara direnç mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalara hız kazandırmıştır.

Çalışmamızda *C. albicans* suşlarındaki flukonazol direncinin, suşların proteinaz aktiviteleriyle ve ERG11/ SAP2 genleri ile ilişkisi incelenmiştir.

Çalışmamızda saptanan *C. albicans*'ta flukonazole direnç oranı, dünyada yakın tarihte yapılan çalışmalar ile benzer bulunmuştur (%3,14).

Çalışmamızda, 44 adet *Candida albicans* suşundan, ATCC suşuna göre fazla SAP2 ve ERG11 ekprese ettiği bulunan suşların ekspresyonlarının sayısal değerleri ile flukonazole duyarlılık ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır ($p:0,358$) Bu konuda yapılan çalışmalarda, değişken sonuçlar olsa da, genel olarak ERG11 ve SAP2 ekspresyon seviyeleri flukonazol dirençli suşlarda daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmaların pek çoğu duyarlı ve dirençli suşlar eşit sayıda alınarak yapılmıştır. Çalışmamızda ise dirençli suş sayısı azdır. Çok sayıda duyarlı ve dirençli suş sayılarını eşit alarak bir inceleme yapmak, ERG11 ve SAP2 ekspresyon seviyeleri ve duyarlılıkla ilişkilerini anlamamızda daha faydalı olabilirdi.

Çalışmamızda ekspresyon analizi yaptığımız ERG11 VE SAP2 genleri arasında pozitif bir lineer korelasyon bulunmuştur ($p<0,001$). Bu sonuç literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur ve ERG11 ve SAP2'nin *C. albicans*'ta belirli bir ilişkiye sahip olabileceğini, azol ilaçlarına karşı direncin ortaya çıkmasında birlikte etki edebileceklerini gösterebilir.

Literatürde proteinaz aktivitesi ve ERG11 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma az sayıdadır. Bu çalışmalarda bu iki özelliğin bağlantılı olabileceğine dair sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca proteinaz aktivitesinin SAP2 ekspresyonu ile ilişkisini inceleyen çalışmalarda da pozitif korelasyon lehine sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmamızda proteinaz aktivitesi ve ERG11 ekspresyonu ilişkisi ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir değer elde edilmemiştir. Bunun nedeni olarak gen ekspresyonu bakabildiğimiz suş sayısının yeterli olmaması düşünülebilir.

C. albicans'ta görülen flukonazol toleransının, suşların ERG11 gen ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda suşların 48. saat MİK

yükselmesinin ERG11 ekspresyonu ile ilişkisini incelediğimizde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,037$). SAP2 ekspresyonu ile flukonazol direnci arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunmamıştır.

Çalışmamız ERG11 ve SAP2 gen ekspresyon seviyesi bakabildiğimiz suş sayısı artırılarak ve dirençli duyarlı suş eşitliği sağlanarak tekrarlanabilir. Gelecekte, *Candida* enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü, SAP ailesi gibi virülans faktörlerini inhibe etmek için özel olarak modüle edilmiş farmakolojik veya immünolojik araçlarla sağlanabilir.



KAYNAKLAR

1. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug 1;73(4):293–300.
2. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jan 30];25(7):792–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30965100/>
3. Homei A, Worboys M. Homei A, Worboys M. *Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000: Mycoses and Modernity*. Basingstoke (UK): Palgrave Macmillan; 2013. PMID: 24228294. In: *Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000*. Palgrave Macmillan UK; 2013.
4. Howell SA, Hazen KC. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011 p. 1-29. In.
5. Walsh TH, Hayden RT, Larone DH. Larone DH. *Yeast and Yeast Like Organisms. Medically Important Fungi A Guide to Identification*. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2002 p.109-143.
6. Howell SA, Hazen KEVIN C., Brandt ME. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Landry M, Funke G, Richter S, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1984–2014.
7. Lee MK, Kim HR, Kang JO, Kim MN, Kim EC, Kim JS, et al. Susceptibility and trailing growth of *Candida albicans* to fluconazole: results of a Korean multicentre study. *Mycoses*. 2007 Mar;50(2):148-9. :15.
8. Gülat S, Doluca Dereli M. Flukonazole dirençli *Candida albicans* izolatlarında atım pompa ekspresyonlarının araştırılması [Investigation of the expression levels of efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates]. *Mikrobiyol Bul*. 2014 Apr;48(2):325-34.
9. Feng W, Yang J, Ma Y, Xi Z, Zhao X, Zhao X, et al. The effects of secreted aspartyl proteinase inhibitor ritonavir on azoles-resistant strains of *Candida albicans* as well as regulatory role of SAP2 and ERG11. *Immun Inflamm Dis*. 2021 Sep 1;9(3):667–80.
10. Yücel A. Tıp Mikolojisinin Dünü Ve Bugünü. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2014;30(2):191-8. [Internet]. Available from: www.ctf.edu.tr/dergionline/1999IOO.ls2199s2r1ft.hlm
11. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. *Baron & Tenover's Diagnostic Microbiology*. Fourteenth edition. USA, Mosby Inc.; 2017 p.757-843.
12. David WW. Antifungal Agents and Susceptibility Test Methods. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Landry M, Funke G, Richter S, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 2221–81.

13. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. 2nd ed. Churchill Livingstone; 2009. p. 197–229.
14. John E, Edwards JR. *Candida species*. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Seventh edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone; 2010 p.2656–2674. . In.
15. Sullivan DJ, Coleman DC. Taxonomy and Biology of *Candida*. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.15-27.
16. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. *Fundamental Medical Mycology*. New Jersey; 2012.
17. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.3–13. . In.
18. Bennett RJ, Turgeon BG. Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Oct 14 [cited 2023 Jan 31];4(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27763253/>
19. Sai S, Holland LM, Mcgee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of Mating within the *Candida parapsilosis* Species Group. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2011 Apr [cited 2023 Jan 31];10(4):578. Available from: [/pmc/articles/PMC3127640/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2127640/)
20. Fromtling RA, Rhodes JC, Dixon DM. Taxonomy, Classification, and Morphology of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1653-1658.
21. Tümbay E. *Candida Türleri*. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Öncü Basımevi-Güneş Kitabevi; 1999 p.1081-1086.
22. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. *Medical Microbiology*. Twenty third edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 2004 p.623-659.
23. Deorukhkar SC. Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. *Annals of Microbiology and Immunology*. 2018;1(1):1002.
24. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. All rights reserved Copyright 9 Munksgaard. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* Int J Oral Maxillofac Surg. 1996;25:136–44.
25. Barnett JA, Hansen EC, Guilliermond ; A, Stelling-Dekker ; N M, Lodder ; J, Kreger-Van Rij ; N J W, et al. A history of research on yeasts 8: taxonomy 1. *Yeast* [Internet]. 2004 [cited 2022 Dec 14];21:1141–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1154>
26. Ajello L. Italian contributions to the history of general and medical mycology. *Med Mycol*. 1998;36 Suppl 1:1-11. Erratum in: *Med Mycol* 1999 Apr;37(2):149. PMID: 9988487.
27. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An Introduction to the Medically Important *Candida* Species. In: Calderone R, Clancy C, editors. *Candida and Candidiasis*. 2011.
28. Anđ Ö. *Tıbbi Mikolojinin Tarihçesi*. In: Tümbay E, editor. *Tıbbi Mikoloji*. 1st ed. İzmir; 2021. p. 1–15.

29. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surv. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(9):3254–9.
30. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016 Oct 1;34:21–8.
31. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature Communications* 2018 9:1 [Internet]. 2018 Dec 3 [cited 2023 Jan 30];9(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07556-5>
32. Hilmioglu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, et al. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Jan 30];62(1):22–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/myc.12842>
33. Kwon-Chung K BJ *Candidiasis*. Kwon-Chung KJ, Bennett JE (eds) *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1992, pp. 280-336.
34. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Jan [cited 2023 Feb 7];6(1):e1000713. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000713>
35. Odds FC. *Candida Infections: An Overview*. <http://dx.doi.org/103109/10408418709104444> [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 1];15(1):1–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408418709104444>
36. Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: Colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med*. 1994 Oct 1;97(4):339–46.
37. Budtz Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol* [Internet]. 1975 Jun 1 [cited 2023 Feb 1];3(3):115–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0528.1975.tb00291.x>
38. Tapper-Jones LM, Aldred MJ, Walker DM, Hayes TM. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics. *J Clin Pathol* [Internet]. 1981 [cited 2023 Feb 1];34(7):706. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/493798/>
39. Main BE, Calman KC, Ferguson MM, Kaye SB, MacFarlane TW, Mairs RJ, et al. The effect of cytotoxic therapy on saliva and oral flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* [Internet]. 1984 [cited 2023 Feb 1];58(5):545–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6440071/>
40. Samaranayake LP, Calman KC, Ferguson MM, Kaye SB, MacFarlane TW, Main B, et al. The oral carriage of yeasts and coliforms in patients on cytotoxic therapy. *J Oral Pathol* [Internet]. 1984 [cited 2023 Feb 1];13(4):390–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6432983/>
41. Martin M v., Wilkinson GR. The oral yeast flora of 10-year-old schoolchildren. *Med Mycol*. 1983;21(2):129–35.

42. Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Influence of the hospital environment on yeast colonization in nursing students. *Med Mycol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Feb 9];40(3):311–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12146762/>
43. Dromer F, Improvisi L, Dupont B, Eliasiewicz M, Pialoux G, Fournier S, et al. Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV-infected couples could contribute to dissemination of fluconazole-resistant isolates. *AIDS* [Internet]. 1997 [cited 2023 Feb 9];11(9):1095–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9233455/>
44. Yücel a, Kantarcıoğlu sa. Candidaların Patojenlik Belirtgenleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2000;31(3):172–86.
45. Topçu A, Çerikçioğlu N. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. In: Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002 [cited 2023 Feb 10]. p. 1797–808. Available from: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EFD36587C4B003136>
46. Clemons K v, G Calich VL, Burger E, Fillerr SG, Graziutti M, Murphy J, et al. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Medical Mycolo gy* [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 11];38:99–111. Available from: https://academic.oup.com/mmy/article/38/Supplement_1/99/1026257
47. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2003 Sep [cited 2023 Feb 14];67(3):400. Available from: [/pmc/articles/PMC193873/](https://pmc/articles/PMC193873/)
48. De Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* [Internet]. 1998 [cited 2023 Feb 11];66(7):3317–25. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.66.7.3317-3325.1998>
49. Fonzi W. Downstream functions in *Candida* morphogenesis. Paper presented at the ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, 1999, Charleston, South Carolina. In.
50. Blankenship JR, Heitman J. Calcineurin Is Required for *Candida albicans* To Survive Calcium Stress in Serum. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Feb 11];73(9):5767. Available from: [/pmc/articles/PMC1231066/](https://pmc/articles/PMC1231066/)
51. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and Mammalian Transglutaminase Substrate Properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* (1979) [Internet]. 1999 Mar 5 [cited 2023 Feb 11];283(5407):1535–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.283.5407.1535>
52. Lo HJ, Köhler JR, Didomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* [Internet]. 1997 [cited 2023 Feb 11];90(5):939–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9298905/>
53. Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, et al. Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, INT1. *Science* (1979) [Internet]. 1998 Feb 27 [cited 2023 Feb 11];279(5355):1355–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.279.5355.1355>

54. Buurman ET, Westwater C, Hube B, Brown AJP, Odds FC, Gow NAR. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Jun 6 [cited 2023 Feb 11];95(13):7670. Available from: [/pmc/articles/PMC22718/](#)
55. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology* [Internet]. 9th ed. Elsevier; 2021. Available from: <http://evolve.elsevier.com/Murray/microbiology/>
56. Faix RG, Finkel DJ, Andersen RD, Hostetter MK. Genotypic analysis of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2023 Feb 11];14(12):1063–8. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/8745019>
57. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1994 [cited 2023 Feb 11];32(9):2299. Available from: [/pmc/articles/PMC263988/?report=abstract](#)
58. Finkelstein R, Reinhertz G, Hashman N, Merzbach D. Outbreak of *Candida tropicalis* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 1993 Oct [cited 2023 Feb 11];14(10):587–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8228151/>
59. Willke A, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3rd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
60. Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Dec 1;1(6):687–92.
61. Çerikçioğlu N. Mantarlarda Virülans Faktörleri. *ANKEM Derg*. 2012;26(2):261–9.
62. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2005 Apr [cited 2023 Feb 12];4(4):633. Available from: [/pmc/articles/PMC1087806/](#)
63. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2011 May;19(5):241–7.
64. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological Factors Influencing the Outcome of Nosocomial Bloodstream Infections: A 6-Year Validated, Population-Based Model 902-bed institution serving Iowa and the bordering areas of Continual prospective surveillance for nosocomial infections. [cited 2023 Feb 12]; Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/24/6/1068/339060>
65. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2023 Feb 12];8(9):1382–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16848788/>
66. Murillo LA, Newport G, Lan CY, Habelitz S, Dungan J, Agabian NM. Genome-Wide Transcription Profiling of the Early Phase of Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Feb 12];4(9):1562. Available from: [/pmc/articles/PMC1214198/](#)
67. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect*

