



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**Vajinal Kültürden İzole Edilen Flukonazole Dirençli (R)/Doza Bağlı
Duyarlı (SDD) *C.albicans* İzolatlarında 14 alfa Lanosterol Demetilaz
Geni (ERG11) ve Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin (CDR1, CDR2
ve MDR1) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması ve Dirençteki
Rollerinin Belirlenmesi**

Dr. Merve Alçalı

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2024



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ şİşLİ HAMİDİYE ETFAL
EğİTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ SAğLIK UYGULAMA VE
ARAşTIRMA MERKEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**Vajinal Kültürden İzole Edilen Flukonazole Dirençli (R)/Doza Bağlı
Duyarlı (SDD) *C.albicans* İzolatlarında 14 alfa Lanosterol Demetilaz
Geni (ERG11) ve Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin (CDR1, CDR2
ve MDR1) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması ve Dirençteki
Rollerinin Belirlenmesi**

Dr. Merve Alcalı

Doç.Dr. Ayşe Barış

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2024

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerini paylaştan, verdiği motivasyonla her zaman desteğini hissettiren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe Barış'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren ve destek olan eğitim sorumlumuz Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci'ye ve bölüm hocalarımız Prof. Dr. Banu Bayraktar ve Doç. Dr. Mehmet Emin Bulut'a,

Uzmanlarımız Dr. Hanife Tutan, Dr. Leyla Genç, Dr. Süleyman Pelit ve Dr. Murat Öcal'a

Tez çalışmamın yürütülmesinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, Koç Üniversitesi İş Bankası Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Merkezi'nde görevli Doç. Dr. Özlem Doğan'a ve Msc. Pelin Armutcuoğlu'na,

Moleküler test süreçlerinde desteğinden dolayı Candar Yıldız'a

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışma ekibine,

Yanımda olduklarını her daim hissettiren, beni motive eden aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2024/054).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR VE SİMGELER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.TARİHÇE.....	3
2.2. CANDİDA TÜRLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.2.1 Kültür ve Üreme Özellikleri.....	4
2.2.2 Hücre Özellikleri.....	4
2.3. TIBBİ ÖNEMİ OLAN CANDİDA TÜRLERİ	5
2.3.1. <i>Candida albicans</i> :	5
2.3.2. <i>Candida tropicalis</i> :.....	6
2.3.3. <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	6
2.3.4. <i>Candida parapsilosis</i> :	7
2.3.5. <i>Candida kefyr</i> :.....	7
2.3.6. <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)	8
2.3.7. <i>Candida guilliermondii</i> :	8
2.3.8. <i>Candida dubliniensis</i> :	8
2.3.9. <i>Candida lusitanae</i> :	8
2.4. CANDİDA ENFEKSİYONLARI	9
2.4.1. Orofaringeal Kandidiyaz:	9
2.4.2. Özofagus Kandidiyazı:	9
2.4.3. Kutanöz Kandidiyazis:	10
2.4.4. Kronik Mukokutanöz Kandidiyaz	10
2.4.5. Vulvovajinal Kandidiyaz:.....	10
2.4.6. Üriner Sistem Kandidiyazı:.....	11
2.4.7. Akciğer Enfeksiyonları:.....	12
2.4.8. Göz Enfeksiyonları:	12
2.4.9. Kandidemi:	12

2.4.10. Kardiyak ve Endovasküler Enfeksiyonlar:	13
2.4.11. Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları:	13
2.5. ANTİFUNGAL İLAÇLAR VE DİRENÇ MEKANİZMALARI	14
2.5.1. Poliyenler.....	14
2.5.2. Azoller.....	15
2.5.3. Antimetabolitler.....	16
2.5.4. Alilaminler.....	16
2.5.5. Ekinokandinler	17
2.5.6. Griseofulvin.....	17
2.6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	18
2.6.1. Referans Antifungal Duyarlılık Testi Yöntemleri	18
2.6.2. Referans Dışı Antifungal Duyarlılık Test yöntemleri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. İzolatların Seçilmesi.....	21
3.2. <i>Candida</i> İzolatlarının Tanımlanması:	21
3.3. Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)	22
3.3.1. Vitek2 Otomatize Sistemi ile Antifungal Duyarlılık Testi:.....	22
3.3.2. Agar Gradient Difüzyon Test Yöntemi ile Antifungal Duyarlılık Testi:	22
3.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi:.....	23
3.4. Veri ve İstatistiksel Analizi.....	25
3.5. Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT)	26
3.5.1. RNA Eldesi.....	27
3.5.2. cDNA Sentezi	29
3.5.3. Real time qPCR.....	30
3.5.5. Rölatif Kantitasyon Hesaplama.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. İzolatların Antifungal Duyarlılık Sonuçları	33
4.2 Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) Analizi	38
5.TARTIŞMA	41
KAYNAKÇA.....	53

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABC: ATP Bağlayan Kaset

AIDS: Acquired Immuno Deficiency Sendrom

AFDT: Antifungal Duyarlılık Testi

Anti-Mn: Anti Mannan

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenozin Trifosfat

dNTP: Deoksiribonükleotid Trifosfat

BH: Büyük Hata

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute

ÇBH: Çok Büyük Hata

SDD: Doza Bağlı Duyarlı

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EU: Esansiyel Uyum

FUMP: 5-Florourasilmonofosfat

FLU: Flukonazol

HIV: Human Immunodeficiency Virus

I: İntermediate

KU: Kategorik Uyum

KH: Küçük Hata

MALDI-TOF MS: Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

MIK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MFs: Major-facilatator süper ailesi

Non-WT: Non Wild Type

qRT-PZT: Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi

RT-PZT: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi

RVVC: Tekrarlayan Vulvovajinal Kandidiyaz

R: Resistant

rDNA: ribozomal DNA

RNA: Ribonükleik Asit

S: Susceptible

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

WT: Wild Type

VVK: Vulvovajinal Kandidiyazis

VOR: Vorikonazol

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Candida albicans için azol grubu antifungallerin klinik sınır değerleri	24
Tablo 2: Primerler	30
Tablo 3: RT-qPCR master miks.....	31
Tablo 4:RT-qPCR reaksiyon koşulları.....	31
Tablo 5: İzolatların sıvı mikrodilüsyon, Vitek2 ve E-test ile saptanan MİK değerleri	33
Tablo 6: İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol için 24 ve 48. saat MİK dağılımı.....	35
Tablo 7: : İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile vorikonazol için 24. ve 48. saat MİK dağılımı.....	35
Tablo 8: Antifungal duyarlılık test yöntemlerine göre MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri (µg/mL)	36
Tablo 9: İzolatların test yöntemlerine göre kategorik dağılımı	36
Tablo 10: Standart SMD yöntemi ile diğer yöntemler arasındaki uyum ve hata oranları (%)	37
Tablo 11: İzolatların SMD yöntemiyle alınan MİK değerleri ve gen ekspresyon kat değişimleri.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: İlaç hedef yollarında antifungal dirençle ilişkili genler: 1. ergosterol biyosentezi, 2. hücre zarı, 3. hücre duvarı biyosentezi 4. DNA/RNA biyosentezi (44)	17
Şekil 2: Sıvı Mikrodilüsyon Testi.....	25
Şekil 3:Trizol-kloroform sonrası üst-ara ve alt faz	28
Şekil 4:IMPLEN NanoPhotometer NP80 cihazı.....	29
Şekil 5:Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycle (ThermoFisher scientific).....	30
Şekil 6: Gen ekspresyon kat değişim grafiği	40

Vajinal Kültürden İzole Edilen Flukonazole Dirençli (R)/Doza Bağlı Duyarlı (SDD) *C.albicans* İzolatlarında 14 alfa Lanosterol Demetilaz Geni (ERG11) ve Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin (CDR1, CDR2 ve MDR1) Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması ve Dirençteki Rollerinin Belirlenmesi

ÖZET

Amaç: *Candida albicans*, fırsatçı bir patojen olarak vulvovajinal kandidiyazis (VVK) gibi yaygın enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Flukonazolün yaygın ampirik kullanımı ve topikal azol ajanlara reçetesiz erişim, flukonazole dirençli izolatlarda artışa neden olmaktadır. Direnç mekanizmaları arasında ERG11 genindeki mutasyonlar, CDR1, CDR2, MDR1 genlerinin aşırı ekspresyonu öne çıkmaktadır. Çalışmamızda flukonazole dirençli veya doza bağlı duyarlı vajinal *C. albicans* izolatlarında, bu genlerin ekspresyon düzeyleri ve dirençteki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca, ticari antifungal duyarlılık testlerinin flukonazole duyarlılığı azalmış izolatlardaki performansları da değerlendirilecektir.

Gereç ve yöntemler: Ocak 2021-Kasım 2023 tarihleri arasında toplam 763 vajinal örnek incelenmiş ve bu örneklerin 403'ünde (%52,8) *Candida* türleri izole edilmiştir. İzole edilen *Candida* türlerinin 307'si (%76) *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. Antifungal duyarlılık testleri Vitek2 otomatize sistemi ve agar gradient difüzyon (E-test) testleri kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada flukonazol/vorikonazole karşı dirençli/doza bağlı duyarlı saptanan 68 izolat CLSI sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle karşılaştırıldı. Bunlar arasından flukonazol ve/veya vorikonazole dirençli ve/veya doza bağlı duyarlı 42 izolat seçilerek direncin moleküler mekanizması için ERG11, CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile araştırıldı. Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Vitek2 ve agar gradient difüzyon yöntemlerinin SMD yöntemiyle esansiyel uyumları %90'ın üzerinde bulunmuştur. SMD 48. saat sonuçları ile

karşılaştırıldıklarında; Vitek2 sistemiyle flukonazol için %52,94, vorikonazol için %73,52 kategorik uyum belirlenirken; agar gradient difüzyon yöntemi ile flukonazol için %76,47, vorikonazol için %83,82 oranında kategorik uyum saptanmıştır.

Gen ekspresyon analizlerinde, flukonazole R/SDD olan izolatların %47'sinde CDR1, %34'ünde MDR1, %21'inde ERG11 ve %13'ünde CDR2 genlerinde artmış ekspresyon tespit edilmiş olup, 12 izolatta herhangi bir gende ekspresyon artışı saptanmamıştır.

Flukonazol MİK değeri >8 µg/ml olan izolatlarda CDR1 gen ekspresyon oranı %70,5 olarak bulunmuş, MİK değeri ≤ 8 µg/ml olan izolatlarda bu oran %28,5 olarak saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, özellikle klinik sınır değerlerinde MİK saptanan *C. albicans* izolatlarında ticari antifungal duyarlılık yöntemleri ile CLSI SMD arasında; yüksek temel uyum saptanmış, ancak kategorik uyumun düşük olduğu görülmüştür. Gen ekspresyon analizlerinde en sık CDR1 geninde ekspresyon artışı belirlenmiş olup; dirençli izolatların %75'inde ERG11, CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin en az birinde ekspresyon artışı gözlenmiştir. Gen ekspresyonu saptanmayan izolatlarda alternatif direnç mekanizmalarının rolü araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları, *Candida albicans*, Flukonazol, Fungal İlaç Duyarlılık Testleri, Gen Ekspresyonu, Vulvovajinal Kandidiyaz

Investigation of Expression Levels of 14- α Lanosterol Demethylase Gene (ERG11) and Efflux Pump-Encoding Genes (CDR1, CDR2, and MDR1) in Fluconazole-Resistant (R)/Dose-Dependent Susceptible (SDD) *C. albicans* Isolates from Vaginal Cultures and Determination of Their Role in Resistance

ABSTRACT

Aim: *Candida albicans*, as an opportunistic pathogen, can cause common infections such as vulvovaginal candidiasis (VVC). Widespread empirical use of fluconazole and over-the-counter access to topical azole agents have led to an increase in fluconazole-resistant isolates. Among the resistance mechanisms, mutations in the ERG11 gene and overexpression of CDR1, CDR2, and MDR1 genes are prominent. In our study, we aimed to determine the expression levels of these genes and their roles in resistance in fluconazole-resistant or dose-dependent susceptible vaginal *C. albicans* isolates. The study also evaluated the performance of commercial antifungal susceptibility tests in isolates with reduced susceptibility to fluconazole.

Material and Methods: Between January 2021 and November 2023, a total of 763 vaginal samples were examined, and *Candida* species were isolated in 403 (52.8%) of these samples. Of the isolated *Candida* species, 307 (76%) were identified as *C. albicans*. Antifungal susceptibility tests were performed using the Vitek2 automated system and agar gradient diffusion (E-test) tests. In the study, 68 isolates found to be resistant/dose-dependent susceptible to fluconazole/voriconazole were compared using the CLSI broth microdilution (BMD) method. Among these, 42 isolates that were resistant and/or dose-dependent susceptible to fluconazole and/or voriconazole were selected, and the expression levels of ERG11, CDR1, CDR2, and MDR1 genes were investigated using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method to determine the molecular mechanism of resistance. The $\Delta\Delta C_t$ method was used to determine gene expression levels.

Results: The essential agreement of Vitek2 and agar gradient diffusion methods with the BMD method was found to be over 90%. When compared with BMD 48-hour results, categorical agreement with the Vitek2 system was 52.94% for fluconazole and 73.52% for voriconazole, while with the agar gradient diffusion method, categorical agreement was 76.47% for fluconazole and 83.82% for voriconazole.

In gene expression analyses, increased expression was detected in CDR1 (47%), MDR1 (34%), ERG11 (21%), and CDR2 (13%) genes in fluconazole R/SDD isolates, while no increase in gene expression was detected in 12 isolates.

Increased CDR1 gene expression was observed in 70.5% of isolates with fluconazole MIC values >8 $\mu\text{g/ml}$, while this rate was 28.5% in isolates with MIC values ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusion: In our study, high essential agreement but low categorical agreement was observed between commercial antifungal susceptibility methods and CLSI BMD, particularly in *C. albicans* isolates with MIC values at clinical breakpoints. In gene expression analyses, increased expression was most frequently detected in the CDR1 gene, and 75% of resistant isolates showed increased expression in at least one of the ERG11, CDR1, CDR2, and MDR1 genes. Alternative resistance mechanisms should be investigated in isolates without detected gene expression.

Keywords: ATP-Binding Cassette Transporters, *Candida albicans*, Fluconazole, Fungal Drug Sensitivity Tests, Gene Expression, Vulvovaginal Candidiasis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida albicans insan mikrobiyotasının doğal bir üyesi olmakla birlikte, fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Özellikle VVK dünya genelinde kadınların %75' ini yaşamlarının bir döneminde etkileyen ve enfeksiyonu geçirenlerin %40-50'sinde ise birden fazla kez tekrar edebilen yaygın bir enfeksiyondur(1,2). *Candida* türleri, Vajina ve vulvanın enfeksiyonlarında bakterilerden sonraki en sık etkindir (3) Perianal bölgede kolonize olan *Candida*' lar buradan vajinaya geçer ve vajinal epitel hücrelerine yapışır. *C. albicans*, vajinal epitel hücrelerine non-albicans *Candida* türlerinden daha fazla yapışma yeteneği gösterir (2). Vajinada kolonize olan baskın türler en sık *C. albicans* (%70-90) olmak üzere, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* gibi albicans dışı türlerdir(4,5).

Antibiyotik kullanımı, bağışıklık sisteminin baskılanması, diyabet, stres, hormonal değişiklikler (gebelik, oral kontraseptif kullanımı, menopoz) ve sentetik iç çamaşırı kullanımı gibi çeşitli faktörler bu enfeksiyonun gelişimini kolaylaştırmaktadır(6,7).VVK klinik seyrine göre, komplike olmayan (~%90) ve komplike vakalar (%10) olarak ikiye ayrılır. Komplike olmayanlar, *C. albicans*'ın neden olduğu hafif enfeksiyonların sporadik ataklarıdır. Komplike vakalar ise albicans dışı *Candida* türlerinin neden olduğu ciddi enfeksiyonlar, tekrarlayan VVK, hamilelik sırasında gelişen VVK, immünosupresyon veya diyabet gibi diğer tıbbi durumlarla ilişkili VVK' dır(5,8). Kılavuzlar tanı için vajinal sürüntü alınmasını, pH değerlendirilmesini, koku testini ve “wet-mount” mikroskopi yapılmasını önermektedir(9,10). Mikroskopi yıllardır kullanılan bir standart olmasına rağmen, kültür hala altın standarttır(11) Ancak *Candida* türlerinde kültür yaklaşık 48-72 saat sürmektedir. Bu nedenle, birçok klinisyen sadece mikroskopi veya hasta tarafından bildirilen semptomlara dayanarak tanı koymakta ve bu da gereksiz tedaviye neden olabilmektedir(12). Sadece klinik bulgularla konulan tanıların yüksek yanlış pozitiflik oranına sahip olduğu gösterilmiştir. VVK enfeksiyonu için flukonazolün sıklıkla ampirik olarak reçete edilmesi, reçetesiz satılan topikal azol ajanların mevcut olması ve tekrarlayan VVK enfeksiyonu için düşük dozlu haftalık flukonazol rejiminin yaygın kullanımı, flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarının gelişmesi için

risk oluşturmaktadır. Flukonazol maruziyeti ile *C.albicans* 'ta flukonazole karşı kazanılmış direnç geliştiği gösterilmiştir(13). Son zamanlarda mevcut azol ajanlara dirençli *C.albicans*'ın neden olduğu vajinitlerin sıklığında artış olduğu ve direncin gelişiminde birçok mekanizmanın rol oynadığı belirtilmiştir(14,15).

C. albicans'ın antifungal ilaçlara direnci, genellikle hedef genlerdeki mutasyonlar, bu genlerin aşırı ekspresyonu ve en önemlisi ilaç dışı atım pompalarının yüksek miktarda ifadesi ile ilişkilidir. Özellikle, 14-alfa lanosterol demetilaz enzimi (ERG11) ve atım pompalarını kodlayan genler (CDR1, CDR2, MDR1) bu süreçte kritik rol oynar(16,17). ERG11 genindeki mutasyonlar, azol grubu antifungallerin bağlanma bölgesinde değişikliklere neden olarak ilacın etkinliğini azaltabilirken, CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin aşırı ekspresyonu, hücre dışına ilaç atılımını artırarak direnç mekanizmalarını destekler(17). Literatürde *C.albicans* suşlarında flukonazol direncine en sık neden olan mekanizmanın çoklu atım pompalarının fazla ekspresyonundan kaynaklandığı belirtilmektedir(18) .

