



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**KAN AKIMI ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ *CANDIDA*
TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Dr. Elif OĞUZMAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ebru EVREN YURTCU

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KAN AKIMI ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ *CANDIDA*
TÜRLERİNİN ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ

Dr. Elif OĞUZMAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ebru EVREN YURTCU

ANKARA
2024

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kan Akımı Enfeksiyonu ile İlişkili *Candida* Türlerinin Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 16.09.2021 tarihinde, İ8-539-21 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elif OĞUZMAN

Tarih: 26.07.2024

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Turnitin ***Orijinallik Raporu***

Kan Akımı Enfeksiyonu ile İlişkili Candida Türlerinin Antifungal Duyarlılıklarının Be
Elif OĞUZMAN tarafından tez (Tıpta Uzmanlık Tezi) den işleme konu



- İşleme konu: 26-Tem-2024 11:15 +03
- NUMARA: 2422667509
- Kelime Sayısı: 32946
- Gönderildi: 1

Benzerlik Endeksi

%7

Kaynağa göre Benzerlik

internet Kaynakları: %5

Yayınlar: %5

Öğrenci Ödevleri: %1

KABUL ONAY SAYFASI

Düzenleme tarihi: 06/08/2024

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Elif OĞUZMAN	Sınav tarihi: 06 / 08 / 2024
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Ebru EVREN YURTCU	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: : <i>Kan Akımı Enfeksiyonu İle İlişkili Candida Türlerinin Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.</i>	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu	ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

Jüri Üyesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ebru EVREN YURTCU

Jüri Üyesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Duygu ÖCAL

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimle ilgili çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, desteğini ve sabrını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ebru Evren Yurtçu'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, destek ve tecrübelerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Hem uzmanlık eğitimim hem de tezimi yaptığım süre boyunca benden yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen her konuda desteğini hissettiren meslek sevgisi ve bilgisi ile bana örnek olan Prof. Dr. Zeynep Ceren Karahan'a,

Birlikte çalışmaktan her zaman onur ve mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteği, sabrı ve sonsuz sevgileri ile hep yanımda olan, beni bu günlere getiren canım aileme,

Maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiren, her zaman yanımda olan değerli eşim Celalettin Rasim Oğuzman'a,

Sonsuz sevgileri ve gülüşleriyle bana güç veren minik kızlarım Defne ve İpek Oğuzman'a

Sonsuz teşekkürlerimle...

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2022-2502 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	ii
Kabul Onay Sayfası	iii
Önsöz	iv
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller Dizini	xii
Tablolar Dizini	xiii

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Tarihçe	7
4.2. Sınıflandırma	8
4.3. Morfolojik Özellikleri	9
4.4. Hücresel Özellikler	10
4.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri	12
4.5.1. Adezyon (Tutunma)	13
4.5.2. İnvazyon	13
4.5.3. Hidrolitik Enzimler	14
4.5.4. Biyofilm	16
4.5.5. Temas Algılama ve Thigmotropizm	16
4.5.6. Morfogenez, Dimorfizm	17
4.5.7. Fenotipik Değişim	17
4.6. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	17
4.7. Klinik Tablolar	19
4.8. Kandideminin Laboratuvar Tanısı	20
4.8.1. Kültür	20
4.8.2. <i>Candida</i> Türlerinin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri	21
4.8.3. Germ Tüp Oluşumunun İncelenmesi	21