- Immun [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2023 Feb 12];71(8):4333–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874310/>
68. Mateus C, Crow SA, Ahearn DG. Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induces Immediate Enhanced Tolerance to Fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Feb 12];48(9):3358. Available from: [/pmc/articles/PMC514749/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874310/)
 69. Suci PA, Tyler BJ. Action of Chlorhexidine Digluconate against Yeast and Filamentous Forms in an Early-Stage *Candida albicans* Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002 Nov [cited 2023 Feb 12];46(11):3522. Available from: [/pmc/articles/PMC128749/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874310/)
 70. Yücesoy M. *Candida* türlerinin virülans faktörleri ve konağa ait faktörler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 1999;13(3).
 71. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* [Internet]. 1990 Jun 1 [cited 2023 Feb 14];33(6):265–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/myc.1990.33.6.265>
 72. Hube B, Rllche R, Monod M, Sanglard D, Odds FC. Hube B, Ruchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv Exp Med Biol*. 1998;436:339-44.
 73. Calderone RA, Cihlar RL. *Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications*. 14th ed. New York: Marcel Dekker; 51–80 p.
 74. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the Changing Epidemiology of Fungal Infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(4):287–91.
 75. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* [Internet]. 1995 [cited 2023 Feb 14];63(5):1993. Available from: [/pmc/articles/PMC173255/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874310/)
 76. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia*. 1965 Oct;4(3):187–93.
 77. Borg M, Ruchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* [Internet]. 1988 [cited 2023 Feb 15];56(3):626. Available from: [/pmc/articles/PMC259337/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874310/)
 78. Cerikcioglu N, Alaçam R. Detection of secretory acid proteinase enzyme from *Candida* strains on protein supplemented agar media. *Mikrobiyol Bul* . 1993;27(4):344–51.
 79. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2023 Jan 25];48(6):365–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>
 80. Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 Jan 28];4(8):461–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-5822.2002.00206.x>
 81. Dhanasekaran S, Pradeep , Selvados P, Solomon , Manoharan S. Anti-Fungal Potential of Structurally Diverse FDA-Approved Therapeutics Targeting Secreted Aspartyl Proteinase (SAP) of *Candida albicans*: an In Silico Drug Repurposing Approach. 2010 [cited 2023 Jan 28]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04207-w>

82. De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* [Internet]. 1996 [cited 2023 Jan 28];64(2):466. Available from: [/pmc/articles/PMC173787/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731326/)
83. Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Jan 28];4(6):728–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731326/>
84. Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, Dolejší E, Hrušková-Heidingsfeldová O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *Eur J Biochem* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2023 Feb 21];268(9):2669–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2001.02152.x>
85. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol*. 2001 Aug;39(4):303-13. doi: 10.1080/mmy.39.4.303.313. PMID: 11556759.
86. Ghannoum M, Elteen KA. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* [Internet]. 1986 Sep 1 [cited 2023 Feb 14];24(5):407–13. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article/24/5/407/918656>
87. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* [Internet]. 1990 [cited 2023 Feb 21];58(2):508. Available from: [/pmc/articles/PMC258486/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731326/)
88. Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, Dolejší E, Hrušková-Heidingsfeldová O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*. 2001;268(9):2669–77.
89. Candidosis V, Cassone A, de Bernadis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a Correlation between Proteinase Secretion and. Source: *The Journal of Infectious Diseases*. 1987;156(5):777–83.
90. Macdonald F, Odds FC. Virulence For Mice Of A Proteinase-Secreting Strain Of *Candida Albicans* And A Proteinase-Deficient Mutant. *Microbiology (N Y)*. 1983 Feb 1;129(2):431–8.
91. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* [Internet]. 1985 [cited 2023 Feb 14];49(3):571. Available from: [/pmc/articles/PMC261208/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731326/)
92. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1998 [cited 2023 Feb 14];11(1):121. Available from: [/pmc/articles/PMC121378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731326/)
93. Rüchel R. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1981 May 14;659(1):99–113.