Çalışmamızda vajinal örneklerden izole edilen flukonazole dirençli/ doza bağlı duyarlı *C. albicans* izolatlarında, flukonazol direncinde rol oynayan moleküler mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 14 alfa lanosterol demetilaz geni (ERG11) ve atım pompalarını kodlayan (CDR1, CDR2 ve MDR1) genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim ve flukonazol direncindeki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda ayrıca rutin laboratuvar da sıklıkla kullanılan antifungal duyarlılık test yöntemlerinin flukonazole azalmış duyarlılığı olan vajinal izolatları belirlemedeki etkinliği de değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE

Kandidiyazın tarihçesi M.Ö. 4.yüzyıla Hipokrat' a (Hippocrates) kadar uzandığı halde etkenin keşfi bundan asırlar sonra 1839' da Langenbeck tarafından gerçekleştirilmiştir. Tifüslü bir hastanın ağzındaki pamukçuk lezyonundan kazıntı alarak mantarı gözlemlemiş ancak görülen bu yapıyı yanlışlıkla tifüs etkeni olarak tanımlamıştır (19,20).

Hippocrates' in ünlü “Epidemics” adlı eserinde, altta yatan hastalığı olan iki hastanın ağzındaki oral kandidiyazı (pamukçuk) tanımladığı kaydedilmiştir. Modern tıp döneminde ise pamukcuğun ilk tanımı; 18.yy'da Rosen von Rosenstein ve Underwood tarafından yapılmıştır. Veron 1835'te ilk kez özofagus kandidiyazını tarif etmiş ve hastalığın yenidoğana doğum kanalından geçerken bulaştığını öne sürmüştür. Gruby 1842' de ağızdaki aftta mantar ile pamukçuk arasındaki ilişkiyi göstermiş ve etkeni *Sporotrichum* cinsi olarak sınıflandırmıştır. 1843'de Charles Robin bu organizmaya *Oidium albicans* olarak ilk ismini vermiş ve basitçe üretmeyi başarmıştır. Bennett, 1844 yılında tüberkülozlu bir hastanın balgam örneğinden, Wilkinson 1849'da vajinal bir lezyondan, Robin 1853'de sistemik bir enfeksiyondan Zenker 1861'de immün düşkün bir hastadan oral lezyondan hemotojen olarak yayıldığını gösteren beyin enfeksiyonundan *Candida* izole etmiştir(21) .1890'da Zopf tarafından önerilen *Monilia albicans* isminin ardından 1923 yılında Berkhout tarafından önerilen *C. albicans* ismi Paris'de düzenlenen sekizinci Botanik Kongresi'nde (1954'de) kabul edilmiştir(19,21).

19. yüzyılın sonlarında Sabouraud, mantarların morfolojik yapılarının incelenmesine olanak sağlayan besiyerini geliştirerek üreme özellikleri üzerine çalışmalar yapmıştır. Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmaya başladığı 1940'lı yıllardan itibaren *Candida* enfeksiyonlarının sıklığı artmış ve bu konuda yapılan araştırmalar hız kazanmıştır(22,23).

2.2. CANDIDA TÜRLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

2.2.1 Kültür ve Üreme Özellikleri

Candida cinsi; tek hücreli, 4-6 µm boyutlarında, yuvarlak veya oval şekilde olan maya mantarlarıdır(19). Bazı türlerin seksüel formları bulunsa da genellikle tomurcuklanarak çoğalırlar(24). *Candida* türleri, mikroskopik ve makroskopik özellikler açısından genellikle benzerlik gösterir; az sayıda tür arasında belirgin farklılıklar bulunabilir. Çoğu yaygın kullanılan bakteriyolojik ve mikolojik besiyerlerinde, aerob koşullarda, 20°C -40 °C arasında değişen sıcaklık koşullarında ve 2-8 arasında değişen pH koşullarında kolaylıkla üretilir. Kolonileri 24 saatte gelişir, ancak belirginleşmesi 48-72 saat sürebilir. Bu koloniler tipik olarak 2-3 mm çapında, beyaz veya krem renginde, düzgün yüzeyli veya merkezde hafif kabarıklık görünümündedir. Kolonilerin yüzeyi mat veya parlak olabilir. İnkübasyon süresi uzadıkça, bazı türlerin kolonileri daha kıvrımlı bir yapı kazanabilir. *Candida* türleri arasındaki morfolojik farklılıklar, mısır unlu agar gibi özel besiyerlerinde gözlemlenmektedir. Bu mayaların çoğu anamorf (eşeysiz) evrede bulunurken, bazı türler teleomorf (eşeyli) evrede görülebilir. *C. albicans* ve *C. dubliniensis* “çimlenme borusu (germ tüpü)” ve takibinde gerçek hif oluşturma özelliğine sahiptir(25).

2.2.2 Hücre Özellikleri

Candida, membranla çevrili çekirdek içeren ökaryotik hücrelerdir. Çekirdek içerisinde çekirdekçik ve lineer kromozomlar bulunur. Sitoplazmada; 80-S ribozomlar, mitokondri, vakuoller, golgi aygıtı ve çeşitli veziküller yer alır. Hücre sitoplazmasında, mantarın yaşamında önemli yer tutan ve turgor basıncına karşı koyan dinamik bir hücre iskeleti bulunur (26).

Candida türlerinin hücre iskeleti, hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılıdır. Mikrotübül, aktin ve miyozin gibi proteinler içerir ve bu sayede membranın dinamizmi, sitoplazmik akışkanlığı ve organel hareketini düzenler. Hücre içindeki kalsiyum, magnezyum ve hidrojen iyonlarının konsantrasyonu önemlidir. İyonların hücreye giriş çıkışları ile özellikle organellerin hareketi ve hif uzaması gibi hücresel süreçlerde rol oynarlar. Ayrıca, bu iyonlar mayoz ve mitoz bölünme, tomurcuklanma, septum oluşumu ve bazı enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir (25).

Candida hücre duvarı, hücreye şekil veren ve ozmotik basınçtan koruyan sert bir yapıdır. Bu duvar, moleküllerin transferini düzenler ve hücrenin yüzeylere tutunmasını sağlar. Ayrıca, antifungal ilaçların hedefi olan ve immünolojik belirteçler içeren bileşenlerden oluşur. Hücre duvarı ağırlıklı olarak karbonhidratlardan (%80-90) oluşurken, daha az oranda protein (%5-15) ve lipid (%2-5) içerir. Karbonhidrat bileşenleri arasında mannoproteinler, glukanlar ve kitin bulunur. *C. albicans*'ın maya ve hifal formları arasında glukan ve mannan oranları benzerken, hifal formlarda kitin miktarı üç kat daha fazladır. Bu yapısal özellikler, *Candida* türlerinin yaşamsal fonksiyonları ve patogenezi açısından önemlidir(25).

Candida türlerinin hücre membranı, seçici geçirgenliği sağlayan ve molekül transferini düzenleyen karmaşık bir yapıdır. Bu membran, hücre duvarı bileşenlerinin sentezinde rol oynayan kitin sentetaz gibi enzimler içerir ve ayrıca maya-hif dimorfizmi gibi morfolojik değişikliklerde sinyal iletiminde rol oynayan fosfolipaz C, adenilat siklaz ve proteinaz enzimlerini barındırır. Membranın önemli bir bileşeni olan steroller, toplam lipid içeriğinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Bunların %95'i ergosteroldür ve bu yapı, birçok antifungal ilacın hedefidir. Membrandaki fosfolipidler ise fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inozitol gibi çeşitli alt türlerden oluşur(25).

Hücre çekirdeği nükleer membranla çevrili olup, içerisinde RNA miktarınca zengin nükleolus ve lineer yapıda DNA bulunmaktadır. Sitoplazma içerisindeki mitokondriler hücrenin enerji ihtiyacına göre sayıca değişiklik gösterir ve özellikle tomurcuklanma sırasında artan enerji gereksinimi nedeniyle sayıları yükselir (25).

2.3. TIBBİ ÖNEMİ OLAN CANDİDA TÜRLERİ

2.3.1. *Candida albicans*:

Candida albicans, klinik örneklerde en sık rastlanan *Candida* türüdür. Mukozal enfeksiyonların büyük çoğunluğundan ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının yarısından fazlasından sorumludur. Besiyerinde krem renginde, yumuşak S tipi koloniler oluşturur. *C. albicans*, hem yalancı hem de gerçek hif yapabilme özelliğine sahiptir(27). Mısır unlu Tween 80 besiyerinde, yalancı hiflerin boğumları etrafında kümelenmiş blastokonidyumlar ve hif uçlarında karakteristik olarak iri, kalın duvarlı

ve genellikle tekli terminal klamidospore oluşur (28). Ayrıca, *C. albicans*'ın en karakteristik özelliği, çimlenme borusu (germ tüp) oluşturabilmesidir. Bu yapı, ana hücreden çıkan, boğumlanma göstermeyen ve paralel duvarlara sahip hifal bir uzantıdır(27).

C. albicans, insanlarda en sık görülen fırsatçı fungal patojendir ve özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi enfeksiyonlara yol açabilir. Epidemiyolojik olarak, *C. albicans* tüm *Candida* türleri arasında en yaygın izole edilen türdür. Hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının %50-60'ından, vajinal kandidozun %70-90'ından sorumlu tutulmaktadır(5,29).

Tedavide azol grubu antifungaller ve ekinokandinler ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Ancak özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde yapılan son araştırmalar, *C. albicans*'ta azol grubu antifungallere karşı direnç oranlarında artış olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, antifungal tedavi stratejileri açısından endişe verici bir gelişme olarak değerlendirilmekte ve gelecekteki tedavi yaklaşımları için önemli bir uyarı niteliği taşımaktadır(30).

2.3.2. *Candida tropicalis*:

SDA besiyerinde beyaz, krem renginde, pürüzsüz görünümde kremi koloniler oluşturur. Yalancı hif ve blastokonidya oluşturur. *C. tropicalis*, galaktoz, sukroz, maltoz ve trehalozu fermente edebilir, ayrıca bunları ve diğer karbonhidratları oksidatif yolla asimile edebilir. Son yıllarda bu türün kuzey yarıküre ülkelerinde de kandidemi etkeni olarak önemi giderek artmaktadır. Güçlü bir biyofilm üreticisidir ve epitel ile endotel hücrelere yapışır. *C. tropicalis* ozmotoleran bir mikroorganizmadır. Yüksek tuz konsantrasyonunda hayatta kalma yeteneği; in vitro virülans faktörlerinin ekspresyonuna ve antifungal ilaçlara karşı dirençte katkıda bulunur(31).

2.3.3. *Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata)*

Mikroskopik incelemede, yalancı hif oluşturmeyen, 2-3 µm boyutunda, tek noktadan tomurcuklanan küçük maya hücreleri görülür(32). Bu tür, metabolik olarak glukoz ve trehalozu asimile edebilme yeteneğine sahiptir. *C. glabrata*, idrar yolu enfeksiyonlarında izole edilen mayaların yaklaşık %20'sini oluşturur ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında *C. albicans*'tan sonra en sık görülen ikinci etkindir. Nadir de olsa

endokardit ve sistemik enfeksiyonlara neden olabilir. *C. glabrata*'nın ayırt edici özelliklerinden biri, diğer *Candida* türlerine göre daha yavaş üremesidir; genellikle kolonilerin görünür hale gelmesi için 48-72 saat gerekir(32). Mısır unlu Tween 80 agarda küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan blastokinidyumlar oluştururlar. Yalancı hif oluşturmazlar (27).

Candida glabrata, antifungal tedavide önemli zorluklar yaşanan bir türdür. Azol grubu antifungallere karşı yüksek minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) göstermesi, bu ilaçların etkinliğini sınırlandırmaktadır. Son zamanlarda, ekinokandin sınıfı antifungallere karşı da direnç gelişiminde artış gözlenmektedir(30).

2.3.4. *Candida parapsilosis*:

SDA'da krem renginde, yumuşak ve bazen çevresi dantel şeklinde koloniler oluşturmaktadır. Bol miktarda yalancı hif üretir(33). Mısır unlu Tween 80 agarda yalancı hifler boyunca dağılmış tek tek veya küçük kümeler halinde blastokonidyumlar görülür ve aralarda karakteristik olarak dev hücreler olarak adlandırılan iri hifal elemanlar gözlenir.(28) Son dönemlerde yapılan moleküler çalışmalar sonucunda üç grubu tanımlanmıştır. Grup I *Candida parapsilosis*, Grup II *Candida orthopsilosis*, Grup III' ün ise *Candida metapsilosis* olarak adlandırılmıştır(34).

C. parapsilosis, çeşitli sistemik enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir. Kan dolaşımı enfeksiyonları, eklem iltihabı, kalp kapak enfeksiyonları ve karın zarı iltihabı gibi ciddi klinik tablolara yol açabilir. Bu tür, özellikle hastane ortamında dış kaynaklı bulaşma yoluyla salgınlara ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *C. parapsilosis* enfeksiyonları sıklıkla invaziv tıbbi işlemler, parenteral beslenme veya protez kullanımı gibi risk faktörleriyle ilişkilidir(27,28).

2.3.5. *Candida kefyr*:

SDA'da beyaz, krem renginde, hamurumsu kıvamda koloniler oluşturur. Kökenlerin birçoğunda yalancı hif üretilir. Uzun elipsoidal ve silindirik (6-10x3-6µm) yapıdadır(33). Mısır unu Tween 80 agarda yalancı hifler ve uzun blastospor yapıları görülür. Çoğunlukla blastosporlar hiften ayrılıp birbirlerine koşut olarak ırmakta yüzen kütük dizilerine benzer görünüm oluşturur(27). Bu yapılar *C. krusei*

ile benzerlik gösterir. *C.kefyr* glukoz, sukroz, galaktoz, sellobiyoz, ksiloz, rafinoz'u asimile eder. Bu özelliği ile *C.krusei*' den ayrılabilir(27).

2.3.6. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*)

SDA'da büyük, düzgün yüzeyli kuru koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede, mısır unlu agarda ağaç benzeri dizilim gösteren blastosporlar görülür. *C. krusei*'nin ayırt edici özelliklerinden biri, Sabouraud buyyonunda 25°C'de üç günlük inkübasyondan sonra yüzeyde kalın bir pellikül oluşturmastır. Bu tür siklohekzimide duyarlıdır ve sadece glukozu asimile edebilir. Klinik açıdan önemli bir özelliği, flukonazole karşı doğal direncinin olmasıdır. *C. krusei*, özellikle hastanede yatan hematolojik kanser hastalarında görülen önemli bir patojendir. Gastrointestinal sistem bu türün ana kaynağıdır ve antifungal tedavi sonrasında kolonizasyonunda artış görülmektedir(27).

2.3.7. *Candida guilliermondii*:

Endokardit, osteomyelit, cilt ve üriner sistem enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde, bu enfeksiyonlar hayati tehlike oluşturabilir. Mikroorganizmanın morfolojik özellikleri incelendiğinde, mısır unlu agar besiyerinde kısa psödohipler ve bunların etrafında kümelenmiş küçük blastosporlar gözlemlenir (27).

2.3.8. *Candida dubliniensis*:

Bu patojenik organizma, genellikle tekrarlayan ağız içi mantar enfeksiyonlarıyla ilişkilidir. HIV taşıyıcılarında sadece ağızda değil, vücudun farklı bölgelerinde de nadiren gözlenebilir. Laboratuvar araştırmaları, ilaca duyarlı suşların flukonazole sürekli maruz kaldıklarında hızla direnç geliştirebildiklerini göstermiştir (27). Morfolojik olarak *C. albicans*'a benzerlik göstermektedir. Her iki tür de germ tüp ve klamidospore oluşturma yeteneğine sahiptir. Ancak, bu iki tür arasında bazı önemli farklar bulunmaktadır. *C. dubliniensis* 45°C'de üreyememesi ve mısır unlu Tween 80 agarda çiftli veya küçük kümeler halinde klamidospore oluşturmalarıyla *C.albicans* ' dan ayrılabilir(28).

2.3.9. *Candida lusitanae*:

Morfolojik olarak *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'e benzemektedir. Sellobiyozu fermente etme ve rhamnozu asimile etme özelliği ile bunlardan ayrılır.

Amfoterisin B' ye karşı antifungal duyarlılık testlerinde duyarlı olarak belirlense de, fenotipik değişimler sonucunda zaman zaman direnç ortaya çıkabilmektedir. Bu durum, organizmanın adaptasyon yeteneğini göstermektedir. Bununla birlikte, *C. lusitaniae* örneklerinin büyük çoğunluğu halen standart duyarlılık testlerinde amfoterisin B'ye karşı duyarlı görünmektedir (32).

2.4. CANDİDA ENFEKSİYONLARI

2.4.1. Orofaringeal Kandidiyaz:

Orofaringeal kandidiyaz, ağız boşluğunda doğal olarak bulunan bir mantar türünün neden olduğu fırsatçı bir enfeksiyondur. Bu enfeksiyon, normalde zararsız olan *Candida* türlerinin aşırı çoğalması ve ağız dokularına yayılmasıyla ortaya çıkar. Orofaringeal kandidiyazın gelişmesinde ağız içi mikrobiyom dengesinin bozulması ve bağışıklık sisteminin zayıflaması rol oynar. Bu enfeksiyon erken doğum, uygun olmayan diş protezleri, ağız kuruluğu (kserostomi), baş ve boyun bölgesine uygulanan radyoterapi, kontrol altında olmayan şeker hastalığı, kan hastalıkları ve diğer organ kanserleri, ağızdan alınan veya solunan kortikosteroid ilaçlar, antibiyotik tedavisi, HIV enfeksiyonu gibi durumlarda daha sık görülür(2).