4.8.4. Mısır Unlu Agarda Üreme Şekilleri	22
4.8.5. Kromojenik Agarlar	22
4.8.6. Asimilasyon ve Fermantasyon Testleri	22
4.8.7. Serolojik Yöntemler	23
4.8.7.1. Antijen Tespiti	23
4.8.7.2. Antikor Tespiti	23
4.8.8. Moleküler Yöntemler	24
4.9. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarında Tedavide Kullanılan Antifungal İlaçlar	25
4.9.1. Polienler	25
4.9.2. Pirimidinler: Flucytosine (5- fluorocytosine)	26
4.9.3. Azoller	27
4.9.4. Ekinokandinler	28
4.9.5. Alilaminler	28
4.10. Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)	29
4.10.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleri	30
4.10.1.1. Referans Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleri	30
4.10.1.2. Kolorimetrik Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	31
4.10.1.3. VITEK 2 Maya Antifungal Duyarlılık Paneli	32
4.10.2. Agar Bazlı Duyarlılık Testleri	33
4.10.2.1. Disk Difüzyon Testi (DDT)	33
4.10.2.2. Gradient Şerit Difüzyon Testi (“ <i>Gradient Strip Test</i> ”, GST)	33
4.10.2.3. Agar Dilüsyon Yöntemi	34
4.10.3. Yeni Geliştirilen Yöntemler	35
4.10.4. Moleküler Yöntemler	36
4.11. <i>Candida</i> Türlerinde Antifungal İlaç Direnci	36
4.11.1. Azol Direnci	36
4.11.2. Ekinokandin Direnci	38
4.11.3. Polien Direnci	39
4.11.4. Flusitozin (5- fluorocytosine) Direnci	40
5. GEREÇ ve YÖNTEM	41
5.1. İzolatların Seçimi	41
5.2. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi	42
5.2.1. İlaç Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	43
5.2.2. Besiyerinin Hazırlanması	44
5.2.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması	45

5.2.4. İnokulum Hazırlanması	45
5.2.5. Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu ve Değerlendirilmesi	45
5.3. VITEK 2 ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi	47
5.4. <i>C. parapsilosis</i> İzolatlarında Azol Direncinin Moleküler Mekanizmalarının Belirlenmesi	49
5.4.1. DNA Ekstraksiyonu	49
5.4.2. DNA Ekstraksiyonu Sonrası DNA Varlığının Araştırılması	50
5.4.3. <i>mrr1</i> Genine Yönelik PZR	51
5.4.3.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	53
5.4.3.2. <i>mrr1</i> Genindeki Mutasyonların DNA Dizi Analizi ile Saptanması	53
5.4.4. <i>erg11</i> genine yönelik MAS-PZR	54
5.4.4.1. MAS PZR-1 Yöntemi ile A395T (Y132F) Mutasyonunun Saptanması	54
5.4.4.1.1. MAS PZR-1 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	55
5.4.4.2. MAS PZR-2 Yöntemi ile A395T (Y132F) Mutasyonunun Saptanması	56
5.4.4.2.1. MAS PZR-2 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	57
5.5. İstatistiksel Analiz	58
6. BULGULAR	60
6.1. İzolatlara Ait Genel Özellikler	60
6.2. İzolatların Antifungal İlaçlara İn Vitro Duyarlılık Sonuçları	63
6.2.1. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Sonuçları	63
6.2.1.1. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Flukonazol Sonuçları	65
6.2.1.2. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Vorikonazol Sonuçları	67
6.2.1.3. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre İtrakonazol Sonuçları	70
6.2.1.4. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Saptanan Çapraz Azol Direnci	72
6.2.1.5. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Kaspofungin Sonuçları	74

6.2.1.6. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Mikafungin Sonuçları	74
6.2.1.7. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Anidulafungin Sonuçları	76
6.2.1.8. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Amfoterisin B Sonuçları	77
6.2.2. VITEK 2 Antifungal Duyarlılık Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	79
6.2.2.1. VITEK 2 Flukonazol Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	80
6.2.2.2. VITEK 2 Vorikonazol Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	83
6.2.2.3. VITEK 2 Kaspofungin Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	86
6.2.2.4. VITEK 2 Mikafungin Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	87
6.2.2.5. VITEK 2 Amfoterisin B Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması	88
6.2.2.6. VITEK 2 Flusitozin Sonuçları	89
6.3. <i>mrrI</i> Gen Bölgesinin PZR Sonuçları	89
6.3.1. <i>mrrI</i> Gen Bölgesinin Dizi Analizi Sonuçları	91
6.4. <i>erg11</i> Genine Yönelik MAS-PZR Sonuçları	92
6.4.1. MAS PZR-1 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroze Jel Elektrophorezi ile Görüntüleme Sonuçları	92
6.4.2. MAS PZR-2 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroze Jel Elektrophorezi ile Görüntüleme Sonuçları	93
7. TARTIŞMA	98
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	124
9. KAYNAKLAR	126