94. Tsuobi R, Kurita Y, Negi M, Ogawa H. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit the cell growth of *C. albicans*. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1985 [cited 2023 Feb 14];85(5):438–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3902988/>
95. Kuştımur S. *Candida*'da virulans faktörleri. In 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Tutanaklar; 1999. p. 145–50.
96. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* [Internet]. 1990 [cited 2023 Feb 14];58(2):508. Available from: </pmc/articles/PMC258486/?report=abstract>
97. Ross IK, de Bernardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* [Internet]. 1990 [cited 2023 Feb 14];136(4):687–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2204678/>
98. White TC, Miyasaki SH, Agabian N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* [Internet]. 1993 [cited 2023 Feb 14];175(19):6126. Available from: </pmc/articles/PMC206706/?report=abstract>
99. Hoover CI, Jantapour MJ, Newport G, Agabian N, Fisher SJ. Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1998 Oct [cited 2023 Mar 1];167(2):163–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9809417/>
100. Morrow B, Srikantha T, Soll DR. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1992 Jul [cited 2023 Feb 22];12(7):2997. Available from: </pmc/articles/PMC364513/?report=abstract>
101. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* [Internet]. 1994 Oct 1 [cited 2023 Feb 22];14(1):87–99. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01269.x>
102. Procop W, Church DL, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th ed. Philadelphia; 2017.
103. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* [Internet]. 1998 [cited 2023 Feb 22];144 (Pt 10)(10):2731–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9802014/>
104. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003 Dec;36(4):223–8. PMID: 14723249.species.
105. Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, et al. In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. Vol. 67, *INFECTION AND IMMUNITY*. 1999.
106. Staib F. Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* [Internet]. 1969 May [cited 2023 Feb 24];37(4):345–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5797623/>

107. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of Clinical Mycology, Second Edition. Springer; 2011.
108. A Costa, C Costa, A Misefari, A Amato. On the enzymatic activity of certain fungi. VII. Phosphatidase activity on media containing sheep's blood of pathogenic strains of *Candida albicans*. Atti Soc Sci Fis Mat Nat XIV:93–101, 1968.
109. H Werner. Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi. Zentralbl Bakteriol 200: 113–124, 1966.
110. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. Med Mycol. 1985;23(1):47–54.
111. Hube B, Hess D, Baker CA, Schaller M, Schäfer W, Dolan JW. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. Microbiology (Reading). 2001 Apr;147(Pt 4):879-889. doi: 10.1099/00221287-147-4-879. PMID: 11283284. [cited 2023 Feb 24]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283284/>
112. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz Melnick&Adelbergs Medical Microbiology. 26th ed. McGraw-Hill Education / Medica; 2012.
113. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014;20(4):329–44.
114. Morais Vasconcelos Oliveira J, Conceição Oliver J, Latércia Tranches Dias A, Barbosa Padovan AC, Siqueira Caixeta E, Caixeta Franco Ariosia M. Detection of ERG11 Overexpression in *Candida albicans* isolates from environmental sources and clinical isolates treated with inhibitory and subinhibitory concentrations of fluconazole. Mycoses [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Jan 23];64(2):220–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/myc.13208>
115. Hilmioglu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu Eskişehir: Kongre Kitabı 2002; 125-133.
116. Çerikçioğlu N. Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 1145-1158.
117. yarar muradiye. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI KLİNİK MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* SUŞLARINDA SAP GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI UZMANLIK TEZİ.
118. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanism [Internet]. [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://www.europeanreview.org/article/112>
119. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. 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 [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2023 Mar 18];48(4):1366. Available from: [/pmc/articles/PMC2849609/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/204849609/)

120. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gyax SE, et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2012 Oct [cited 2023 Mar 18];11(10):1289–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22923048/>
121. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Cantón E, Pemán J. Emerging Resistance to Azoles and Echinocandins: Clinical Relevance and Laboratory Detection. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2010 [cited 2023 Mar 14];4(3):186–95. Available from: https://www.academia.edu/35254368/Emerging_Resistance_to_Azoles_and_Echinocandins_Clinical_Relevance_and_Laboratory_Detection
122. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2023 Mar 18];2(2):73–85. Available from: <https://europepmc.org/article/med/11901654>
123. Brammer KW, Coakley AJ, Jezequel SG, Tarbit MH. The disposition and metabolism of [14C]fluconazole in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 1991;19(4).
124. Pfaller MA, Diekema DJ, Steele-Moore L, Denys G, Staley C, Dpersio JR, et al. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2004 [cited 2023 Mar 8];10 Suppl 1(SUPPL. 1):11–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14748799/>
125. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In Vitro Activities of Posaconazole (Sch 56592) Compared with Those of Itraconazole and Fluconazole against 3,685 Clinical Isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2001 [cited 2023 Mar 8];45(10):2862. Available from: </pmc/articles/PMC90743/>
126. González GM, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D. In vitro activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol* [Internet]. 2005 May [cited 2023 Mar 8];43(3):281–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16010855/>
127. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002 Oct [cited 2023 Mar 8];46(10):3298–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234865/>
128. Almyroudís NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. In Vitro Susceptibilities of 217 Clinical Isolates of Zygomycetes to Conventional and New Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Jul [cited 2023 Mar 8];51(7):2587. Available from: </pmc/articles/PMC1913247/>
129. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2023 Mar 8];2(2):73–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11901654/>
130. Borst A, Raimer MT, Warnock DW, Morrison CJ, Arthington-Skaggs BA. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction

- of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Feb [cited 2023 Mar 8];49(2):783–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15673768/>
131. Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1998 Nov [cited 2023 Mar 10];32(3):223–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9884840/>
 132. Ryder NS. Squalene epoxidase as a target for the allylamines. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 1991 [cited 2023 Mar 4];19(3):774–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1783214/>
 133. Pasqualotto AC, Thiele KO, Goldani LZ. Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2023 Mar 5];11(2):165–74. Available from: <https://europepmc.org/article/med/20112166>
 134. Sigurgeirsson B, van Rossem K, Malahias S, Raterink K. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group, dose-ranging study to investigate the efficacy and safety of 4 dose regimens of oral albaconazole in patients with distal subungual onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2023 Mar 5];69(3):416–425.e1. Available from: <http://www.jaad.org/article/S0190962213003010/fulltext>
 135. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Mar 12];33(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349998/>
 136. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR>
 137. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 12];18 Suppl 7(SUPPL.7):9–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137134/>
 138. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016 Nov 4 [cited 2023 Mar 12];62(4):e1–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26679628/>
 139. Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative Study of the NCCLS and Flow Cytometry Methods for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 May [cited 2023 Mar 13];42(5):2249–51. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.5.2249-2251.2004>
 140. Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2000 [cited 2023 Mar 13];44(10):2752–8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.10.2752-2758.2000>
 141. Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Mar 13];43(6):2586–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956368/>

142. Wolk DM, Clark AE. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. Clin Lab Med. 2018 Sep 1;38(3):471–86.
143. Sanguinetti M, Posteraro B. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential. <http://dx.doi.org/10.1080/1478945020161231578> [Internet]. 2016 Oct 2 [cited 2023 Mar 13];13(10):965–77. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14789450.2016.1231578>
144. Gygax SE, Chadwick SG, Schuyler JA, Vermitsky JP, Adelson ME, Mordechai E. X-Plate Technology: A new method for detecting fluconazole resistance in *Candida* species. J Med Microbiol [Internet]. 2013 May 1 [cited 2023 Mar 13];62(PART5):720–6. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.054445-0>
145. Li W, Yu D, Gao S, Lin J, Chen Z, Zhao W. Role of *Candida albicans*-Secreted Aspartyl Proteinases (Saps) in Severe Early Childhood Caries. Int J Mol Sci [Internet]. 2014 Jun 13 [cited 2022 Jun 29];15(6):10766. Available from: [/pmc/articles/PMC4100179/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2455401/)
146. Barros LM, Boriollo MFG, Alves ACBA, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. Arch Oral Biol. 2008 Dec 1;53(12):1172–8.
147. Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoglu E. Mikrobiyol Bul . 2010 Jan;44(1):71-7. [cited 2023 Jan 25]. [Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens] - PubMed. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20455401/>
148. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents.
149. Dalyan Cilo B, Topaç T, Ağca H, Sağlam S, Efe K, Ener B. *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılığının belirlenmesinde Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması [Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution methods for determining the susceptibilities of *Candida* isolates] . Mikrobiyol Bul. 2018 Jan;52(1):35–48.
150. Kamai Y, Maebashi K, Kudoh M, Makimura K, Naka W, Uchida K, et al. Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. Microbiol Immunol [Internet]. 2004 [cited 2023 Nov 17];48(12):937–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15611610/>
151. Wang Q, Cai X, Li Y, Zhao J, Liu Z, Jiang Y, et al. Molecular identification, antifungal susceptibility, and resistance mechanisms of pathogenic yeasts from the China antifungal resistance surveillance trial (CARST-fungi) study. Front Microbiol. 2022 Oct 6;13.
152. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: Temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Aug 1;82(4):303–13.