Orofaringeal kandidiyaz vakalarının büyük çoğunluğundan (%80- %90) *C. albicans* sorumludur. *C. albicans*, diğer *Candida* türlerine kıyasla bu hücrelere çok daha etkili bir şekilde tutunabilir. Bu özellik, *C. albicans*'ın ağız ortamında kolonizasyonunu ve enfeksiyona yol açmasını kolaylaştırır. Belirtileri arasında ağrı, yanma hissi ve yutma güçlüğü (disfaji) bulunur. Ayrıca buccal mukoza, dil ve diş etleri, damak, orofarenksin yüzeylerinde beyaz lekelerle birlikte yaygın eritem bulunur(2).

2.4.2. Özofagus Kandidiyazı:

Kandida özofajiti prevalansı, AIDS'in yanı sıra organ nakli yapılan hastalar, kanser hastaları ve diğer ağır immün baskılanmış hastaların artışıyla birlikte artmıştır. *Candida*, genellikle özofagus yüzeyinden izole edilir. Patogeneğinde rol oynayan konak ve maya faktörleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Risk faktörleri arasında yerel radyasyona maruz kalma, son zamanlarda uygulanan sitotoksik kemoterapi, antibiyotikler, kortikosteroidler ve nötropeni yer alır. Özofageal

kandidiyazis, odinofaji (ağrılı yutma), disfaji (yutma güçlüğü) ve retrosternal ağrı ile kendini gösterir. Genellikle özofagusun distal 2/3 'ünde görülür(2).

2.4.3. Kutanöz Kandidiyazis:

Candida, vücuttaki cilt, saç ve tırnaklarda yüzeysel enfeksiyonlara neden olabilir. *C. albicans* ve *C. tropicalis*, deri ve tırnak kandidiyazlarının başlıca sorumlusudur. Bu mantarlar özellikle vücudun sıcak ve nemli bölgelerinde çoğalma eğilimindedir. Sık etkilenen alanlar arasında obez kişilerdeki cilt kıvrımları, parmak araları, perine ve genital bölge sayılabilir(2).

Kandidiyazis, deride çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir. En sık rastlanan form olan intertrigo, nemli ve sıcak cilt kıvrımlarında gelişir. Başlangıçta vezikülopüstüller ve kaşıntılı olan döküntü, zamanla karakteristik görünüm kazanır ve uydu lezyonlar oluşturabilir. *Candida* foliküliti ise kıl foliküllerini etkiler ve genellikle sınırlı kalır. Tırnak ve tırnak çevresinde gelişen *Candida* enfeksiyonları (paronişi ve onikomikoz) çoğunlukla uzun süreli nem maruziyeti veya diyabet gibi predispozan faktörlerle ilişkilidir(2).

2.4.4. Kronik Mukokutanöz Kandidiyaz

Kronik mukokutanöz kandidiyaz, *Candida* mantarlarının uzun süreli olarak ağız, deri, saç ve tırnakları enfekte ettiği nadir bir durumdur. Tek bir hastalık olmayıp, *Candida*'ya karşı bağışıklık sistemindeki çeşitli eksikliklerden kaynaklanır. Genellikle zararsız olarak bulunduğu bölgelerde kronik enfeksiyonlara yol açar. Bu durum çoğunlukla bebeklik veya çocukluk döneminde başlar ve 30 yaş sonrası başlangıç nadirdir(2).

Kronik mukokutanöz kandidiyaz hastalarında, *Candida*'ya karşı hücrel immün yanıtın önemli ölçüde bozulduğu görülmektedir. T-lenfositlerin *Candida* türlerine yetersiz bir yanıtı söz konusudur ve kronik mukokutanöz kandidiyaz hastalarının yaklaşık %80'inde görülür(2).

2.4.5. Vulvovajinal Kandidiyaz:

Vulvovajinitlerin en sık etkenlerinden biri *Candida* türleridir. Vulvovajinal kandidoz (VVK) daha çok doğurganlık çağındaki kadınlarda görülür(27).

Vajinal kandidiyaz gelişiminde rol oynayan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar; gebelik, yüksek östrojen içerikli doğum kontrol hapları kullanımı, iyi kontrol edilemeyen diyabet hastalığı, kortikosteroid tedavisi, antibiyotik kullanımı, rahim içi araç (RİA) kullanımı, sık cinsel ilişki gibi faktörlerdir. Bunlar vajinal ortamın doğal dengesini bozarak veya bağışıklık sistemini etkileyerek *Candida* mayalarının normal düzeyin üzerinde çoğalmasına zemin hazırlayabilir. Bazı kadınlarda bu durum asemptomatik kolonizasyona yol açarken, diğerlerinde semptomatik vajinal kandidiyaza neden olabilir(2).

VVK' nın en sık görülen belirtisi vulvar kaşıntıdır. Vajinal akıntı değişken olabilir. Bazen az miktarda veya hiç olmayabilir, bazen de yoğun ve peynir kıvamında olabilir. Diğer yaygın şikayetler arasında vajinal ağrı, yanma hissi, cinsel ilişki sırasında ağrı ve dışkılama zorluğu sayılabilir. Koku genellikle belirgin değildir. Fizik muayene bulguları arasında labial ve vulvar bölgede kızarıklık ve şişlik, vajinal mukozada kızarıklık, yapışkan, beyaz vajinal akıntı görülürken, servikte genellikle herhangi bir anormallik görülmez. Bu belirtiler ve bulgular, VVK tanısında yol gösterici olmakla birlikte, kesin tanı için laboratuvar testleri gerekebilir(2).

VVK tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın yaklaşım, vajinal sıvının mikroskop altında incelenmesidir. Bu incelemede, salin solüsyonu kullanıldığında tanının doğruluğu %40-60 civarındayken, potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi kullanımı ile bu oran %50-70'e yükselmektedir. Vajinal pH ölçümü de tanıya yardımcı olur. VVK' da pH genellikle 4.0-4.5 civarındadır. Kültür, şüpheli durumlarda en güvenilir yöntemdir. Serolojik ve hızlı testler güvenilir değilken, PCR gibi moleküler yöntemler henüz yaygın kullanımda değildir(2).

2.4.6. Üriner Sistem Kandidiyazı:

Kandidüri, sağlıklı bireylerde nadir olup, özellikle hastane ortamında ve belirli risk faktörleri olan hastalarda sık görülen bir durumdur. Ayrıca idrar sondası kullananlar ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde sıklığı önemli ölçüde artmıştır. Diyabet, ileri yaş, kadın cinsiyeti, antibiyotik ve immünoşüpresif tedaviler, uzun süreli kateter kullanımı diğer önemli risk faktörleridir(2).

Asendan enfeksiyon, üriner sistemin *Candida* enfeksiyonlarının en yaygın yoludur ve kadınlarda daha sık görülür. Kateterizasyon, mikroorganizmaların üretra

çevresindeki bölgelerden kateterin dış yüzeyine geçişine izin vererek enfeksiyona yol açabilir. Renal kandidiyaz, en sık olarak *Candida*'nın böbreklere hematogen yolla yayılması sonucunda ortaya çıkar. Böbrekler, yayılan kandidiyazis vakalarında en sık etkilenen organlardır(2).

2.4.7. Akciğer Enfeksiyonları:

Candida türleri genellikle balgam ve endotrakeal tüp sekresyonlarının aspirasyonlarından izole edilebilir. Ancak bu türlerin pulmoner hastalıklara neden olup olamayacağı sıklıkla tartışma konusu olmaktadır. *Candida*'nın akciğer dokusunda invaziv hastalık oluşturduğu oldukça nadiren görülür(2).

2.4.8. Göz Enfeksiyonları:

Candida organizmaları göze iki yolla ulaşabilir. Enfeksiyon; doğrudan inokülasyon yoluyla göz ameliyatı veya travma sırasında ekzojen yolla ya da hematogen yayılım sonucu endojen yolla gelişebilmektedir. Endojen endoftalmi, hastane kaynaklı kandidemi gelişen hastalarda, yenidoğanlarda ve intravenöz ilaç kullanıcılarında görülür. *Candida* endoftalmi, eşzamanlı olarak yaygın şekilde kandidiyazis şüphesini artırmaktadır. Oküler tutulumu neden olan en yaygın tür *C. albicans* olmakla beraber diğer *Candida* türleri de sorumlu tutulmaktadır(2).

2.4.9. Kandidemi:

Kandidemi, *Candida* türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu olup, yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Özellikle kemoterapi ve immünsupresif tedavi alan hasta sayısının giderek artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımları ile *Candida* türlerinin etken olduğu kan dolaşım enfeksiyonlarının insidansı artmaktadır(35,36). Kandidemide başlıca risk faktörleri arasında santral venöz kateter kullanımı, uzun süreli antibiyotik tedavisi, bağışıklık baskılayıcı ilaçlar ve yoğun bakımda yatış süresi yer almaktadır Kandidemi hastalarında bildirilen ham mortalite oranları genellikle %40-%60 arasında değişmektedir(2).

Candida türleri arasında, *C. albicans* tüm dünyada yüksek oranda rapor edilmektedir, ancak epidemiyolojide albicans-dışı *Candida* türlerine doğru bir kayma gözlenmiştir. Bununla birlikte, kandideminin tür dağılımı ve duyarlılık paternleri coğrafi bölge ve zamana göre değişebilmektedir(37,38).

Kandideminin tanısında kan kültürleri altın standarttır, ancak numune alma ile sonuç elde etme arasındaki sürenin uzun olması (>48 s-5 gün) ve duyarlılığın düşük olması önemli bir sorundur (2,39).

Kateterden alınan kan kültürü sonuçları bazen kontaminasyonu temsil edebilir. Bu nedenle hem periferik hem de santral kateterden kan kültürü alınması önemlidir. Ateşli hastada *Candida* türlerini içeren tek bir pozitif kan kültürü enfeksiyon olarak kabul edilmelidir(2).

2.4.10. Kardiyak ve Endovasküler Enfeksiyonlar:

Candida miyokarditi, hematojen yayılım sonucu miyokard içinde bir veya daha fazla apsenin gelişmesiyle ortaya çıkar. Çoğu durumda, apse küçük mikroapseler olarak bulunur ve genellikle otopsi sırasında teşhis edilir. *Candida* türleri perikardiyuma genellikle komşu endokardit veya miyokardit yoluyla ulaşır. Ancak perikardiyal tutulumun en sık nedenleri hematojen yayılım veya kalp cerrahisi sırasında doğrudan inokülasyon ile ortaya çıkmaktadır. *Candida* endokarditinde son dönemlerde görülen artışın önemli nedeni olarak, kalp kapağı ameliyatlarının yaygınlaşması ve eroin gibi intravenöz ilaç kullanımındaki artış sorumlu tutulmaktadır(2).

2.4.11. Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları:

Merkezi sinir sistem kandidiyazisi hem beyin dokusunu hemde meninksleri etkileyebilmektedir. Nadiren nöroşirurji veya kafa travmaları ile ilişkilendirilen vakalar dışında genellikle hematojen yayılım ile ortaya çıkar. Otopsi çalışmaları, invaziv kandidiyazis vakalarının %48' inde beyin tutulumu olduğunu göstermektedir(2).

Akut *Candida* menenjit, menenjit bulgularıyla ortaya çıkar ve bakteriyel menenjitten ayırt edilememektedir. *Candida* menenjitinde tüm *Candida* türleri etken olabilirken; lösemili çocuklarda *C. tropicalis*'in daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Akut *Candida* menenjitinde beyin omurilik sıvısında (BOS) düşük glikoz seviyesi, yüksek protein miktarı ve değişken hücre sayısı gözlenir (2).

2.5. ANTİFUNGAL İLAÇLAR VE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Antifungal ilaçlar etki mekanizmalarına göre altı temel gruba ayrılır. Bunlar arasında hücre zarını hedef alan poliyenler, ergosterol sentezini inhibe eden azoller, DNA yapısını bozan antimetabolitler, skualen epoksidaz enzimini inhibe eden alilaminler, hücre duvarı sentezini engelleyen ekinokandinler ve hücre bölünmesini durduran fungal mitoz inhibitörü griseofulvin bulunmaktadır(40).

Antifungal ilaçların etki mekanizmaları ve bunlara direnç gelişiminde etkili olan genler Şekil 1’ de gösterilmiştir(41).

2.5.1. Poliyenler

Poliyen grubu antifungaller arasında amfoterisin B ve nistatin yer almaktadır. Amfoterisin B ve lipid formları sistemik mantar enfeksiyonlarında tercih edilirken, nistatin topikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Etki mekanizması; mantar hücre zarındaki ergosterole bağlanarak hücre zarının geçirgenliğini bozmasına dayanır. Hücre içi maddelerin hücre dışına sızmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. Poliyenler ayrıca oksidatif süreçler yoluyla doğrudan zar hasarı da oluşturabilir. Bu çok yönlü etki mekanizması, poliyenleri mantar enfeksiyonlarına karşı etkili bir silah haline getirmektedir(40).

Amfoterisin B gibi poliyen grubu antifungal ilaçlar uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, direnç gelişimi nadiren görülmektedir. Bazı *Candida* türlerinde (*C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii*) duyarlılıkta azalma bildirilmiştir. *Candida*’larda genellikle tedavi sırasında gelişen sekonder direnç görülebilmektedir. Amfoterisin B direnci, mantar hücrelerindeki yapısal ve biyokimyasal değişikliklerle ilişkilidir. Dirençli *Candida* ve *Cryptococcus* türlerinde, ergosterol seviyesinin azaldığı ve yerine poliyenlere daha az bağlanan fekosterol gibi sterollerin geçtiği gözlenmiştir. Direnç mekanizmasının moleküler temeli tam olarak aydınlatılamamış olsada, C-8 sterol izomerazı kodlayan ERG2, C-5 sterol desatürazı kodlayan ERG3 ve C-24 sterol metiltransferazı kodlayan ERG6 gibi sterol biyosentezinde rol oynayan genlerdeki mutasyonların etkili olabileceği öne sürülmektedir(40).

2.5.2. Azoller

Azol grubu antifungaller, imidazoller ve triazoller olarak iki ana sınıfa ayrılır. Bu ilaçlar, benzer etki mekanizmasına sahip olsa da kimyasal yapıları farklılık gösterir. Temel etkileri, lanosterol 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini durdurmaktır. Bu inhibisyon, mantar hücre zarının yapısını bozar ve hücre büyümesini engeller. Geniş etki spektrumları sayesinde çeşitli mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar (40).

Triazol grubu antifungaller, yapılarında üç nitrojen atomu içeren azol halkasıyla karakterizedir. Flukonazol, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol klinik pratikte sık kullanılan sistemik etkili antifungallerdir. Bunların yanı sıra, albakonazol, ravukonazol ve isavukonazol gibi yeni nesil triazoller de geliştirilmiştir(40).Yaygın olarak izole edilen *Candida* türleri arasında flukonazol direnç oranları farklılık gösterir. *C. krusei*, bu ilaca karşı doğal direnciyle öne çıkarken, *C. glabrata* izolatlarının yaklaşık onda biri flukonazole direnç göstermektedir. *C. albicans* 'ta direnç oranı %2'nin altındadır(40).

Candida türlerinin azol grubuna karşı geliştirdiği direnç, çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilir. Bu mekanizmalar genellikle üç ana kategori altında toplanabilir: Hedef enzimlerde oluşan değişiklikler, ilacın hücre içi konsantrasyonunun azaltılması ve bu iki sürecin birlikte işleyerek etki etmesi şeklinde gelişebilir. Hedef enzim değişikliklerinde; miktar veya kalite değişiklikleri, ilacın hedef bölgeye ulaşmasının azalması gibi durumlar etkili olmaktadır. ERG11 geni, azollerin etki ettiği lanosterol 14- α -demetilaz enzimini kodlar. ERG11 geninde oluşan nokta mutasyonları, enzimin yapısını değiştirerek azollerin bağlanma etkinliğini düşürür. Diğer bir mekanizma, ERG11 geninin aşırı ekspresyonudur. Bu durumda, mantar hücresi daha fazla hedef enzim üretir. Artan enzim miktarı ile ilacın etkisi azalır ve tüm enzimleri inhibe etmek için daha yüksek dozda ilaç gereksinimi ortaya çıkar(40).

Azol direncinin gelişmesinde önemli bir diğer mekanizma, hücre içi ilaç konsantrasyonunun azaltılmasıdır. Bu süreçte, dışa atım pompaları kritik rol oynar. Bu pompalar, azolleri aktif olarak hücre dışına taşıyarak etkilerini azaltır.

İki ana pompa sistemi öne çıkmaktadır. MDR (major facilitator type) pompaları ve CDR (ATP-binding cassette) taşıyıcılarının aşırı aktivitesi özellikle flukonazol direncine yol açar. Bu direnç mekanizmaları tek başına, sırayla veya eş zamanlı olarak çalışabilir (40).

2.5.3. Antimetabolitler

Flusitozin, antimetabolit grubundaki tek antifungal ilaçtır. Flusitozin, florlanmış bir pirimidin yapısına sahip olup, antimetabolit olarak etki gösteren tek antifungal ilaçtır. İlaç, permeaz enzimi aracılığıyla mantar hücresine girer. İçeride 5-florourasile (5-FU) dönüşen flusitozin, iki ana yolla etkisini gösterir. 5-FU, fosforlanarak 5-floroüridik aside (FUMP) dönüşerek RNA sentezinin bozulmasına neden olur ve protein sentezi bozulur. 5-FU'nun başka bir türevi olan 5-florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), timidilat sentaz enzimini bloke ederek DNA sentezini ve hücre bölünmesini durdurur. Flusitozinin etki alanı sınırlıdır; başlıca *Candida* türleri, *Rhodotorula*, *Cryptococcus neoformans* ve bazı esmer mantarlara karşı etkilidir. Flusitozin direnci, *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans*'ta genellikle tedavi sırasında gelişen bir sorundur. Primer direnç nadir görülse de, monoterapide sekonder direnç gelişimi yaygındır(40).