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Derece Celsius
ABC	: ATP bağlayıcı kaset (ATP binding cassette)
AFDT	: Antifungal duyarlılık testi
AFLP	: Amplifiye edilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (Amplified fragment length polymorphism)
Als	: Aglütinin benzeri sekans (Agglutinin like sequences)
bç	: Baz çifti
BDG	: $\beta(1,3)$ -d-glukan
BH	: Büyük hata ("Major error")
ÇA	: Çikolata agar
ÇBH	: Çok büyük hata ("Very major error")
CFU	: Koloni Oluşturan Birim ("Colony Forming Unit")
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü ("Clinical and Laboratory Standards Institute")
cRNA	: taşıyıcı ("carrier") RNA
CU	: Kategorik uyum ("Categorical agreement")
DAP	: Dışa atım pompası
DDT	: Disk difüzyon testi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECM	: Hücre dışı matriks ("Extracellular matrix")
ECOFF	: Epidemiyolojik eşik değer
ELISA	: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
EMB	: Eozin metilen mavisi
EU	: Esansiyel uyum ("Essential agreement")
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi ("the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing")
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
g	: Gram
Gİ	: Gastrointestinal
GOF	: Fonksiyon kazandırıcı ("Gain of function")
GPI	: Glikozil fosfatidil inositol
GST	: Gradyent şerit test ("Gradient strip test")

HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
HS	: Sıcak nokta (“Hot spot”)
Hwp1	: Hifal duvar proteini 1 (“hyphal wall protein 1”)
IDSA	: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği
IgG	: İmmünoglobulin G
ITS	: İnternal “Transcribed Spacer”
KAE	: Kan akımı enfeksiyonu
kH	: Küçük hata (“Minor error”)
KKA	: koyun kanlı agar
KKİ	: Kandida kolonizasyon indeksi
KOB	: Koloni oluşturan birim
l	: Litre
MALDI-TOF MS	: Matriks aracılı lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi kütle spektrofotometrisi (“Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrophotometry”)
MAS PZR	: Multipleks allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
MFS	: Ana kolaylaştırıcı super ailesi (“Major facilitator superfamily”)
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton agar
MİK	: Minimum inhibitor konsantrasyon
ml	: Mililitre
MLEE	: “Multilocus enzyme electrophoresis”
MLST	: “Multilocus sequence typing”
mM	: Milimolar
MOPS	: Morfolino propansülfonik asit
MPCC	: Minimal profil değişim konsantrasyonu (“Minimal profile change concentration”)
NAC	: <i>albicans</i> dışı <i>Candida</i> (“Non- <i>albicans</i> ” <i>Candida</i>)
NBD	: Nükleotid bağlayıcı domeyn
NCCLS	: Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (“National Committee on Clinical Laboratory Standards”)
nm	: Nanometre
non-WT	: Mutant tip (“Non-wild type”)
PAO	: Gözenekli alüminyum oksit (“Porous aluminium oxide”)
PFGE	: “Pulsed-field gel electrophoresis”
PLB	: Fosfolipaz B