153. Bir Üçüncü Basamak Hastanesinde Erişkin Kandidemi Olgularının Epidemiyolojik Özellikleri ve Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi Y, Yenigün Koçak B, Üniversitesi Tıp Fakültesi T, Hastalıkları Anabilim Dalı E. Evaluation of Epidemiological Characteristics and Risk Factors of Candidemia in Adult Patients in a Tertiary-Care Hospital.
154. Erdem F, Tuncer Ertem G, Oral B, Karakoç E, Pekcan Demiröz A, Tülek N, et al. Candida Türlerine Bağlı Nozokomiyal Enfeksiyonların Epidemiyolojik ve Mikrobiyolojik Açidan Değerlendirilmesi Epidemiological and Microbiological Evaluation of Nosocomial Infections Caused by Candida Species.
155. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1998 [cited 2023 Nov 16];42(12):3065–72. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
156. Suchodolski J, Muraszko J, Korba A, Bernat P, Krasowska A. Lipid composition and cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* influence the efficacy of fluconazole–gentamicin treatment. *Yeast* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Nov 16];37(1):117. Available from: [/pmc/articles/PMC7004182/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3244182/)
157. Feng W, Yang J, Xi Z, Qiao Z, Lv Y, Wang Y, et al. Mutations and/or Overexpressions of *ERG4* and *ERG11* Genes in Clinical Azoles-Resistant Isolates of *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Jul 16];23(5):563–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27976986/>
158. Park S, Perlin DS. Establishing Surrogate Markers for Fluconazole Resistance in *Candida albicans* [Internet]. Vol. 11, MICROBIAL DRUG RESISTANCE. 2005. Available from: www.molecular-beacons.org
159. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002 [cited 2023 Nov 16];46(6):1704–13. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
160. Lian CH, Liu W Da. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2022 Jul 25];50(5):383–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0507.2007.01384.x>
161. Gerges MA, Fahmy YA, Hosny T, Gandor NH, Mohammed SY, Mohamed TMA, et al. Biofilm Formation and Aspartyl Proteinase Activity and Their Association with Azole Resistance Among *Candida albicans* Causing Vulvovaginal Candidiasis, Egypt. *Infect Drug Resist*. 2023;16:5283–93.
162. Mashaly GES, Zeid MS. *Candida albicans* Genotyping and Relationship of Virulence Factors with Fluconazole Tolerance in Infected Pediatric Patients. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2022 Apr [cited 2022 May 22];15:2035–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35480061/>
163. Patil S, Ugargol AR, Ns S. Comparison of Two Methods For Detection of Secreted Aspartyl Proteinase in Urinary Isolates of *Candida* Species National Journal of Medical Research Comparison of Two Methods or Detection of Secreted Aspartyl Proteinase in Urinary Isolates

of Candida Species F Natl J Med Res 2014; 4 (02) : 119-121 [Internet]. Vol. 4. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/263776792>

164. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, et al. Phospholipase and proteinase activities in different Candida species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis. 2007;60(5):280–3.
165. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of Candida species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2005 [cited 2023 Nov 17];100(3):319–24. Available from: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/mwDQmY3r4wW4GxNGBkYBYxC/?lang=en>
166. Said M El, Badawi H, Gamal D, Salem D, Dahroug H, El-Far A. Detection of ERG11 gene in fluconazole resistant urinary candida isolates [Internet]. Vol. 29, Original Research Article The Egyptian Journal of Immunology. Available from: www.Ejimmunology.org