2.5.4. Alilaminler

Terbinafin ve naftifin alilaminler grubundaki antifungal ilaçlardır. Terbinafin hem sistemik hem de topikal uygulanabilen formlarda bulunurken, naftifin yalnızca topikal olarak kullanılmaktadır. Skualen epoksidaz enzimini hedef alarak mantar hücre zarının yapısındaki ergosterol üretimi engellenir. Bu süreç, mantar hücresinde skualen birikimine yol açar, hücre zarının yapısını bozar ve sonuçta hücre ölümüne neden olur(40).

Terbinafin ve naftifin gibi alilamin grubu antifungallerin kullanımında klinik başarısızlıklar gözlenmiştir. Ancak, bu başarısızlıkların doğrudan direnç gelişimiyle ilişkisi henüz kesin olarak ortaya konmamıştır. Öte yandan, araştırmalar CDR1 çoklu ilaç dışı atım pompasının terbinafini substrat olarak kullanabildiğini göstermiştir. Bu bulgu, dışı atım mekanizmasının bu ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir(40).

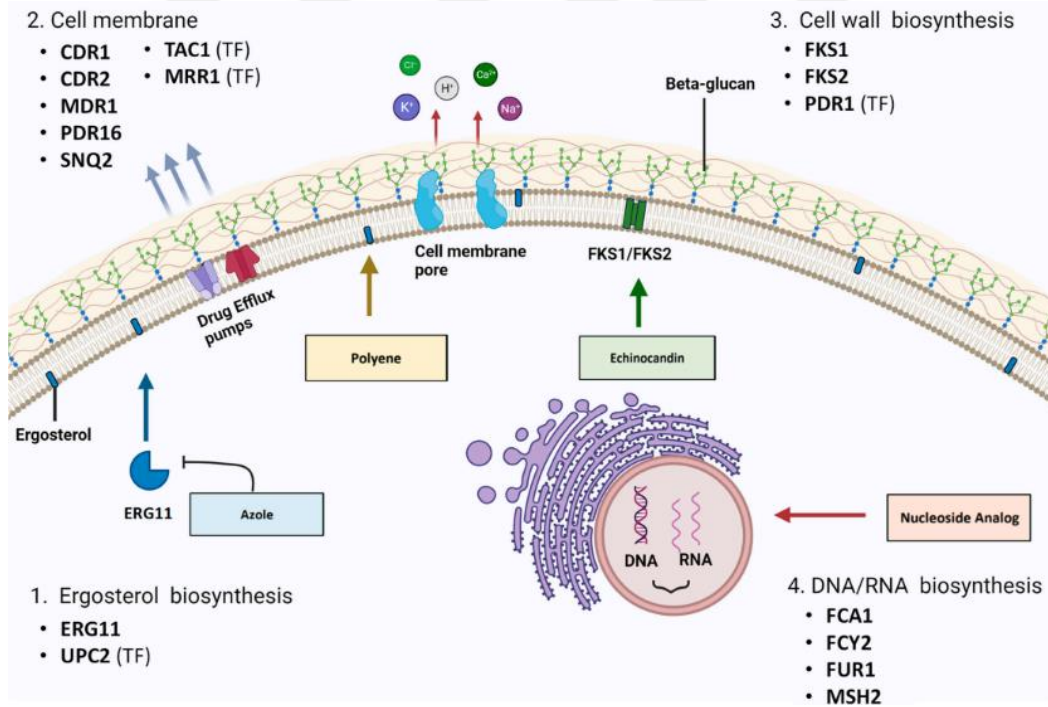
2.5.5. Ekinokandinler

Ekinokandinler, lipopeptit yapıda geniş spektrumlu antifungal ilaçlardır. Bu grupta anidulafungin, kaspofungin, mikafungin ve rezafungin bulunur(42). Mantar hücre duvarının temel bileşeni olan glukan sentezini engelleyerek mantar hücre duvarının bütünlüğünü bozar ve hücrenin ölümüne yol açar (40).

Ekinokandin grubu ilaçlarda direnç mekanizması, glukan sentezinde görev alan enzim komplekslerindeki değişikliklerle ilişkilidir. Dirençli suşlarda, glukan sentaz enzim kompleksinin katalitik alt birimlerini kodlayan FKS1 veya FKS2 genlerinde nokta mutasyonları saptanmıştır(40).

2.5.6. Griseofulvin

Mantar hücrelerinin mitoz bölünme mekanizmasında rol oynayan mikrotübüllerin yapısını bozarak etki gösterir. Mitoz sırasında oluşan iğ iplikçiklerinin düzgün çalışmasını engeller ve böylece hücre bölünmesini durdurur. Bu ilaçların en belirgin özelliği, özellikle dermatofitlere karşı etkili olmalarıdır(40).



Şekil 1: İlaç hedef yollarında antifungal dirençle ilişkili genler: 1. ergosterol biyosentezi, 2. hücre zarı, 3. hücre duvarı biyosentezi 4. DNA/RNA biyosentezi (41)

2.6. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

2.6.1. Referans Antifungal Duyarlılık Testi Yöntemleri

2.6.1.1. Sıvı mikrodilüsyon: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından maya ve küf mantarları için antifungal duyarlılık testlerinde (AFDT) tutarlı ve güvenilir sonuçlar alınması amacıyla standart antifungal test yöntemleri geliştirmiştir. Bu yöntemlerle ilgili dökümanlar yıllar içerisinde revize edilerek bugünkü şekillerini almıştır. CLSI'nin öncü çalışmalarını takiben, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST-AFST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)), hem maya hem de küf mantarları için CLSI yöntemlerine benzer ancak bazı özgün değişiklikler içeren kendi antifungal duyarlılık test standartlarını geliştirmiş ve bu protokolleri yayınlamıştır(43).

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde, standardize edilmiş besiyerinde hazırlanan antifungal ilaçların iki katlı seri dilüsyonlarına, belirli yoğunlukta hazırlanmış mantar süspansiyonu eklenir ve 24-48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirilir. Sıvı mikrodilüsyon için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri, mantar organizmasının büyümesini önceden belirlenmiş bir dereceye kadar azaltan ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanır(44).

Antifungal duyarlılık testlerinde CLSI ve EUCAST arasında mayalar için bazı farklılıklar bulunmaktadır. Her iki yöntemde standart RPMI-1640 besiyeri kullanılmakla birlikte, glukoz konsantrasyonu, inokulum miktarı ve değerlendirme kriterleri açısından farklılıklar gösterir. CLSI'da görsel değerlendirme yapılırken, EUCAST' da spektrofotometrik ölçüm kullanılır. Ayrıca mikropalak kuyucuklarının yapısal özellikleri ve inokulum hazırlama aşamaları da iki protokol arasında bazı farklılıklar içermektedir. MİK değerlendirmesinde, azol grubu antifungaller için $\geq 50\%$ üreme inhibisyonu, amfoterisin B için CLSI'da 100% iken EUCAST'te $\geq 90\%$ inhibisyon esas alınır(44).

Sıvı mikrodilüsyon yönteminin teknik açıdan yapılan bir değerlendirmesinde, standardize edilmiş bir protokol kullanılmasına rağmen test sonuçlarının çeşitli faktörlerden etkilenebileceği vurgulanmaktadır. İnokulum büyüklüğü, hücrelerin büyüme fazı, inkübasyon sıcaklığı ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) ve süresi gibi test değişkenlerindeki

küçük farklılıkların sonuçları etkileyebildiği belirtilmiştir. CLSI yönteminde testin değerlendirme aşamasındaki görsel okumanın bireysel yorumlardan etkilenebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, SMD yönteminde test sonuçlarının değerlendirme aşamasında bu teknik sınırlamaların göz önünde bulundurulması önemlidir(45).

2.6.1.2. Disk difüzyon: Disk difüzyon testi; standart miktarda antifungal içeren disklerin mantar süspansiyonu ile inoküle edilmiş agar yüzeyine yerleştirilmesi ve inkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zon çaplarının değerlendirmesi ile yapılmaktadır. Zon çapları, referans tablolardaki klinik sınır değerlerine göre yorumlanır, ancak bu yöntemle MİK değeri belirlenemez. CLSI mikrodilüsyon dokümanlarının yanı sıra, maya ve küf mantarları için disk difüzyon klavuzları da yayınlamıştır. *Candida* cinsi için flukonazol, vorikonazol, kaspofungin ve mikafungin için yorumlama kriterleri belirlenmiştir (44).

2.6.2. Referans Dışı Antifungal Duyarlılık Test yöntemleri

Antifungal duyarlılık testlerinde, geleneksel mikrodilüsyon yöntemlerinin zorluklarını aşmak için çeşitli alternatif teknikler geliştirilmiştir. Bu yenilikçi yaklaşımlar arasında gradient difüzyon yöntemi, kolorimetrik mikrodilüsyon kitleri (örneğin Sensititre YeastOne, Trek Diagnostic Systems, Inc., Westlake,), XTT yöntemi ve otomatik sistemler (Vitek2) ön plana çıkmaktadır(43).

2.6.2.1. Agar gradient difüzyon yöntemi: Agar gradient difüzyon yönteminde; bir tarafında önceden tanımlanmış, kurutulmuş antifungal ilaç gradyanı içeren, diğer tarafı konsantrasyon ölçeği ile işaretlenmiş olan ince plastik veya nitroselüloz şeritler kullanılmaktadır. Test sonuçları, 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun, şerit üzerindeki konsantrasyon skalasını kestiği noktada MİK değeri olarak belirlenir. Gradient difüzyonun performansı ile ilgili çalışmalar arasında önemli ölçüde farklılık görülmektedir. Ticari olarak E-test (bioMérieux), Liofilchem (Waltham, MA, ABD) vb. gibi birçok ürün mevcuttur(44).

2.6.2.2. Sensititre YeastOne: Sensititre YeastOne sistemi (ThermoFisher Scientific), kolorimetrik indikatör içeren ve antifungallerin seri dilüsyonlarının bulunduğu 96 kuyucuklu mikropalakalardan oluşur(44). Test sisteminde pH göstergesi rezasurin ile inkübasyon süresince mikroorganizma üremesine bağlı pH değişimleri kolorimetrik olarak saptanabilmekte ve sonuçlar buna göre değerlendirilmektedir(45).

2.6.2.3. Ticari otomatize sistemler: Candida türlerinin antifungal duyarlılık testlerinde kullanılan otomatize sistemlerden en yaygın olan Vitek2 sistemidir. Bu sistem, klasik sıvı mikrodilüsyon yönteminin küçültülmüş ve otomatikleştirilmiş bir versiyonunu kullanır. İzolat serum fizyolojik içinde standardize bir konsantrasyona ayarlandıktan sonra, ilaç kuyucuklarını rehidrate etmek için kullanılır ve kart bir Vitek2 kart okuyucu/inkübatörüne yerleştirilir. Cihaz içerisinde 36 saate kadar (genellikle 12-14 saat) optik okuyucu ile üreme takibi yapılır ve spektrofotometrik ölçümlerle MİK değerleri belirlenir. Çeşitli antifungal ilaçların (flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve ekinokandinler) farklı konsantrasyonlarını içeren hazır kartlar kullanılır. Sistem, hızlı sonuç vermesi, yüksek sayıda örnek çalışılabilmesi ve objektif değerlendirme olanağı sağlaması gibi avantajlara sahiptir(44,45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, prospektif olarak tasarlanmıştır. Araştırmamızın tasarımı, Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır. Helsinki Bildirgesi'nde geçen uluslararası etik kurallarına uyulmuş ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 16.01.2024 tarihli 4241 sayılı karar ile onay almıştır

3.1. İzolatların Seçilmesi

Çalışmamızda, 01 Ocak 2021-30 Kasım 2023 tarihleri arasında Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve İSLAB-3 Bölge Merkez Laboratuvarı'na gönderilen vajinal örnekler değerlendirildi. Bu süreçte incelenen 763 vajinal örnekten toplam 403 *Candida* izolatı elde edildi. İzolatların tür düzeyinde tanımlanmasında 307 *C. albicans* izolatı saptandı ve bunlardan 277'sine Vitek2 (BioMerieux®, Fransa) sistemi ile antifungal duyarlılık testi uygulandı. Antifungal duyarlılık testlerinde azollere karşı azalmış duyarlılık gösteren izolatlar agar gradient test (E test; BioMerieux®, Fransa) yöntemi ile çalışıldı. Rutin laboratuvar uygulamaları sonucunda flukonazol ve/veya vorikonazole karşı dirençli (R) veya doza bağlı duyarlı (SDD) bulunan toplam 68 izolat dahil edildi. Bir hastadan tekrarlayan kültür ve üremeleri olması durumunda ilk izolat dahil edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm *C. albicans* izolatları, %20 gliserollü Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde -80°C'de saklandı.

3.2. *Candida* İzolatlarının Tanımlanması:

İzolatların tür tanımı germ tüp testi ve matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight (MALDI-TOF) sistemi olan Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile yapıldı.

Germ tüp testinde; test edilecek olan izolatın SDA besiyerindeki kolonisinden az bir miktar koloni alınarak 0.5 ml insan serumu içerisinde süspansiyon yapıldı. 37°C'de maksimum 2,5-3 saat inkübasyon sonrasında süspansiyondan bir damla alınarak lam-lamel arasında ışık mikroskopunda 40x objektifi ile incelendi. Maya

hücrelerinden çıkan ve başlangıç noktasında boğumlanma olmayan hif benzeri uzantılar germ tüp pozitif olarak değerlendirildi.

3.3. Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)

Çalışmaya dahil edilen 68 flukonazole /vorikonazole dirençli/SDD olan *C. albicans* izolatının antifungal duyarlılıkları Vitek2 Compact (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) otomatize sistemi, agar gradient test ve referans sıvı mikrodilüsyon testi (SMD) kullanılarak belirlendi. Her test en az iki kez tekrar edildi.

3.3.1. Vitek2 Otomatize Sistemi ile Antifungal Duyarlılık Testi:

Otomatize sistemle yapılan antifungal duyarlılık testi için Vitek2 Compact (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) sistemi ve AST-YS08 antifungal duyarlılık kartları kullanıldı. İzolatların inokulumu %0,45 NaCl salin ile steril tüp içinde 2,0 McFarland olarak ayarlandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda AST-YS08 maya duyarlılık kartlarına inokule edilerek cihaza yerleştirildi. Cihazda maya üremesi optik okuyucu ile spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve MİK değerleri otomatik olarak belirlendi. Ortalama 18-24 saatte sonuç alındı.

3.3.2. Agar Gradient Difüzyon Test Yöntemi ile Antifungal Duyarlılık Testi:

Agar gradient difüzyon test için flukonazol ve vorikonazol E test (BioMerieux®, Fransa) stripleri kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda %2 glikoz ve %1.5 agar içeren RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyeri kullanıldı. İnokulum için %0.85 sodyum klorürde 0.5 McFarland standart bulanıklığına göre süspansiyon hazırlandı ve eküvyon ile agar yüzeyine yayıldı. Agar plaklarının yüzeyleri hafifçe kuruduktan sonra flukonazol (0.016µg/mL-256 µg/mL) ve vorikonazol (0,002 µg/mL-32 µg/mL) içeren E-test (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) şeritleri yerleştirildi. Plaklar 35±2°C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında E test şeridinde %80 üreme inhibisyonu sağlayan en küçük değer MİK (µg/mL) değeri olarak belirlendi. MİK sonuçlarının değerlendirilmesinde her iki antifungal için CLSI M27M44S-Ed3 kılavuzunda belirlenen klinik sınır değerleri kullanıldı(46).

3.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi:

Referans sıvı mikrodilüsyon testi (SMD) CLSI M27-A3 önerilerine göre L-glutaminli, bikarbonatsız, RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) besiyeri kullanılarak çalışıldı(47). Referans SMD testi Koç Üniversitesi İş Bankası Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.3.3.1. RPMI besiyeri hazırlanması: 10.4 gr toz RPMI besiyeri 900 ml distile suda eritildi, 34.53 gr 0.165 M morfolin-propan-sülfonik asit (MOPS) eklendi. Eriyene kadar karıştırıldı. Oda ısısında PH:7 olana kadar 1 mol/l NaOH (sigma) eklendi ve distile su ile 1 litreye tamamlandı. 0,2 µm filtrelerden geçirilerek steril edildi.

3.3.3.2. Plakların hazırlanması: Flukonazol (Sigma Aldrich, ABD) ve vorikonazol (Sigma Aldrich, ABD) antifungalleri kullanıldı. Stok solüsyonlar aşağıdaki formüle göre hazırlandı

$$Ağırlık (mg) = \frac{[Hacim (ml) \times Konsantrasyon (\frac{\mu g}{ml})]}{ilaç Potansi (\frac{\mu g}{mg})}$$

Antifungal dilüsyonları 96 kuyucuklu U-tabanlı plaklar kullanılarak en yüksek konsantrasyondan başlayan iki katlı azalan seri dilüsyonlar şeklinde hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropklara 100 µl hacimde dağıtılan besiyeri konsantrasyonları, flukonazol için 32-0.06 µg/ml ve vorikonazol için 16-0.03 µg/ml aralığında olacak şekilde ayarlandı. Mikropklarda her sıradaki 1-10 kuyucuklara 100 µl dağıtıldı. 11. ve 12. kuyucukların her birine 100 µl antifungal içermeyen besiyeri eklenerek; 11. kuyucuk üreme kontrolü, 12. kuyucuk sterilit kontrolü olarak kullanıldı.

3.3.3.3. Maya inokulumu: SDA besiyerinde mayaların $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saatlik kültürleri kullanıldı. Kolonilerden 5ml SF içinde vortekslenerek 0,5 Mc Farland bulanıklık ölçüsünde inokulumlar hazırlandı. Hazırlanan SF içindeki süspansiyondan 500 μL alınıp, ilk olarak 9,5 mL RPMI içeren tüpe konularak 1/20 oranında seyreltildi. Sonra seyreltilmiş karışımın bulunduğu tüpten 200 μL alınıp 9,8 mL RPMI içeren tüpe konularak 1/50 oranında daha seyreltildi.

3.3.3.4. İnokulumların dağıtılması ve değerlendirme: Mikrodilüsyon plağının ilk 10 kuyucuğuna ve ilaç içermeyen 11. kuyucuğa (üreme kontrolü için) hazırlanan maya süspansiyonundan 100'er μL dağıtıldı. Plağın 12. kuyucuğuna maya içermeyen RPMI 1640 besiyerinden 100 μL olacak şekilde sterilite kontrolü için eklendi.