PNA-FISH	: Peptit nükleik asit-floresan in-situ hibridizasyon (“Peptide nucleic acid-fluorescent in-situ hybridization”)
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (“Polymerase chain reaction”)
RAPD	: “Randomly amplified polymorphic DNA”
REA	: “Restriction enzyme analysis”
RFLP	: “Restriction fragment length polymorphism”
RPMI	: “Roswell Park Memorial Institute”
SAP	: Salgısal aspartil proteaz
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi (“Single nucleotide polymorphism”)
SVK	: Santral venöz katater
SYO	: “Sensititre Yeast One”
TBE	: Tris borat EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)
TMD	: Transmembran domeyni
TPN	: Total parenteral beslenme
VME	: Çok büyük hata (“Very major error”)
WT	: Sokak tipi (“Wild type”)
XTT	: 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-[(sülfenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum-hidroksit)
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1. EUCAST yöntemine göre gerçekleştirilen flukonazole ait; A. Sıvı mikrodilüsyon plak görüntüsü B. Spektrofotometre sonucu	47
Şekil 5.2. VITEK 2 yönteminde kullanılan kit ve elde edilen sonuç raporu.....	48
Şekil 5.3. Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA'nın %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	51
Şekil 6.1. 2021-2023 yılları arasında kandidemi etkenlerinin dağılımı.	60
Şekil 6.2. İzolatların YBÜ ve diğer servislere göre tür düzeyinde dağılımı.	62
Şekil 6.3. İzolatların türlere göre flukonazol duyarlılığı	66
Şekil 6.4. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların flukonazol duyarlılığı.	67
Şekil 6.5. Türler göre vorikonazol duyarlılığı.	68
Şekil 6.6. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların vorikonazol duyarlılığı.	69
Şekil 6.7. Türler göre itrakonazol duyarlılığı.	71
Şekil 6.8. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların itrakonazole duyarlılığı.	72
Şekil 6.9. Türler göre mikafungin duyarlılığı.....	75
Şekil 6.10. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların mikafungin duyarlılığı.....	75
Şekil 6.11. Türler göre anidulafungin duyarlılığı.	76
Şekil 6.12. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların anidulafungin duyarlılığı.	77
Şekil 6.13. Türler göre Amfoterisin B duyarlılığı.	78
Şekil 6.14. Türler göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların amfoterisin B duyarlılığı.	78
Şekil 6.15. <i>mrr1</i> (<i>mrr1</i> -F1F ve <i>mrr1</i> -F3R primerleri) agaroz jel elektroforez görüntüsü.	90
Şekil 6.16. <i>mrr1</i> (<i>mrr1</i> -F4F ve <i>mrr1</i> -F6R primerleri) agaroz jel elektroforez görüntüsü.	90
Şekil 6.17. <i>mrr1</i> (<i>mrr1</i> -F7F ve <i>mrr1</i> -F9R primerleri) agaroz jel elektroforez görüntüsü.	91
Şekil 6.18. <i>mrr1</i> geninde tespit edilen mutasyonlara ait örnek kromatogram görüntüsü.	92
Şekil 6.19. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	93
Şekil 6.20. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	94

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 5.1. EUCAST E.Def 7.4'e göre <i>Candida</i> türleri için kullanılan Epidemiyolojik (ECOFF) ve Klinik Sınır Değerleri	43
Tablo 5.2. İlaç stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler, antifungal ilaçların stok konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyon aralıkları.....	44
Tablo 5.3. <i>mrr1</i> geni için PZR primer dizileri, özellikleri.....	52
Tablo 5.4. <i>mrr1</i> geni için PZR içeriği.....	52
Tablo 5.5. <i>mrr1</i> geni için PZR döngüleri.....	52
Tablo 5.6. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 için primer dizileri, özellikleri.....	55
Tablo 5.7. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 içeriği	55
Tablo 5.8. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 döngüleri	55
Tablo 5.9. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 için primer dizileri, özellikleri.....	57
Tablo 5.10. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 içeriği	57
Tablo 5.11. <i>erg11</i> geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 döngüleri	57
Tablo 6.1. Hastalara ait özellikler ve kandidemi risk faktörlerinin yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde karşılaştırması	61
Tablo 6.2. Servislere göre izolatların tür düzeyinde dağılımı.....	62
Tablo 6.3. EUCAST sıvı mikrodilüsyon antifungal duyarlılık testi sonuçları	64
Tablo 6.4. Vorikonazol ve itrakonazol için ECOFF değerlerine göre sokak tipi (WT) ve mutant (non-WT) olarak değerlendirilen <i>C. glabrata</i> izolatlarının EUCAST sıvı mikrodilüsyon ve VITEK 2 yöntemine göre antifungal duyarlılık testi sonuçları.....	65
Tablo 6.5. Hastane bölümlerine göre direnç durumu	67
Tablo 6.6. Hastane bölümlerine göre vorikonazol duyarlılık sonuçları.....	70
Tablo 6.7. Hastane bölümlerine göre itrakonazol duyarlılık sonuçları.....	72
Tablo 6.8. Birden fazla azole direnç saptanan izolatların azol MİK değerleri	73
Tablo 6.9. Hastane bölümlerine göre mikafungin duyarlılık sonuçları	76
Tablo 6.10. Hastane bölümlerine göre anidulafungin duyarlılık sonuçları	77
Tablo 6.11. Hastane bölümlerine göre amfoterisin B duyarlılık sonuçları.....	79
Tablo 6.12. İzolatların VITEK 2 yönteminin EUCAST klinik sınır değerlere göre MİK sonuçları	79