Mikrodilüsyon plakları $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ortam havasında inkübe edilerek, 24. ve 48. saatlerde görsel olarak değerlendirildi. Testin değerlendirilmesinde, deney kuyucukları üreme kontrol kuyucuğu ile görsel olarak karşılaştırıldı. Flukonazol ve vorikonazol için üreme kontrol kuyucuğuna göre %50 inhibisyonun gözlemlendiği MİK değerleri görsel olarak belirlendi (Şekil 2).

Sonuçların yorumlanmasında CLSI M27M44S-Ed3 kılavuzunda belirlenen klinik sınır değerleri kullanıldı (Tablo 1). Suşlar MİK değerlerine göre S (susceptible=duyarlı), SDD (Susceptible-dose dependent= Doza Bağlı Duyarlı), ve R (Resistant= Dirençli) olarak sınıflandırılmıştır(46).

Tablo 1: *Candida albicans* için azol grubu antifungallerin klinik sınır değerleri

CLSI		MİK($\mu\text{g/ml}$)		
	S($\leq$)	I	SDD	R($\geq$)
FLU	2	-	4	8
VOR	0,12	0,25-0,5	-	1

CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute, S: Duyarlı, SDD: Doza Bağlı Duyarlı, R: Dirençli FLU: Flukonazol VOR: Vorikonazol



Şekil 2: Sıvı Mikrodilüsyon Testi

3.3.3.5. Kalite kontrol: Antifungal duyarlılık testlerinde kalite kontrol amacıyla *C. parapsilosis* ATCC (American Type Culture Collection) 22019 ve *C. krusei* ATCC 6298 suşları kullanıldı.

3.4. Veri ve İstatistiksel Analizi

Veri analizi, Food and Drug Administration (FDA)'nın 2009 yılında yayınladığı ve 2018 yılında güncellenen Endüstri ve FDA için Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Sistemleri, Sınıf II Özel Kontroller Kılavuzu'na göre yapıldı(48)

Buna göre ADST'de, Esansiyel uyum (EU), kategorik uyum (KU), çok büyük hata (ÇBH), büyük hata (BH) ve küçük hata (KH) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Çalışmamızda 24 ve 48 saatlik flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi.

KU: CLSI referans metodu ve değerlendirilen yöntemin sonuçlarının yorumunun (duyarlı, orta duyarlı, dirençli) kategorik sonuç olarak uyumlu olmasıdır. KU oranı şu formülle hesaplanabilir:

$$KU = \frac{\text{Referans metodla kategorik uyumlu olanlar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

EU: CLSI referans metodu ve değeriendirilen yöntemin sonuçlarının aynı olması veya aralarındaki farkın +/-2 dilüsyon içinde olmasıdır. EU oranı şu formülle hesaplanabilir:

$$EU = \frac{\text{Referans metodla tam uyumlu veya } +/-2 \text{ dilüsyon içinde uyumlu olanlar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

KH: CLSI referans metodunun kategorik sonucu dirençli veya duyarlı iken yeni yöntemin sonucu orta duyarlıysa veya tam tersi CLSI referans metodunun kategorik sonucu orta duyarlı iken değeriendirilen yöntemin sonucu dirençli veya duyarlıysa küçük hatadır. KH oranı şu formülle hesaplanabilir:

$$KH = \frac{\text{Kategorik sonuca dayalı küçük hatalar}}{\text{Test edilen toplam organizma sayısı}} \times 100$$

BH: CLSI referans metodunun kategorik sonucu duyarlı, değeriendirilen yöntemin sonucu dirençli ise büyük hata denir. BH oranı şu formülle hesaplanabilir:

$$BH = \frac{\text{Kategorik sonuca dayalı büyük hatalar}}{\text{Referans metodla duyarlı bulunan toplam organizma sayısı}} \times 100$$

ÇBH: CLSI referans metodunun kategorik sonucu dirençli iken değeriendirilen yöntem sonucu duyarlıysa çok büyük hatadır. ÇBH oranı şu formülle hesaplanabilir:

$$\text{ÇBH} = \frac{\text{Kategorik sonuca dayalı çok büyük hatalar}}{\text{Referans metodla dirençli bulunan toplam organizma sayısı}} \times 100$$

3.5. Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT)

İzolatların flukonazole direnç mekanizmalarının moleküler olarak araştırılması için; SMD testi sonucunda flukonazole dirençli 32 izolat, flukonazole

doza bağılı duyarlı altı izolat, flukonazole duyarlı olup vorikonazole orta duyarlı olan dört izolat çalışmaya alındı.

Ergosterol demetilaz enzimini kodlayan ERG11, atım pompalarını kodlayan CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile araştırıldı. *C.albicans* izolatları için ERG11, CDR1, CDR2, MDR1 genlerinin internal kontrol geni olarak ACT1 geninin ekspresyon seviyesi araştırıldı. Referans suş olarak *C.albicans* ATCC 14053 kullanıldı. Deney grubu izolatlarında kontrol ATCC suşuna göre hedef genin kaç kat eksprese edildiği hesaplandı. Kontrol ATCC suşuna göre kat değişim değeri 1'den büyük olduğunda, hedef grubun RNA ekspresyonunun referans grubun RNAekspresyonuna göre artmış olduğu kabul edildi.

3.5.1. RNA Eldesi

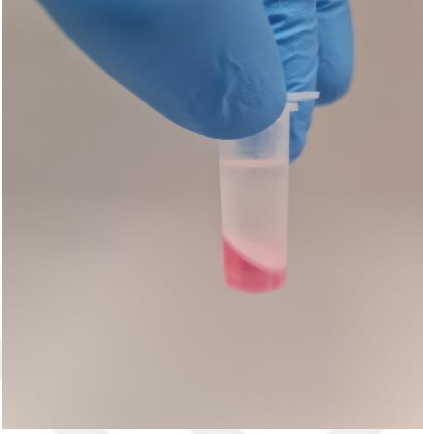
RNA izolasyonu için bazı modifikasyonlarla Trizol bazlı yöntem kullanıldı(49).

1. SDA besiyerine pasajlanan *C. albicans* izolatları $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilerek üretildi.
2. Üreyen kolonilerden 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içine 500 µl PBS sıvısı eklendi. Maya kolonisinden 10 µl 'lik öze dolusu ilave edilerek süspansiyon hazırlandı.
3. Sıvı nitrojende 10 sn bekletilerek süspansiyon donduruldu.
4. 1000 µl TRIZol Reagent (Invitrogen™ Thermo Scientific) ve 400 mg cam boncuk kullanılarak oda ısısında 2850 rpm' de 15-20 dk vortekslendi.
5. Oda ısısında 2 dk bekletildikten sonra santrifüj cihazında 13000 rpm' de. 4°C de 15 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant 2 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı.
7. Üzerlerine 0.2 ml kloroform eklendi.
8. 15 sn. el ile mikrosantrifüj tüpü karıştırıldı.

9. Oda ısısında 3 dk. inkübe edildi.

10. 13000 rpm' de 4 C° de 15 dk. santrifüj edildi

11. Üst faz 2 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.



Şekil 3:Trizol-kloroform sonrası üst-ara ve alt faz

12. 0.5 ml izopropanol eklendi.

13. Oda ısısında 10 dk. inkübe edildi.

14. 13000 rpm' de 4 C° de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

15. Pellet üzerine %75 oranında 250 ml soğuk etanol eklendi. 10000 rpm' de 4 C° de 5 dk. santrifüj edildi

16. Süpernatant atıldı. Ethanolün pelletten tamamen uzaklaşması için yaklaşık 30 dk bekletildi.

17. Pellet üzerine 50 µl nükleaz free water eklendi.

18. 60 C° 10 dk sıcak su banyosunda bekletildi.

19. Elde edilen RNA nın kalite ve konsantrasyonu IMPLN NanoPhotometer NP80 cihazında 260/280 nm dalga boyunda ölçüldü.



Şekil 4:IMPLEN NanoPhotometer NP80 cihazı

3.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA kullanılarak “OneScript Plus cDNA Synthesis Kit, 100 rxn” (abm, Canada) kiti ile üretici firma önerileri doğrultusunda Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycle(ThermoFisher scientific) cihazı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Dört µl 5X revers transkripsiyon master miksi, bir µl OneScript plus revers transkriptaz enzimi, bir µl primers, bir µl dNTP ve RNA template, nükleaz-free water karışımından oluşan toplam 20 µl'lik reaksiyon hacmi kullanıldı. Hava kabarcıklarını gidermek ve içeriği karıştırmak için kısa süre spin santrifüj edildi. PCR döngüsü; 25°C'de 5 dakika, 46°C' de 20 dakika ve 95°C'de 1 dakika RT inaktivasyonu olacak şekilde programlandı. cDNA sentezi sonrası, her bir qRT-PCR analizi için final konsantrasyon 200 ng cDNA/µl olacak şekilde nükleaz-free su ile dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen cDNA -20 °C' de saklandı.



Şekil 5: Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycle (ThermoFisher scientific)

3.5.3. Real time qPCR

cDNA elde edildikten sonra real time qPCR basamağı uygulandı. Real time qPCR için BlasTaq 2X qPCR MasterMix, 500 rxn (4 x 1.25 ml) (abm, Canada) kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo 2’de, kullanılan master miks içerikleri Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 2: Primerler

Primer	Primer dizisi (5→3')	Referans No
ERG11 F	GCTGCTGCCAAAGCTAATTC	(50)
ERG11 R	TCTATGTCTACCACCACCAAATG	
MDR1 F	TCAGCGGGTTCTTTGTTGTATG	(51)
MDR1 R	GATAATGTTTAGCAAGCCGAGGA	
ACT1 F	CCAGCTTTCTACGTTTCC	(52)
ACT1 R	CTGTAACCACG TTCAGAC	
CDR1 F	CCG TTT TCG GTC AAC TTG TAA TGG	(53)
CDR1 R	AAA CGA TCC AGT GGT TTG ACT AAG ATT	
CDR2 F	GGC TTA TCA ATT TTA TTC TTC ACA CAA ATG GA	(53)
CDR2 R	CAG TCA AGG CAA CAT AAA CTC CTA AGA	

Tablo 3: RT-qPCR master miks

Master Miks içerikleri	Volüm
BlasTaq™ 2X qPCR MM 1	10 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Template DNA	4 µl (200 ng genomik DNA)
Nuclease-free H ₂ O	4 µl
Toplam	20 µl

Master miks hazırlandıktan sonra real time qPCR reaksiyonu uygulandı. Reaksiyon koşulları Tablo 4’ te gösterilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Bio-Rad CFX96 C1000 Touch Real-Time PCR Detection System cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 4:RT-qPCR reaksiyon koşulları

PCR Basamağı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Siklus
İlk denatürasyon	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma	63	1 dakika	
Erime eğrisi	65-95	Sürekli	1

3.5.5. Rölatif Kantitasyon Hesaplama

RNA ekspresyon kantitasyonu, referans olarak ACT1 transkripti kullanılarak kontrol grubuna normalize edildi. Rölatif kantitasyon hesaplanmasında "" $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi" kullanıldı. $\Delta\Delta C_t$ 'nin hesaplanması:

1.Hem hedef grup hem de referans gruptaki her numunenin hem hedef RNA hem de referans RNA'sı için real time PCR ile C_t değerleri elde edildi. Real time PCR basamağı üç kere tekrarlandı ve elde edilen C_t değerlerinin ortalaması alındı.

2.Hedef grubun ΔCt değerleri, referans RNA Ct değerinin hedef gruptaki hedef RNA Ct değerinden çıkarılmasıyla elde edildi.

3. Referans grubun ΔCt değerleri, referans RNA Ct değerinin referans grubundaki hedef RNA Ct değerinden çıkarılmasıyla elde edildi.

4. $\Delta\Delta Ct$ değerleri, referans grubun ΔCt değerlerinin hedef grup ΔCt değerlerinden çıkarılmasıyla elde edildi.

5. Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak işlendi ve kat değişimi (fold change) olarak hesaplandı.

6. Kat Değişim değeri 1'den büyük olduğunda, hedef grup RNA ekspresyonun referans grubun RNA ekspresyonuna göre artmış olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

S.B.Ü. Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve İSLAB-3 Bölge Merkez Laboratuvarı'na 01.01.2021-30.11.2023 tarihleri arasında gönderilen vajinal örnekler değerlendirilmiştir. Toplam 763 vajinal örneğin laboratuvar incelemesinde 403 örnekte (%52,8) *Candida* türleri izole edilmiş olup, bunların 307'si (%76) *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. Rutin laboratuvarında antifungal duyarlılık testi çalışılan 277 *C. albicans* izolatının 78'i flukonazole R/SDD olarak raporlanmıştır. Tekrarlayan hastalar ve üremeyen izolatlar çıkarıldığında 68 izolat referans SMD testi ile çalışılmıştır.

4.1. İzolatların Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Çalışmamıza alınan 68 *C. albicans* izolatının flukonazol (FLU) ve vorikonazol (VOR) için sıvı mikrodilüsyon, Vitek2 ve E-test ile saptanan MİK değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: İzolatların sıvı mikrodilüsyon, Vitek2 ve E-test ile saptanan MİK değerleri

İzolat Stok Kodu	FLU (µg/ml)				VOR (µg/ml)			
	SMD (24.s)	SMD (48.s)	VİTEK2	E-TEST	SMD (24.s)	SMD (48.s)	VİTEK2	E-TEST
K2160	4	8	8	24	0,5	1	2	1
K2161	8	8	8	12	0,25	0,25	0,5	0,5
K2163	4	8	4	8	0,5	1	1	1
K2164	8	16	8	32	1	2	1	1
K2165	4	8	8	4	0,25	0,25	0,5	0,38
K2166	1	2	2	3	0,25	0,5	0,25	0,38
K2167	4	4	8	4	0,5	0,5	0,25	1
K2168	4	8	8	12	0,5	1	2	2
K2169	8	16	4	8	0,5	2	<=0,12	1
K2170	8	16	8	24	1	2	2	1,5
K2172	4	4	8	8	0,5	0,5	1	1
K2173	1	2	1	2	0,25	0,5	0,25	0,38
K2174	8	16	8	16	1	2	2	1
K2175	8	8	16	12	0,5	0,5	>=0,12	1
K2176	1	1	1	1	0,06	0,06	<=0,12	0,125
K2177	4	8	8	8	1	2	1	1,5
K2178	2	2	2	6	0,06	0,06	<=0,12	0,19
K2179	4	16	8	12	0,5	1	0,25	1
K2180	8	8	2	8	0,5	2	2	1,5
K2181	4	8	8	16	0,5	1	<=0,12	1,5
K2182	4	4	8	6	0,5	1	2	0,5

K2183	8	8	8	12	0,25	1	0,5	2
K2184	8	8	4	12	0,25	1	2	1
K2185	16	16	8	24	1	2	1	2
K2186	4	4	1	4	0,5	2	$\leq 0,12$	0,25
K2187	2	4	1	2	0,5	2	$\leq 0,12$	0,75
K2188	2	2	1	3	0,25	0,5	$\leq 0,12$	0,5
K2189	4	4	2	6	0,5	2	1	1
K2190	2	4	2	2	0,5	1	1	1
K2191	4	8	8	24	0,5	1	1	1,5
K2192	4	16	8	24	0,5	2	1	4
K2193	N	0,125	$\leq 0,5$	0,125	$< 0,03$	$< 0,03$	$\leq 0,12$	0,006
K2194	N	0,5	$\leq 0,5$	1	N	0,125	$\leq 0,12$	0,012
K2196	4	4	2	3	0,125	0,5	1	0,5
K2197	8	8	4	12	0,125	1	0,5	1,5
K2198	4	8	4	6	1	2	1	0,75
K2199	8	8	8	12	1	1	2	2
K2200	8	8	2	8	0,5	1	1	1
K2201	8	≥ 32	4	3	0,5	2	1	0,75
K2202	4	8	8	6	0,25	0,5	1	0,5
K2203	8	16	8	8	1	2	2	1,5
K2204	2	4	2	4	0,25	0,5	0,5	0,38
K2206	2	4	4	4	0,125	0,125	$\leq 0,12$	0,19
K2207	1	1	$\leq 0,5$	0,75	0,125	0,5	$\leq 0,12$	0,19
K2208	2	4	1	2	0,25	0,5	0,25	0,5
K2209	8	8	8	12	0,5	1	1	1
K2210	4	8	16	16	0,5	1	1	4
K2211	2	8	4	6	0,25	0,5	1	0,75
K2266	2	4	2	4	0,25	0,5	$\leq 0,12$	0,25
K2268	8	32	8	48	0,5	4	1	1,5
K2269	8	16	8	8	1	4	1	2
K2270	8	16	2	6	1	4	1	0,75
K2271	4	8	2	8	0,5	1	1	1
K2273	8	16	4	8	0,5	4	1	1,5
K2274	2	4	2	4	0,125	0,25	$\leq 0,12$	0,75
K2275	8	32	4	8	1	4	1	1
K2276	1	1	2	3	0,125	0,5	1	0,5
K2277	1	8	1	4	0,25	1	0,25	0,38
K2278	4	8	8	8	0,125	0,25	0,25	0,25
K2279	4	8	2	2	0,25	2	1	0,38
K2280	4	8	16	32	0,5	1	2	2
K2281	8	16	8	8	1	2	2	2
K2282	8	16	4	8	0,5	1	1	1
K2283	8	32	8	32	1	2	1	2
K2284	8	8	4	4	0,5	2	1	1,5
K2285	4	4	16	3	0,25	0,5	0,25	0,25
K2286	1	1	1	3	0,25	0,5	0,25	0,5
K2288	2	4	2	4	0,25	0,25	0,5	0,5

*FLU: Flukonazol; VOR: Vorikonazol; N:Üreme olmadı

Flukonazol için SMD testinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen MİK değerleri arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) 0,64 olarak hesaplanmış ve orta düzeyde korelasyon olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 6).

Vorikonazol için SMD testinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen MİK değerleri arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) 0,67 olarak hesaplanmış ve orta düzeyde korelasyon olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 7).

Tablo 6: İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol için 24 ve 48. saat MİK dağılımı

FLU	SMD MİK ($\mu\text{g/mL}$)	48. s								
		0,125	0,5	1	2	4	8	16	32	>32
24. s	0,125									
	0,5									
	1			4	2		1			
	2				2	8	1			
	4					7	14	2		
	8						10	10	3	1
	16							1		

Tablo 7: İzolatların sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile vorikonazol için 24. ve 48. saat MİK dağılımı

VOR	SMD ($\mu\text{g/mL}$)	48. s							
		<0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
24. s	<0,03	1							
	0,06		2						
	0,125			1	2	3	1		
	0,25				3	10	3	1	
	0,5					3	14	8	2
	1						1	9	3

SMD testinde flukonazol için elde edilen MİK50/90 değerleri 24. saat sonunda 4/8 µg/mL iken, 48. saat sonunda 8/16 µg/mL'ye yükselmiştir. Vorikonazol için SMD testinin 24. saat MİK50/90 değerleri 0.5/1 µg/mL iken, 48. saatte 1/2 µg/mL olarak saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8: Antifungal duyarlılık test yöntemlerine göre MİK50 ve MİK90 değerleri (µg/mL)

		SMD24	SMD48	E TEST	VİTEK2
FLU	MİK 50	4	8	8	4
	MİK 90	8	16	24	8
VOR	MİK 50	0,5	1	1	1
	MİK 90	1	2	2	2

*SMD: Sıvı Mikrodilüsyon Flu: Flukonazol Vor: Vorikonazol MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

İzolatların antifungal test yöntemlerine göre kategorik dağılımları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9: İzolatların test yöntemlerine göre kategorik dağılımı

Antifungal	Metod	İzolat Sayısı (n)		
		S	SDD-I	R
FLU	SMD 24s	20	23	25
	SMD 48s	10	15	43
	E-test	9	17	42
	Vitek2	26	13	29
VOR	SMD 24s	11	44	13
	SMD 48s	5	21	42
	E-test	3	22	43
	Vitek2	14	15	39

Referans yöntem sıvı mikrodilüsyon testi ile diğer yöntemler arasındaki kategorik uyum, esansiyel uyum ve hata oranları Tablo 10’ da gösterilmiştir.

Tablo 10: Standart SMD yöntemi ile diğer yöntemler arasındaki uyum ve hata oranları (%)

Antifungal	İnkübasyon zamanı	Metod	Hata Oranları (%)			Uyum (%)	
			ÇBH	BH	KH	KU	EU
FLU	24s	E-test	0.00	10.00	17,64	52,94	91,2
		Vitek2	12	0.00	16,17	48,52	100
	48s	E-test	2,32	10.00	11,76	76,47	98,5
		Vitek2	13,95	0.00	17,64	52,94	94,1
VOR	24s	E-test	0.00	18.18	8,82	47,05	92,6
		Vitek2	0.00	18.18	13,6	48.52	97
	48s	E-test	0.00	0.00	8,82	83,82	95,6
		Vitek2	9,52	0.00	5,88	73,52	92,6

KU: Kategorik uyum ; EU: Esansiyel Uyum; ÇBH: Çok Büyük Hata; BH: Büyük Hata; KH: Küçük Hata

İzolatların Vitek2 sisteminde flukonazol için alınan duyarlılık testi sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla karşılaştırılmasında %100 temel uyum, %48,52 kategorik uyum saptanırken, SMD 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde %94,1 temel uyum, %52,94 kategorik uyum olduğu görülmüştür.

İzolatların Vitek2 sisteminde vorikonazol için alınan duyarlılık test sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla karşılaştırılmasında %97 oranında temel uyum, %48,52 oranında kategorik uyum saptanırken, 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde temel uyumu %92,6, kategorik uyumu %73,52 olarak saptanmıştır.

İzolatların E-test ile belirlenen flukonazol MİK sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla karşılaştırılmasında %91,2 temel uyum, %52,94 kategorik uyum saptanırken, SMD testinin 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde temel uyumu %98,5, kategorik uyumu %76,47 olarak saptanmıştır.

İzolatların E-test ile belirlenen vorikonazol MİK sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla karşılaştırılmasında; %92,6 temel uyum, %47,05 kategorik uyum saptanırken, 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde temel uyumu %95,6, kategorik uyumu %83,82 olarak saptanmıştır.

İzolatların SMD testinin 24. saat ve 48. saat sonuçları temel alındığında Vitek2 sisteminde flukonazol için sırasıyla %12 ve %13,95 oranında ÇBH saptanmıştır. Vitek2 sisteminde alınan vorikonazol duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesinde; SMD testinin 24. saat sonuçlarına göre ÇBH saptanmazken, 48. saat sonuçlarına göre %9,52 oranında ÇBH saptanmıştır.

İzolatların E-test yöntemi ile duyarlılık testi sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla karşılaştırılmasında; flukonazol için ÇBH oranı saptanmamış olup, %10 oranında büyük hata saptanmıştır. SMD testinin 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde ise %2,32 oranında ÇBH ve %10 oranında BH oranları saptanmıştır. Vorikonazol için E test yöntemiyle alınan test sonuçlarının SMD testinin 24. saat sonuçlarına göre değerlendirilmesinde ÇBH saptanmamış ancak %18,18 oranında BH saptanmıştır. SMD 48. saat sonuçlarına göre değerlendirildiğinde ise ÇBH ve BH saptanmamıştır.

Vitek2 ile SDD olarak kategorize edilen 13 izolatın, SMD yöntemi ile 24. saatte 11'i, 48 saatte 12'si dirençli olarak belirlenmiştir.

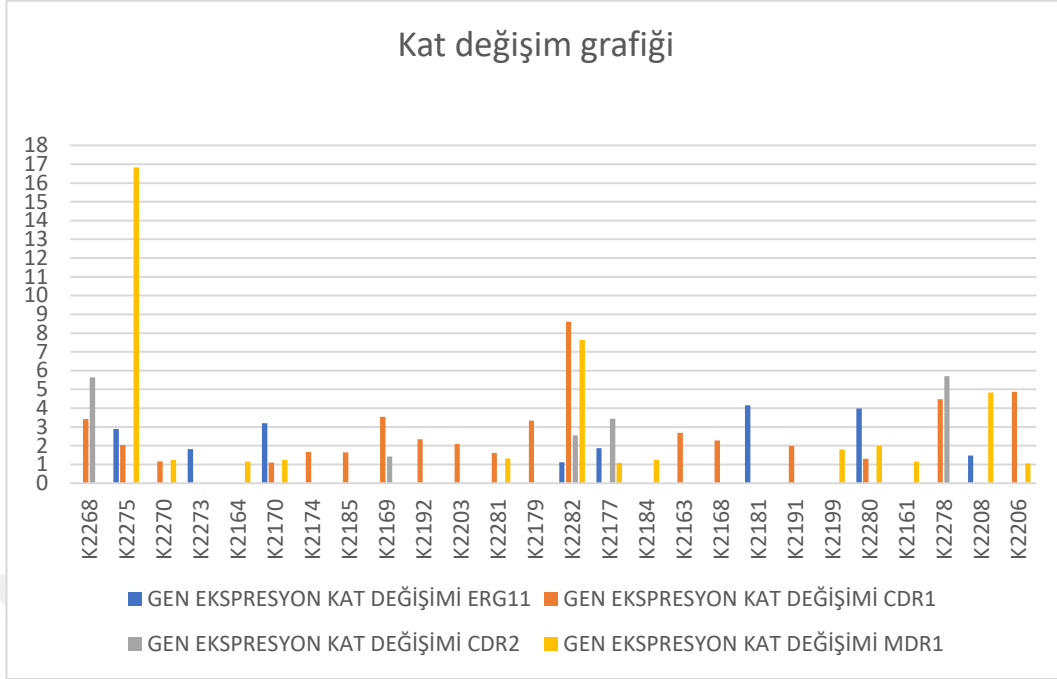
4.2 Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) Analizi

Çalışmamızda 42 *C. albicans* izolatının gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 11). Gen ekspresyon sonuçları incelendiğinde, flukonazole R/SDD olan 38 izolat arasında; 18 (%47) izolatta CDR1 geninde, 13(%34) izolatta MDR1 geninde, sekiz izolatta (%21) ERG11 geninde ve beş izolatta (%13) CDR2 geninde ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir.

Flukonazol MİK değeri ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ olan 32 izolatın 24'ünde (%75) en az bir direnç geni eksprese olurken, sekiz izolatta gen ekspresyonu saptanmamıştır. Flukonazol MİK değeri > 8 $\mu\text{g/mL}$ olan izolatların %70,5'inde; flukonazol MİK değeri ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ olan izolatların %28,5' inde CDR1 geninin ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır.

Tablo 11: İzolatların SMD yöntemiyle alınan MİK değerleri ve gen ekspresyon kat değişimleri

İZOLAT NO	FLU		VOR		GEN EKSPRESYON KAT DEĞİŞİMİ			
	24.s	48.s	24.s	48.s	ERG11	CDR1	CDR2	MDR1
K2201	8	>=32	0,5	2				
K2268	8	32	0,5	4		3,43	5,63	
K2275	8	32	1	4	2,90	2,03		16,82
K2283	8	32	1	2				
K2269	8	16	1	4				
K2270	8	16	1	4		1,17		1,23
K2273	8	16	0,5	4	1,82			
K2164	8	16	1	2				1,15
K2170	8	16	1	2	3,20	1,10		1,23
K2174	8	16	1	2		1,67		
K2185	16	16	1	2		1,65		
K2169	8	16	0,5	2		3,53	1,43	
K2192	4	16	0,5	2		2,35		
K2203	8	16	1	2		2,09		
K2281	8	16	1	2		1,62		1,33
K2179	4	16	0,5	1		3,33		
K2282	8	16	0,5	1	1,11	8,61	2,56	7,64
K2198	4	8	1	2				
K2177	4	8	1	2	1,87		3,44	1,09
K2183	8	8	0,25	1				
K2184	8	8	0,25	1				1,24
K2160	4	8	0,5	1				
K2163	4	8	0,5	1		2,69		
K2168	4	8	0,5	1		2,28		
K2181	4	8	0,5	1	4,15			
K2191	4	8	0,5	1		1,98		
K2199	8	8	1	1				1,80
K2209	8	8	0,5	1				
K2210	4	8	0,5	1				
K2280	4	8	0,5	1	3,98	1,31		1,98
K2161	8	8	0,25	0,25				1,15
K2278	4	8	0,125	0,25		4,48	5,71	
K2204	2	4	0,25	0,5				
K2208	2	4	0,25	0,5	1,47			4,83
K2266	2	4	0,25	0,5				
K2274	2	4	0,125	0,25				
K2288	2	4	0,25	0,25				
K2206	2	4	0,125	0,125		4,87		1,06
K2166	1	2	0,25	0,5				
K2188	2	2	0,25	0,5				
K2173	1	2	0,25	0,5				
K2286	1	1	0,25	0,5				



Şekil 6: Gen ekspresyon kat değişim grafiği

ERG11 geninin ekspresyon analizi sonuçlarında, flukonazole dirençli/SDD *C. albicans* izolatlarında referans suşa göre 1,11-4,15 kat arasında değişen ekspresyon artışı saptanmıştır.

Efluks pompa genlerinin ekspresyon analizinde, dirençli izolatlarda CDR1 geninde 1,10-8,61 kat, MDR1 geninde 1,09-16,82 kat ve CDR2 geninde 1,43-5,71 kat arasında değişen ekspresyon artışları saptanmıştır. Doza bağlı duyarlı suşlarda ise bir izolatta CDR1 geninin ekspresyonunda 4,87 kat, iki izolatta MDR1 geninde 1,06 ve 4,83 kat ekspresyon artışı görölmüőtür. CDR2 geni doza bağlı duyarlı/duyarlı suşlarda eksprese olmamıştır. Ekspresyonda artış saptadığımız izolatlardaki kat değişimi şekil 6'da gösterilmiştir.

5.TARTIŞMA

C. albicans insan mikrobiyotasının doğal bir üyesi olmakla birlikte, fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle VVK dünya genelinde kadınların %75' ini yaşamlarının bir döneminde etkileyen ve enfeksiyonu geçirenlerin %40-50'sinde ise birden fazla kez tekrar edebilen yaygın bir enfeksiyondur(1). Vajinal kandidozların %70-90'ında *C. albicans* etken olarak izole edilmektedir(5,54,55).

VVK tedavisinde genellikle azol grubu antifungaller kullanılmaktadır. Akut ve rekürren VVK tedavisinde en yaygın kullanılan sistemik ilaç flukonazoldür. Bununla birlikte flukonazole direnç oranlarında artış VVK tedavisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır(1).

Dünya genelinde *Candida* türlerinin antifungal direnç oranlarında bölgesel farklılıklar olduğu gösterilmiştir (56). Ayrıca farklı örnek türlerinden izole edilen *Candida* türlerinde de direnç oranı değişebilmektedir. Ying ve ark. (57)çalışmasında solunum, idrar, kan ve vajinal örneklerden izole edilen *C. albicans* izolatları arasında en düşük flukonazol duyarlılığının vajinal izolatlarda olduğu tespit edilmiştir. Son dönemlerde vajinal kandidozlarda azol grubu ilaçlara dirençli *C.albicans* sıklığında artış olduğu bildirilmiştir(15,58).

Agrawal ve ark.(58)'nın 2023 yılında yaptığı çalışmada vajinal *C. albicans* izolatlarında %30 oranında flukonazol direnci bildirilirmiş ve vajinal kandidiyaz olgularında flukonazol direncinin önemli bir klinik problem olduğu vurgulanmıştır.

VVK izolatlarında azol direncini artıran en önemli faktörlerden biri uygunsuz antifungal kullanımıdır. Bu durumun temelinde flukonazolün ampirik olarak reçetelendirilmesi, topikal azol preparatlarının reçetesiz satılabilmesi ve tekrarlayan VVK olgularında uygulanan düşük dozlu profilaktik flukonazol tedavileri yer almaktadır. Özellikle klinik tanısı mikrobiyolojik olarak doğrulanmamış akut vajinal kandidiyaz epizodlarında tekrarlayan kısa süreli flukonazol kullanımı ve kronik tekrarlayan vulvovajinal kandidiyaz hastalarında uygulanan uzun süreli profilaktik tedaviler, *C. albicans* suşlarında flukonazol direncinin gelişmesine zemin hazırlamaktadır(13).

Esfahani ve ark.(59)'nın çalışmasında, vulvovajinal kandidiyaz etkenlerinin %59,4'ünü *C. albicans*'ın oluşturduğu, bu izolatların flukonazole karşı %69,8'inin duyarlı, %12,7'sinin dirençli ve %17,5'inin doza bağlı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, non-albicans *Candida* türlerinin %40,6 oranında saptanmasına ve flukonazol direnç profilinin yüksek olmasına dikkat çekerek, klinik yönetimde duyarlılık testleri ve tür tanımının yapılmasının önemini vurgulamışlardır.

Kumar ve ark.(60)'nın Hindistan'da yaptığı bir çalışmada vajinal kültürlerde %78 oranında predominansı ve flukonazole %51'lik direnç oranı ile *C. albicans* izolatlarında azol direncinin arttığına dikkat çekilmektedir.

Zhang ve ark.(61)'nin çalışmasında, vajinal kültürlerden izole ettikleri *Candida*'ların tür dağılımı, flukonazol duyarlılık profilleri ve flukonazol direncinin mekanizmaları araştırılmıştır. İzole edilen 529 *C. albicans* için flukonazol duyarlılık testi CLSI M27-A2 klavuzuna göre uygulanmış ve değerlendirme için türe özgü olmayan klinik sınır değerleri kullanılmıştır. Duyarlılık profili her ne kadar diğer çalışmalardan daha yüksek olsa da (%88,3 duyarlı, %7 SDD, %4,7dirençli) direnç oranlarında artış olduğu belirtilmektedir.

Amerika Birleşik Devleti'nde yıllık yaklaşık 1000 hastanın vajinal kültürünün incelendiği bir üniversite hastanesinde; 10 yıllık süreçte %20 oranında *Candida* izole edilmiştir. *Candida* izolatları arasında 1.578'i (%76,3) *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. Klinisyenin isteği üzerine 193 (%12,2) *C. albicans* izolatına SMD duyarlılık testi pH 7.0 ve pH 4.5 ortamında uygulanmış olup, değerlendirme için CLSI-M27-Ed4 klavuzu kullanılmıştır. Flukonazol direnci pH 7.0'de 44 (%23) izolatta gözlenirken, 40 izolat (%21) SDD, 109 (%56) izolat duyarlı olarak belirlenmiştir, pH 4.5' ta ise *C. albicans* izolatlarının %52' sinde direnç saptanmıştır. Çalışmada yıllara göre flukonazolün direnç oranları incelendiğinde 2021 yılında dramatik bir artış olduğu dikkat çekmektedir(62).

Çalışmamızda vajinit ön tanısıyla laboratuvara gönderilen 763 vajinal sürüntü örneğinin değerlendirilmesinde, %52,8 (n=403) oranında *Candida* türleri tespit edilmiştir. Bu izolatların %76' sı (n=307) *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. Rutin laboratuvarda antifungal duyarlılık testleri uygulanan 277 *C. albicans* izolatının %28,1'inde (n=78) azollere karşı azalmış duyarlılık saptanmıştır. Bunların %18 'i

(n=50) dirençli ve %10,1'i (n=28) doza bağlı duyarlı olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, örnek kapasitesi yüksek olan iki hastaneyi içeren bölgemizdeki VVK olgularında en sık etkenin *C. albicans* olduğunu ve izolatlarda azol grubu antifungallere karşı duyarlılıkta dikkat çekici oranda azalma olduğunu göstermiş ve literatürlerle uyumlu bulunmuştur. Sonuçlarımız tedaviye yanıtızsız ve tekrarlayan VVK olgularında antifungal duyarlılık testlerinin mutlaka yapılması gerekliliğini desteklemektedir.