Tablo 6.13. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 yöntemlerinin karşılaştırması	80
Tablo 6.14. Flukonazol duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar.....	82
Tablo 6.15. Vorikonazol duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar.....	85
Tablo 6.16. Kaspofungin duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar.....	87
Tablo 6.17. Mikafungin duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar.....	88
Tablo 6.18. Amfoterisin B duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar.....	89
Tablo 6.19. <i>C. parapsilosis</i> izolatlarının azol MİK değerleri ve <i>erg11</i> ile <i>mrr1</i> genlerindeki mutasyon varlığı.....	95
Tablo 6.20. <i>erg11</i> geni MAS PZR 1-2 (n=57) ve <i>mrr1</i> gen dizilimi (n=41) gerçekleştirilen izolatlarda saptanan mutasyonlar	96
Tablo 6.21. <i>C. parapsilosis</i> izolatlarının <i>erg11</i> geninde A395T (Y132F) mutasyonu taşıma durumuna göre antifungal duyarlılık oranları.....	96
Tablo 6.22. Flukonazole duyarlı olmayan <i>C. parapsilosis</i> izolatlarında <i>erg11</i> geninde A395T (Y132F) mutasyonunu taşıma durumuna göre antifungal duyarlılık oranları	97

1. ÖZET

Amaç: Kandidemi, en yaygın hastane enfeksiyonları arasındadır, insidansının son yıllarda artış göstermesi, yüksek ölüm oranları ve artan antifungal direnç nedeniyle en büyük halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir. Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen kan kültürü örneklerinde üreyen *Candida* türlerinin dağılımı, referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antifungal duyarlılıkları, yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerdeki hasta popülasyonunda, tür dağılımındaki ve ilaç direncindeki farklılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca antifungal duyarlılık testi (AFDT) için referans sıvı mikrodilüsyon yönteminin yanısıra yeni geliştirilmiş ticari yöntemlerden VITEK 2'nin (BioMérieux, Fransa) antifungal duyarlılıkları saptamadaki performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Laboratuvarımızda kan akımı enfeksiyonu (KAE) etkeni olan *Candida* türleri arasında en sık izole edilen tür olması ve nozokomiyal salgınlar yapabilmesi nedeniyle *Candida parapsilosis*'te azol direncinin moleküler mekanizmalarının da araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, laboratuvarımızda 2021-2023 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen 134 izolata EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol, vorikonazol, itraconazol, anidulafungin, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B için ve VITEK 2 otomatize sistemi ile flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin, amfoterisin B ve flusitozin için AFDT çalışılmıştır. *C. parapsilosis*'de azol direnci gelişiminden en sık sorumlu olan *erg11* genindeki A395T (Y132F) mutasyonunun taranması amacıyla literatürde yer alan iki farklı prosedürde multipleks allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MAS PZR) yöntemi çalışılmıştır. *C. parapsilosis* türlerinde azoller hücre dışına taşıyan dışa atım pompası'nın (DAP) transkripsiyon faktörü olan *mrr1* genindeki mutasyonlar araştırılmıştır. *mrr1* gen bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve sonrasında DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen diziler referans gen ile karşılaştırılarak mutasyonlar taranmıştır.

Bulgular: KAE nedeni olan 182 adet tekrarlamayan *Candida* saptanmıştır. İzolatların %36,3'ü (n=66) *Candida parapsilosis*, %28,6'sı (n=52) *Candida albicans*, %18,1'i (n=33) *Candida glabrata*, %7,7'si (n=14) *Candida auris*, %3,8'i (n=7) *Candida tropicalis*, %2,2'si (n=4) *Candida kefyr*, %2,2'si (n=4) *Candida krusei*, %1,1'i (n=2) *Candida dubliniensis* olarak tanımlanmıştır. Duyarlılık testleri, en sık izole edilen türler olan *C. parapsilosis* (n=57), *C. albicans* (n=49) ve *C. glabrata* (n=28) olmak üzere toplam 134 *Candida* izolatına