VVK olgularında antifungal duyarlılık testlerinin yapılması klinik yönetimde önem taşımaktadır(63). Rutin laboratuvarlarda kullanılacak duyarlılık test yöntemlerinin seçiminde, yöntemin kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir, maliyet-etkin olması ve doğru sonuç vermesi gibi özellikler göz önünde bulundurulmaktadır. CLSI tarafından geliştirilen SMD yöntemi referans yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, karmaşık yapısı, zaman alıcı olması ve yüksek maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlarda yaygın kullanılamamaktadır. Bu nedenle, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha pratik olan agar gradient difüzyon testi ve otomatize sistemler gibi yöntemler tercih edilmektedir. Ancak, bu yöntemler kullanılırken de laboratuvarlar arası değişkenlik görülebildiği bildirilmiştir(44). Yöntemlerin performanslarının incelendiği mevcut literatürlerde ağırlıklı olarak duyarlı izolatlar ele alınmış olup, dirençli izolatlar ile yapılmış çalışmaların az sayıda olması önemli bir sınırlılıktır.

Posteraro ve ark.(64) *C. albicans* (n:36) ve *C. glabrata* (n:86) klinik izolatları ile yaptıkları çalışmalarında Vitek2 sistemi ve 48 saatlik SMD sonuçlarını karşılaştırmış, yöntemler arasında flukonazol için %97,5, vorikonazol için %98,3 oranında esansiyel uyum saptamıştır. Çalışmada kategorik uyumun hesaplanmasında türe özgü olmayan klinik sınır değerleri (flukonazol için duyarlı, ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$; SDD, 16-32 $\mu\text{g/ml}$; dirençli, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ ve vorikonazol için duyarlı, ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$; SDD, 2 $\mu\text{g/ml}$; dirençli, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) kullanılmış ve her iki azol için genel kategorik uyum %97,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çok büyük veya büyük hata saptanmamış ve %5 oranında küçük hata bildirilmiştir.

Pfaller ve ark.198 *C. albicans*' ı içeren 426 izolat ile yaptıkları iki çalışmada; türe özgü sınır değerlerin bulunmadığı CLSI M27A2 klavuzunu kullanarak Vitek2

sistemini SMD testinin 24 ve 48 saatlik MİK sonuçları ile karşılaştırmışlardır (65,66). *C. albicans* izolatlarında Vitek2 sisteminin vorikonazol için SMD 24 ve 48. saatteki MİK sonuçları ile arasında; sırasıyla %98 ve %97 oranında esansiyel uyum (EU); %99 ve %98,5 oranında kategorik uyum (KU) olduğu belirtilmiştir(65). Aynı izolatlar kullanılarak yapılan bir diğer çalışmalarında flukonazol için Vitek2 sistemini SMD testinin 24 ve 48. saat sonuçları ile karşılaştırmış ve sırasıyla %97 ve %96,5 oranında EU, %99,5 ve %99 oranında KU olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında dirençli *C. albicans* izolat oranının oldukça düşük (%1,5) olduğu görülmüştür(66).

Cuenca-Estrella ve ark.(67) 2010 yılında yaptıkları çalışmada 41 *C.albicans*, 18 *Cryptococcus neoformans*, üç *Rhodotorula* spp. olmak üzere *Candida* ve maya türlerini içeren 154 klinik izolatta flukonazol ve vorikonazol duyarlılığını standart SMD ve yaygın kullanılan ticari yöntemlerle değerlendirmiştir. *Candida* izolatlarında Vitek2 yöntemi için %97 EA belirlenirken, %1,3 oranında çok büyük hata tespit edilmiştir.

Pfaller ve ark.(68); türlere özgü klinik sınır değerlerin belirlendiği yeni CLSI klavuzunu kullanarak Vitek2 sisteminin revize edilen yeni kartlarını 215 *C. albicans* (%2,3 dirençli) izolatında değerlendirmiştir. Flukonazol için yeni duyarlılık kategorileri (≤ 2 µg/ml: S; 4 µg/ml: SDD; ≥ 8 µg/ml: R) kullanılarak Vitek2 sisteminin SMD ile karşılaştırmasında; %95 EU, %94,9 KU, %2,3 BH saptanmış, ÇBH saptanmamıştır.

Lee ve ark.(69) 11 *Candida* türü için altı farklı antifungal ajanın SMD ve Vitek2 sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmada; 24 *C. albicans* izolatında (üçü flukonazole, biri vorikonazole dirençli) SMD ile Vitek2 arasında flukonazol için %79,2, vorikonazol için %91,7 kategorik uyum belirlenmiştir. Flukonazolde %12,5, vorikonazolde %4,2 oranında çok büyük hata tespit edilmiştir. Çalışmada *C. tropicalis* için %66,7 KU, %76,2 EU; *C. parapsilosis* için %84,2 KU, %89,5 EU saptanmıştır. Değerlendirmede CLSIM60 sınır değerleri kullanılmış ve Vitek2'nin flukonazol MİK sonuçlarının SMD'ye göre daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Diğer yandan, Lim ve ark.(70) altısı dirençli olmak üzere 26 *C. albicans* içeren 292 *Candida* izolatında Vitek2 ve SMD' nin %92,4 kategorik uyum, %96,2 esansiyel uyum, %3,8 çok büyük hata olduğunu belirlemiştir.

Başka bir çalışmada ise diğer literatürlerin tersine SMD yöntemiyle duyarlı olarak belirlenen 16 *C. albicans* izolatının, Vitek2 sistemiyle altısı dirençli, altısı SDD olarak belirlenmiştir. Vitek2 sisteminde %87,5 KU, %6,25 büyük hata ve %6,25 küçük hata belirlenmiştir. Vorikonazol için %100 KU olduğu ve hata saptanmadığı bildirilmiştir(71).

Bourgeois ve ark.(72) Vitek2 ile SMD testini karşılaştırdığı çalışmasında, *C. albicans* gibi duyarlı izolatlarda katagorik ve esansiyel uyumun yüksek bulunduğu, ancak *C. glabrata* gibi flukonazol duyarlılığı azalmış türler için kategorik uyumun daha düşük olduğu belirtilmiş ve bu izolatlarda in vivo/in vitro korelasyon çalışmalarının yapılması önerilmiştir.

Çalışmamızda Vitek2 sistemi için flukonazol ve vorikonazol antifungallerinde SMD ile düşük kategorik uyum ve yüksek hata oranları saptanmıştır. Flukonazol için Vitek2'nin SMD testinin 24. saat sonuçlarıyla %100 esansiyel uyum ve %48,52 kategorik uyum gösterdiği, ancak 48. saat sonuçlarına göre esansiyel uyumun %94,1; kategorik uyumun ise %52,94 olduğu görülmüştür. Vitek2 sisteminde flukonazol için SMD 24. saatinde %12, 48. saatte %13,95 oranında çok büyük hata saptanmıştır. Vorikonazol için ise esansiyel uyumun 24. saatte %97; 48. saatte %92,6 olduğu; kategorik uyumun ise sırasıyla %48,52 ve %73,52 olduğu görülmüştür.

Çalışma sonuçlarımızın literatürlerdeki çalışmalarla karşılaştırılmasında, Vitek2 sisteminde esansiyel uyum oranlarının benzer olmasına rağmen kategorik uyum oranlarının düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun nedenleri arasında; çalışmamızdaki test popülasyonunun tümünün azollere duyarlılığı azalmış izolatlardan oluşması ve güncel CLSI M44S kılavuzunda belirtilen türe özgü ve daha düşük klinik sınır değerlerinin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Vitek2 gibi hızlı ve kullanımı kolay yöntemler, özellikle klinik uygulamalarda zamandan tasarruf sağlamaktadır. Çalışmamızdaki bulgular Vitek2 sisteminin performansının özellikle azol dirençli veya azalmış duyarlılığa sahip izolatlarda daha geniş ölçekte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Vajinal kültürlerden izole

edilen *C. albicans* örneklerinde artan direnç oranları dikkate alınarak, tekrarlayan azol maruziyeti nedeniyle direnç gelişme ihtimalinin arttığı kritik hasta gruplarında standart SMD testlerinin çalışılması faydalı olacaktır.

Rutin laboratuvarlarda referans SMD testlerine alternatif olarak kullanılan diğer bir yöntem agar gradient difüzyon testleridir. Yöntemde MİK değeri; agar yüzeyinde oluşan elipsin ölçüğü kestiği nokta görsel olarak olarak belirlenir. Test edilen suşa ve antifungale bağlı olarak agarda farklı büyüme paternleri (makrokoloniler veya mikrokoloniler) görülebileceğinden, MİK'lerin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için okuma kılavuzları ve eğitim gereklidir. Ayrıca inkübasyon süresi ve kullanılan besiyeri (RPMI-1640 glukozlu agar ve metilen mavili %2 glikoz içeren mueller hinton agar) sonuçları etkileyebilmektedir(45,73). Yöntemde özellikle *C. albicans* ve *C. tropicalis* gibi türlerde mikrokoloni oluşumunun inhibitör zon sınırlarının belirsizleşmesine yol açarak MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değerlerinin doğru belirlenmesini zorlaştırdığı gösterilmiştir(74). Çoğu çalışmada referans yöntem ile arasında esansiyel uyumun iyi olduğu gösterilmiştir (45,73).

Türe özgü olmayan sınır değerlerin kullanıldığı iki çalışmada; Kumar ve ark. (75) 46 *Candida* izolatında SMD yöntemi ile agar gradient difüzyon testi arasında flukonazol ve vorikonazol için %100 kategorik uyum saptarken; Matar ve ark.(76) duyarlı izolatlarda iki yöntem arasında yüksek uyum saptanmış ancak, 29 flukonazol dirençli izolatın 24. saatte 13' ünü, 48. saatte 19' unu saptayabildiği gösterilmiştir. Çalışmada %2,3 oranında ÇBH olduğu ve agar gradient testin 48. saat sonuçlarının SMD ile daha iyi uyum gösterdiğini belirtmiştir.

Cretella ve ark.(77)'nın türe özgü MİK sınır değerleri kullanılarak 74 *Candida* izolatı ile yaptıkları çalışmada, agar gradient difüzyon testinde *C. albicans* izolatlarında flukonazol için kategorik uyum %80, esansiyel uyum ise %60 olarak saptanmıştır. Çalışmalarında E-test yönteminde SMD sonuçlarına göre daha yüksek flukonazol MİK değerleri elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak bizim çalışmamızda da referans yöntemle kıyasla agar gradient yönteminde daha yüksek MİK sonuçları saptanmıştır.

Çalışmamızda agar gradient test ile flukonazol ve vorikonazol için SMD' nin 24. ve 48. saat sonuçlarıyla >90' ın üzerinde esansiyel uyum görülmüştür. Kategorik uyum oranları ise 24. ve 48. saat SMD sonuçlarına göre sırasıyla flukonazol için % 52,94 ve %76,47; vorikonazol için %47,05 ve %83,82 olarak belirlenmiştir. SMD yöntemiyle karşılaştırıldığında flukonazol için %10 oranında büyük hata (BH) ve SMD 48. saat sonucuna göre %2,32 oranında ÇBH saptanmıştır. Vorikonazol için ise 24. saat sonuçlarına göre BH oranı %18,18 olarak kaydedilmiş ancak 48. saat sonuçlarında BH veya ÇBH saptanmamıştır. Agar gradient difüzyon ile alınan sonuçların SMD testinin 48. saat sonuçlarıyla daha uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmamızda BH (%10) oranının yüksek olması agar gradient difüzyon ile standart yöntemle kıyasla daha yüksek MİK değerleri saptandığını desteklemektedir. Agar gradient difüzyon yönteminde inhibisyon zonunun sınırlarının belirlenmesindeki güçlükler, sonuçların yorumlanmasına etki etmektedir. Özellikle azol grubu antifungallerde görülen kısmi inhibisyon zonları ve bulanık zon sınırları, MİK değerlerinin doğru belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, agar gradient difüzyon testinin deneyimli personel tarafından değerlendirilmesi, şüpheli durumlarda testin tekrar edilmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda SMD 24. ve 48. saat sonuçlarına göre izolatların >%60' ı klinik sınır değerleri olan 4µg/ml (SDD) ve 8µg/ml (R) değerlerinde bulunmaktadır. Çalışmada incelenen her iki ticari yöntemde de esansiyel uyumun yüksek bulunması MİK değerlerinin genel olarak birbirine yakın saptandığını göstermektedir. Ancak kategorik uyumun düşük olmasının nedenlerinden biri olarak, izolatlarımızın sınır değerlerde kümelenmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Rutin laboratuvarlarda sınır değerlerinde MİK saptanan izolatların tekrar test edilmesi ve alternatif yöntemlerle doğrulanması antifungal tedavi başarısına katkı sağlayabilir.

Azollere dirençli *C. albicans* ile oluşan enfeksiyonlar tedavi başarısızlıklarına yol açarak klinik yönetimde zorluklara neden olmaktadır(78). Bu bağlamda, direnç mekanizmalarını anlamak, hem tanı ve tedavide daha etkili stratejilerin geliştirilebilmesi hem de yeni antifungal ilaçların tasarımı için kritik öneme sahiptir.

C. albicans'ta antifungal direnç gelişiminde iki temel mekanizma öne çıkmaktadır (79). Literatürde R ve SDD *C. albicans* izolatlarında dirençten sorumlu

tutulan en sık moleküler mekanizmanın (%85) efluks pompalarının aşırı ekspresyonu olduğu, ikinci sıklıkta ise ERG11 genindeki değişikliklerin sorumlu tutulduğu belirtilmiştir(80). MDR1 geninin ekspresyon artışı özellikle flukonazole karşı spesifik direnç ile ilişkiliyken, CDR1 ve CDR2 genlerinin aşırı ekspresyonu daha geniş antifungal direnç spektrumu oluşturmaktadır. Bu iki ABC taşıyıcı geni, flukonazolün yanı sıra ketokonazol ve itraconazol gibi diğer azol grubu antifungallere karşı direncin gelişiminde rol oynamaktadır. Ayrıca, CDR1 ve CDR2 genlerinin ekspresyon artışı, azol grubu dışında kalan terbinafin ve amorolfın gibi farklı yapıdaki antifungal ajanlara karşı da direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır(81).

Rad ve ark.(16) vajinal kültürden izole ettikleri 40 *C. albicans* izolatının disk difüzyon yöntemiyle flukonazol dirençli olduğunu tespit etmiş ve direncin moleküler analizinde; %87,5 CDR-2 geninde, %80 MDR-1 geninde ekspresyon artışı saptamış, %75'inde ise her iki genin eş zamanlı ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir. *C. albicans*'ta flukonazol direncinin gelişiminde CDR genlerinin rolünün MDR-1'den daha belirgin olduğu ve bu durumun tedavi başarısızlığına yol açabileceğini belirtmiştir.

Zhang ve ark(61),VVK hastalarından elde ettikleri flukonazole dirençli *Candida* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada, CDR1 gen ekspresyonunun diğer direnç genlerine (CDR2, MDR1 ve FLU1) kıyasla belirgin şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir.

Cernicka ve ark.(82) vajinal *C. albicans* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada, 22 flukonazol dirençli izolatta çoklu direnç mekanizmalarının birlikte rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında tüm izolatlarda MDR1 geninin aşırı ekspresyonu saptanırken; bazı izolatlarda ayrıca CDR1/CDR2 ve ERG11 genlerinde de ekspresyon artışı belirlenmiştir.

Golabek ve ark.(53) flukonazole duyarlı ve dirençli 60' ar *C. albicans* izolatı ile yaptıkları çalışmada, CDR2, MDR1 ve ERG11 genlerinin ekspresyon seviyeleri açısından duyarlı ve dirençli grup arasında anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiş, ancak CDR1 geninde bu tür bir fark bulunamamıştır.

Mane ve ark.(83) 87 *C. albicans* izolatında yaptıkları çalışmada; CDR1 eflüks pompasının aşırı ekspresyonunun dirençli izolatlarda baskın direnç mekanizması (%77,7) olduğu saptanmıştır. CDR2 geninin yalnızca CDR1 ile birlikte eksprese edildiği ve bunların eşzamanlı aşırı ekspresyonunun azol çapraz direnci ile güçlü bir ilişki gösterdiği saptanmıştır. ERG11 aşırı ekspresyonu az sayıda dirençli izolatta (%11) gözlenmiştir.

Bhattacharya ve ark.(84) çalışmasında, 38 vajinal *C. albicans* izolatı incelenmiş ve 22 izolatın flukonazole, 18 izolatın klotrimazole ve 3 izolatın itraconazole dirençli olduğu saptanmıştır. Direncin moleküler analizinde; flukonazole dirençli izolatların %72' sinde eflüks pompa genlerinin (CDR1, CDR2, MDR1) ve ERG11 geninin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Özellikle 12 izolatta CDR1, 10 izolatta CDR2, 11 izolatta MDR1 ve 14 izolatta ERG11 genlerinin aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, vajinal *C. albicans* izolatlarında azol direncinin temel mekanizmasının eflüks pompa genlerinin aşırı ekspresyonu olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda 32 flukonazole dirençli, altı flukonazole doza bağlı duyarlı izolatın %47'sinde CDR1 geninde aşırı ekspresyon gözlenirken, bunu %34 MDR1 geni, %21 ERG11 geni ve %13 CDR2 geninin ekspresyonu takip etmiştir. Flukonazol MİK değeri >8 µg/ml olan 17 izolatın %70,5'inde CDR1 geninin ekspresyonunda artış olduğu gözlenirken, flukonazol MİK değeri ≤ 8 µg/ml olan 21 izolatın %28,5'inde CDR1 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Flukonazol direncinin önemli bir mekanizması olan CDR1 geninin aşırı ekspresyonu, dirençli izolatlarda baskın olarak saptamamız önceki çalışmalarla uyumlu olarak gözlenmiştir(61,80,83). Toplam 12 izolatta ERG11, CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinden herhangi birinde ekspresyon düzeylerinin artmadığı belirlenmiştir. Bu izolatlarda direnç mekanizmasının gelişiminde başka mekanizmaların rol oynayabileceği düşünüldü. Bu izolatlarda direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılabilmesi için transkriptomik ve metagenomik araştırmaların ve ileri moleküler tekniklerin kullanılması gerekmektedir.

C. albicans'ta azol direncinin gelişiminde kompleks ve çoklu mekanizmalar rol oynayabilmektedir. Park ve ark.(79)'nın çalışmasında ERG11 hedef bölge

mutasyonlarının (Y132F, T229A, S405F, G464S, v.b) dirençte rol oynadığı gösterilmiştir. İzolatlardaki yüksek flukonazol MİK değerleri efluks pompa aktivitesinden bağımsız olarak, azollerin hedef enzime bağlanmasını etkileyen mutasyonların varlığına işaret edebilmektedir(79). Bu hipotezin, gelecek çalışmalarda ERG11 sekans analizleri ile doğrulanması gerekmektedir. Yüksek MİK değerlerine sahip izolatlarda direnç mekanizmalarının ERG11, CDR1, CDR2 ve MDR1 genleriyle ilişkilendirilemediği durumlarda ERG11 hedef bölge mutasyonlarının ve diğer direnç mekanizmalarının araştırılması önemlidir.

Direnci yönetmek için etkili stratejiler geliştirilmesi ve yeni antifungal ilaçların hedefe yönelik moleküler yaklaşımlarla rasyonel bir şekilde tasarlanabilmesi açısından, direncin moleküler düzeyde anlaşılması büyük önem taşımaktadır(85). Örneğin, flukonazol dirençli izolatlarda; en sık etkili mekanizma olan efluks pompalarına karşı inhibitörlerin geliştirilmesi (16) ya da qPCR tabanlı testlerle efluks pompa genlerinin ekspresyon seviyelerini erken tespit eden yöntemlerin geliştirilmesiyle erken teşhis ve doğru antifungal tedavi seçimine olanak sağlanabilir (84).

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda vajinal örneklerde *C. albicans* izolatlarında gözlenen azollere yüksek direnç oranı dikkat çekici bulunmuştur.

Rutin laboratuvarlarda kullandığımız her iki ticari yöntemde esansiyel uyumun yüksek bulunması MİK değerlerinin genel olarak birbirine yakın saptandığını göstermektedir. Kategorik uyumun düşük olmasının sebepleri arasında izolatlarımızın çoğunluğunun sınır değerlerde kümelenmiş olmasından kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Vitek2 sisteminin SMD ve agar gradient difüzyon testine kıyasla pratik ve hızlı olması, örnek sayısının fazla olduğu laboratuvarlarda yüksek test hacmine sahip olması, spektrofotometrik değerlendirme yapılarak yorumlama sürecinde öznel hataları ortadan kaldırması rutin laboratuvarlarda avantaj sağlamaktadır. Ancak literatürlerde yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu duyarlı izolatlar ile yapılmış olup; azol grubu antifungallere yönelik performansının, güncel klinik sınır değerler kullanılarak ve izolatların direnç profilleri göz önünde bulundurularak daha yüksek sayıda dirençli/doza bağlı duyarlı izolatlarla ve çok merkezli çalışmalarla değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

E-test yönteminde inhibisyon zonunun sınırlarının belirlenmesindeki güçlükler, sonuçların yorumlanmasında önemli bir değişkenlik kaynağıdır. Özellikle azol grubu antifungallerde görülen kısmi inhibisyon zonları ve bulanık zon sınırları, MİK değerlerinin doğru belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, E-test değerlendirmesinin deneyimli personel tarafından yapılması ve şüpheli durumlarda testlerin tekrarlanması önem taşımaktadır.

İncelenen 42 *C. albicans* izolatının gen ekspresyon analizleri sonucunda, dirençli izolatların %75'inde en az bir direnç geninin ekspresyonu belirlenmiş olup, 18 izolatta CDR1 geninde, 13 izolatta MDR1 geninde, sekiz izolatta ERG11 geninde ve beş izolatta CDR2 geninde ekspresyon artışı saptanmıştır.

Flukonazol MİK değeri >8 $\mu\text{g/ml}$ olan 17 izolatın %70,5'inde CDR1 geninin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Flukonazole karşı yüksek MİK değerlerine sahip *C.*

albicans izolatlarında CDR1 aşırı ekspresyonunun dirençten sorumlu ana mekanizma olduğu düşünülmüştür.

Çalışmada toplam 12 izolatta herhangi bir gen ekspresyonu saptanmamıştır. Yüksek MİK değerlerine sahip olup, incelenen genlerde ekspresyon artışı göstermeyen izolatlarda alternatif direnç mekanizmalarının araştırılması gerektiği düşünüldü.

Bu bulgular, *C. albicans*'ta azollere karşı direnç gelişiminin kompleks ve çoklu mekanizmalara dayalı olabileceğini göstermektedir. Antifungal tedavinin etkin yönetimi için, izolatların düzenli olarak antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesi ve direnç mekanizmalarının moleküler düzeyde araştırılması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol gösterecektir.

KAYNAKÇA

1. Nyirjesy, P., Brookhart, C., Lazenby, G., Schwebke, J., & Sobel, J. D. (2022). Vulvovaginal candidiasis: a review of the evidence for the 2021 centers for disease control and prevention of sexually transmitted infections treatment guidelines. *Clinical Infectious Diseases*, 74(Supplement_2), S162-S168.
2. Kauffman CA, PPG, SJD, & DWE. *Essentials of Clinical Mycology*. 2nd ed. New York, NY: Springer New York; 2011. 167–186 p.
3. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Vol. 214, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2016. p. 15–21.
4. Felix, T. C., de Brito Röder, D. V. D., & dos Santos Pedroso, R. (2019). Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. *Folia microbiologica*, 64, 133-141.
5. Ilkit, M., & Guzel, A. B. (2011). The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 250-261.
6. Workowski, K. A. (2021). Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *MMWR. Recommendations and Reports*, 70.
7. Mendling, W. (2015). Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses*, 58, 1-15.candidosis).
8. Nyirjesy P, Clinics JSO and G, 2003 undefined. Vulvovaginal candidiasis.
9. Aniebue, U. U., Nwankwo, T. O., & Nwafor, M. I. (2018). Vulvovaginal Candidiasis in Reproductive Age Women in Enugu Nigeria, Clinical versus Laboratory-assisted Diagnosis. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(8), 1017-1022.
10. Schwebke JR, Gaydos CA, Nyirjesy P, Paradis S, Kodsı S, Cooper CK. Diagnostic performance of a molecular test versus clinician assessment of vaginitis. *J Clin Microbiol*. 2018 Jun 1;56(6).

11. Jafarzadeh, L., et al. (2022). Vulvovaginal candidiasis: An overview of mycological, clinical, and immunological aspects. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 48(7), 1546-1560.
12. Wiesenfeld H, gynecology IMA journal of obstetrics and, 1999 undefined. The infrequent use of office-based diagnostic tests for vaginitis. Elsevier.
13. Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K. S., & Sobel, J. D. (2012). Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics & Gynecology*, 120(6), 1407-1414.
14. Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M., & Bille, J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(11), 2378-2386.
15. Sobel, J. D., & Sobel, R. (2018). Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 19(9), 971-977.
16. Khosravi Rad K, Falahati M, Roudbary M, Farahyar S, Nami S. Overexpression of MDR-1 and CDR-2 genes in fluconazole resistance of *Candida albicans* isolated from patients with vulvovaginal candidiasis. *Curr Med Mycol*. 2016 Dec 1;2(4):24–9.
17. Farr, A., et. al. (2021). Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*, 64(6), 583-602.
18. White, T. C., Marr, K. A., & Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 382-402.
19. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Vol. 2. Churchill Livingstone: Philadelphia; 2010. 3225–3241 p.

20. Yücel A. *Candida*'ların dünü. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir; 2002. 3–28 p.
21. Segan E. Candidiasis. In: Merz W, Hay R. Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. 10th edn. London: Hodder Arnold. 2005. 579–623 p.
22. Edwards Jr JE. *Candida* species. Principles and practice of infectious diseases. cir.nii.ac.jp. 1996. 2289–2306 p.
23. Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. American Society for Microbiology Press. 2002;3–13.
24. Versalovic, J. (Ed.). (2011). Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology Press. 1793–1821 p.
25. Ayşe Willke Topcu, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay. Mantar enfeksiyonları. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4th ed. Nilgül Çerikçioğlu, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2017. 2115–2119 p.
26. Çerikçioğlu N. *Candida* 'ların İnce Yapısı. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını; 2002. 47–55 p.
27. Tümbay E. *Candida* türleri. In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş., editor. Ankara : Güneş Kitabevi; 1999. 1081–1086 p.
28. Walsh TH, HRT, & LDH. Larone'un tıbbi önemli olan mantarları [Larone's Medically Important Fungi]. Hipokrat Yayınevi. Ş. T. Yıldırım & R. Gümral Çev, editor. Ankara; 2020. 123–166 p.
29. Koehler P., et. al. (2019). Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. Clinical microbiology and infection, 25(10), 1200-1212.
30. Organization WH. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022;

31. Zuza-Alves DL, de Medeiros SSTQ, de Souza LBFC, Silva-Rocha WP, Francisco EC, de Araújo MCB, et al. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of northeast Brazil. *Front Microbiol.* 2016 Nov 15;7(NOV).
32. Procop G, Church D, Hall G, Janda W. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 2020;
33. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voon Schimmelcultures/ Universtat Rovirai Virgili, Netherlands; 2000. 178–300 p.
34. Richardson, M., & Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical microbiology and infection*, 14, 5-24.
35. Yeşilkaya, A., Azap, Ö., Aydın, M., & Akçıl Ok, M. (2017). Epidemiology, species distribution, clinical characteristics and mortality of candidaemia in a tertiary care university hospital in Turkey, 2007-2014. *Mycoses*, 60(7), 433-439.
36. Korkmaz, P., MISTANOĞLU ÖZATAĞ, D., Yalin, Ş., Gülcan, A., & Aslan, H. (2021). Evaluation of epidemiological features, risk factors and clinical course in candidemia. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 78(4), 517-524.
37. Chen, L., Xie, Z., & Jian, J. (2024). Epidemiology and Risk Factors of Candidemia a 8-Year Retrospective Study from a Teaching Hospital in China. *Infection and Drug Resistance*, 3415-3423. 17.
38. Colombo, A. et. al. (2014). Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive care medicine*, 40, 1489-1498.

39. McKeating C., et al. (2018). Diagnostic accuracy of fungal PCR and β -d-glucan for detection of candidaemia: a preliminary evaluation. *Journal of clinical pathology*, 71(5), 420-424.
40. Murray PR, RKS, & PMA. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 7th ed. Us DB, editor. Ankara; 2016. 631–641 p.
41. Czajka, K. M., et. al. (2023). Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells*, 12(22), 2655.
42. Winkler, M. L., Rhomberg, P., Klauer, A. L., Edeker, S., & Castanheira, M. (2024). The In Vitro Activity of Rezafungin Against Uncommon Species of *Candida*. *Mycoses*, 67(11), e70001.
43. E.Tümbay. ‘Antifungal Duyarlılık Testleri’ In *Tıbbi Mikoloji* . Sevtap Arıkan-Akdağlı, editor. İzmir; 2021. 599–607 p.
44. Otto, W. R., Arendrup, M. C., & Fisher, B. T. (2023). A practical guide to antifungal susceptibility testing. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 12(4), 214-221.
45. Berkow, E. L., Lockhart, S. R., & Ostrosky-Zeichner, L. (2020). Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 10-1128.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI supplement M27M44S.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-3rd edition, M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
48. Guidance for Industry and FDA Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems.
49. Roth, R., Madhani, H. D., & Garcia, J. F. (2018). Total RNA isolation and quantification of specific RNAs in fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*: Methods and Protocols, 63-72.

50. Morais Vasconcelos Oliveira, J., et. al. (2021). Detection of ERG11 Overexpression in *Candida albicans* isolates from environmental sources and clinical isolates treated with inhibitory and subinhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses*, 64(2), 220-227.
51. Chen, L. M., et. al. (2010). Overexpression of CDR1 and CDR2 genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *Journal of International Medical Research*, 38(2), 536-545. Vol. 38, The Journal of International Medical Research.
52. Frade, J. P., Warnock, D. W., & Arthington-Skaggs, B. A. (2004). Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 2085-2093.
53. Gołębek, K., Strzelczyk, J., Owczarek, A., Cuber, P., Ślemp-Migiel, A., & Wiczowski, A. (2015). Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *Acta Biochimica Polonica*, 62(2), 247-251.
54. Ying, C., Zhang, H., Tang, Z., Chen, H., Gao, J., & Yue, C. (2015). Antifungal susceptibility and molecular typing of 115 *Candida albicans* isolates obtained from vulvovaginal candidiasis patients in 3 Shanghai maternity hospitals. *Sabouraudia*, 54(4), 394-399.
55. Shi, X. Y., Yang, Y. P., Zhang, Y., Li, W., Wang, J. D., Huang, W. M., & Fan, Y. M. (2015). Molecular identification and antifungal susceptibility of 186 *Candida* isolates from vulvovaginal candidiasis in southern China. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 390-393.
56. Odoj, K., et. al.(2024). Tracking Candidemia Trends and Antifungal Resistance Patterns across Europe: An In-Depth Analysis of Surveillance Systems and Surveillance Studies. *Journal of Fungi*, 10(10), 685.
57. Ying, Y., Zhang, J., Huang, S. B., Liu, F. D., Liu, J. H., Hu, X. F., ... & Huang, X. T. (2015). Fluconazole susceptibility of 3,056 clinical isolates of *Candida* species from 2005 to 2009 in a tertiary-care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(3), 413-415.

58. Agrawal, P., et. al. (2023). Vaginal *Candida albicans*: High Frequency of in Vitro Fluconazole Resistance in a Select Population—A Brief Note. Sexually transmitted diseases, 50(2), 121-123.
59. Esfahani, A., et. al. (2022). Molecular epidemiology, antifungal susceptibility, and ERG11 gene mutation of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis: Comparison between recurrent and non-recurrent infections. Microbial Pathogenesis, 170, 105696.
60. Kumar, A., et. al. (2020). Assessment of antifungal resistance and associated molecular mechanism in *Candida albicans* isolates from different cohorts of patients in North Indian state of Haryana. Folia Microbiologica, 65, 747-754.
61. Zhang, J. Y., et. al. (2014). Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. Mycoses, 57(10), 584-591.
62. Sobel, J. D. (2023). Resistance to fluconazole of *Candida albicans* in vaginal isolates: A 10-year study in a clinical referral center. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 67(5), e00181-23.
63. Sobel, J. D., & Akins, R. (2022). Determining susceptibility in *Candida* vaginal isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, 66(6), e02366-21.
64. Posteraro, B., et. al. (2009). Reliability of the Vitek 2 yeast susceptibility test for detection of in vitro resistance to fluconazole and voriconazole in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Journal of clinical microbiology, 47(6), 1927-1930.
65. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., & Rinaldi, M. G. (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. Journal of clinical microbiology, 45(11), 3522-3528.
66. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., & Rinaldi, M. G. (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI

- broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. Journal of clinical microbiology, 45(3), 796-802.
67. Cuenca-Estrella, M., et. al. (2010). Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. Journal of clinical microbiology, 48(5), 1782-1786.
 68. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Procop, G. W., & Wiederhold, N. P. (2014). Multicenter evaluation of the new Vitek 2 yeast susceptibility test using new CLSI clinical breakpoints for fluconazole. Journal of clinical microbiology, 52(6), 2126-2130.
 69. Lee, H., et. al. (2022). Comparison of six antifungal susceptibilities of 11 *Candida* species using the VITEK2 AST–YS08 card and broth microdilution method. Microbiology spectrum, 10(2), e01253-21.
 70. Lim, H. J., et. al.(2020). Evaluation of two commercial broth microdilution methods using different interpretive criteria for the detection of molecular mechanisms of acquired azole and echinocandin resistance in four common *Candida* species. Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(11), 10-1128.
 71. Siqueira, R. A., et. al. (2018). Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek 2® and Sensititre YeastOne®. Revista iberoamericana de micologia, 35(2), 83-87.
 72. Bourgeois, N.,et. al. (2010). Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. Journal of clinical microbiology, 48(1), 154-161.
 73. Durand, C., Maubon, D., Cornet, M., Wang, Y., Aldebert, D., & Garnaud, C. (2021). Can we improve antifungal susceptibility testing?. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 720609.

74. Hauzer M., et al. (2019). The prevalence and clinical significance of microcolonies when tested according to contemporary interpretive breakpoints for fluconazole against *Candida* species using E-test. *Medical Mycology*, 57(6), 718-723.
75. KuMar, D., Bhattacharyya, S., Gupta, P., Banerjee, G., & Singh, M. (2015). Comparative analysis of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution for susceptibility testing of clinical *Candida* isolates against amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(11), DC01.
76. Matar, M. J., et. al. (2003). Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(5), 1647-1651.
77. Cretella, D., Barber, K. E., King, S. T., & Stover, K. R. (2016). Comparison of susceptibility patterns using commercially available susceptibility testing methods performed on prevalent *Candida* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 65(12), 1445-1451.
78. Nishimoto, A. T., Sharma, C., & Rogers, P. D. (2020). Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(2), 257-270.
79. Park, S., & Perlin, D. S. (2005). Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microbial drug resistance*, 11(3), 232-238. Vol. 11, MICROBIAL DRUG RESISTANCE.
80. Perea, S., et. al. (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(10), 2676-2684.
81. GÜLAT, S., & DERELİ, M. D. (2014). Flukonazole Dirençli *Candida albicans* İzolatlarında Atım Pompa Ekspresyonlarının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 48(2), 325-334.

82. Cernicka, J., & Subik, J. (2006). Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *International journal of antimicrobial agents*, 27(5), 403-408.
83. Mane, A., et. al. (2016). Molecular mechanisms associated with fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. *Mycoses*, 59(2), 93-100.
84. Bhattacharya S, Sobel JD, White TC. A combination fluorescence assay demonstrates increased efflux pump activity as a resistance mechanism inazole-resistant vaginal *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct 1;60(10):5858–66.
85. Goldman G. et al. (2004). Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 50(1), 25-32.