uygulanmıştır. Test edilen izolatların yaklaşık %62'si (n=84) YBÜ, %48'i (n=55) diğer servislerden gelmiştir. YBÜ'de kandidemi hastalarından en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%50, n=42) iken diğer servislerde *C. albicans* (%44, n=22) olmuştur. EUCAST referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların %33,6'sının (n=45) flukonazole dirençli olduğu, tür düzeyinde *C. parapsilosis*'in flukonazole en dirençli (%68,4) tür olduğu ve diğer azollere de çapraz direnç gösterdiği saptanmıştır. *C. albicans* ise flukonazole en duyarlı (%93,9, n=46) tür olarak gözlenmiştir. YBÜ'de, diğer servislere göre flukonazol, vorikonazol ve itrakonazol direncinin daha yüksek olduğu saptanırken direncin yüksekliği sadece vorikonazolde istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık içermiştir. Ekinokandinlere direnç %6,7 (n=9) ve en yüksek ekinokandin direnç oranı *C. glabrata*'da saptanmıştır (%28,6, n=8). *C. parapsilosis*'de ekinokandin direncine rastlanmamıştır. Amfoterisin B direnç oranı düşük olup %3 olarak saptanmıştır. VITEK 2 ile izolatların %99,3'ü flusitozine duyarlı bulunmuştur. VITEK 2 yönteminin esansiyel uyumu (EU) amfoterisin B için %91,7, flukonazol için %88,5, mikafungin için %83,3 ve vorikonazol için %75 olarak tespit edilmiştir. Kategorik uyum (KU) ise mikafunginde %95, vorikonazol ve amfoterisin B'de %92,5, flukonazolde ise %91,8 şeklinde saptanmıştır. Çok büyük hata (ÇBH) oranı vorikonazolde %7,8 iken flukonazolde %4,35 olarak bulunmuştur. Büyük hata (BH) oranı amfoterisin B'de %7,7, mikafunginde %4,6 ve vorikonazolde %2,1 olarak belirlenmiştir. Küçük hata ise (KH) flukonazolde %6,7, vorikonazolde %3,7 oranındadır.

C. parapsilosis izolatlarının *erg11* genindeki A395T (Y132F) mutasyonunun varlığını taramak amacıyla gerçekleştirilen her iki MAS PZR protokolü ile izolatların %61,4'ünde (35/57) mutasyon saptanmıştır. Azollere duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarının DNA dizi analizinde izolatların %36,6'sında (15/41) *mrr1* geninde mutasyon saptanmıştır. En sık G1214A (R405K) (%22) ardından G2779T (G927C) (%14,6) mutasyonları saptanmıştır.

Sonuç: Hastanemizde en sık kandidemi etkeninin *C. parapsilosis* olduğu saptanmış ve azollere direnç oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Değerlendirilen izolatların taşıdığı *erg11* ve *mrr1* genlerindeki direnç mutasyonları belirlenerek azol direncinin altında yatan moleküler mekanizmalar belirlenmiş ve bu konu hakkında epidemiyolojik verilere katkı sağlanmıştır. Çalışmamızda VITEK 2 sisteminin, *Candida* türlerinde kategorik uyumunun iyi olduğu ancak bazı türlerde VITEK 2 konsantrasyon aralıklarının düzenlenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antifungal Duyarlılık, MİK, EUCAST, *Candida parapsilosis*, kandidemi, *erg11*, *mrr1*, Azol Direnci

2. ABSTRACT

Aim: Candidaemia is one of the most common nosocomial infections and has become one of the biggest public health problems due to its increasing incidence in recent years, high mortality rates and increasing antifungal resistance. In our study, we aimed to investigate the distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from in blood cultures of patients at the Central Microbiology Laboratory of Ankara University Faculty of Medicine Ibn-i Sina Hospital. Antifungal susceptibilities were revealed by the reference broth microdilution method, and differences in distribution of *Candida* species and drug resistance in intensive care units (ICU) and other clinical services were evaluated. In addition to the reference broth microdilution method for antifungal susceptibility testing (AFST), we also aimed to evaluate the performance of VITEK 2 (BioMérieux, France), a newly developed commercial method, for determining the antifungal susceptibilities of *Candida* species. We also aimed to investigate the molecular mechanisms of azole resistance in *C. parapsilosis* since it is the most frequently isolated *Candida* species causing blood stream infections (BSI) in our hospital and is capable of causing nosocomial outbreaks.

Materials and Methods: In our study, 134 *Candida* strains isolated from blood cultures of patients in our laboratory between 2021 and 2023 were evaluated. AFSTs for fluconazole, voriconazole, itraconazole, anidulafungin, caspofungin, micafungin and amphotericin B were carried out by the EUCAST broth microdilution method, and fluconazole, voriconazole, caspofungin, micafungin, amphotericin B and flucytosine susceptibilities were also determined by the VITEK 2 automated system. Two different multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS PCR) methods in the literature were used to screen the A395T (Y132F) mutation in the *erg11* gene, which is the most frequently detected mutation responsible for the development of azole resistance in *C. parapsilosis* species. Mutations in the *mrr1* gene, which is the transcription factor of the efflux pump (DAP) that transports azoles out of the cell in *C. parapsilosis* species, were also investigated. For this purpose, *mrr1* gene region was amplified by PCR and then DNA sequence analysis was performed subsequently. The sequences obtained were compared with the reference gene and mutations were screened.

Results: 182 non-duplicate *Candida* CAEs were found. Of the isolates, 36.3% (n=66) was *Candida parapsilosis*, 28.6% (n=52) was *Candida albicans*, 18.1% (n=33) was *Candida glabrata*, 7.7% (n=14) was *Candida auris*, 3.8% (n=7) was *Candida tropicalis*, 2.2% (n=4) each were *Candida kefyr* and *Candida krusei*, and 1.1% (n=2) was *Candida dubliniensis*. Susceptibility tests

were performed on a total of 134 *Candida* isolates including *C. parapsilosis* (n=57), *C. albicans* (n=49) and *C. glabrata* (n=28), which were the most frequently detected ones. Of the isolates tested, 62% (n=84) were isolated from the ICU patients and 48% (n=50) were from patients hospitalized at various clinical services. While *C. parapsilosis* (50%, n=42) was the most frequently isolated species from patients with candidemia in the ICU, *C. albicans* (44%, n=22) was the most frequently isolated species from other clinical services. With the EUCAST reference broth microdilution method, 33.6% (n=45) of the isolates were resistant to fluconazole, *C. parapsilosis* was the most resistant (68.4%) species to fluconazole and showed cross-resistance to other azoles. *C. albicans* was the most susceptible (93.9%, n=46) species to fluconazole. Voriconazole resistance was statistically significantly higher in the ICU than other clinical services. Resistance to echinocandins was 6.7% and the highest echinocandin resistance rate was found in *C. glabrata* (28.6%, n=8). Echinocandin resistance was not observed in *C. parapsilosis* species. Amphotericin B resistance rate was low (3%). With the VITEK 2 system, 99.3% of the isolates were found to be susceptible to flucytosine. Essential agreement (EA) of VITEK 2 was 91.7% for amphotericin B, 88.5% for fluconazole, 83.3% for micafungin and 75% for voriconazole. Categorical agreement (CA) was 95% for micafungin, 92.5% for amphotericin B and voriconazole, and 91.8% for fluconazole. Very major error (VME) rate was 7.8% for voriconazole and 4.35% for fluconazole. Major error (ME) rate was 7.7% for amphotericin B, 4.6% for micafungin and 2.1% for voriconazole. Minor error (miE) rates were 6.7% for fluconazole and 3.7% for voriconazole.

With both of the MAS PCR protocols used to screen the presence of A395T (Y132F) mutation in the *erg11* gene of *C. parapsilosis* isolates, 61.4% (35/57) of the isolates were found to carry this mutation. In *C. parapsilosis* isolates that were not susceptible to azoles, mutations in the *mrr1* gene were detected in 36.6% (15/41) of the isolates by sequence analysis. The most common mutation in the *mrr1* gene was G1214A (R405K) (22%) followed by G2779T (G927C) (14.6%) mutation.

Conclusions: *C. parapsilosis* was found to be the most common agent of candidaemia in our institution and was highly resistant to azoles. By determining the resistance mutations in the *erg11* and *mrr1* genes of the isolates, the molecular mechanisms underlying azole resistance in the study strains were determined and epidemiological data on this subject was provided. In our study, it was concluded that the CA of the VITEK 2 system was good in *Candida* species, but for some species the concentration ranges of the antifungals must be reviewed.

Key Words: Antifungal Susceptibility, MIC, EUCAST, *Candida parapsilosis*, Candidemia, *erg11*, *mrr1*, Azole resistance

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri klinik örneklerden en sık izole edilen maya mantarlarından. Kommensal mikroorganizmalardır ve insan florasının bir parçası olarak cilt, gastrointestinal (Gİ) ve genital yollarda lokalizedirler. Ancak yaşlı, immünsuprese, yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan, geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, santral venöz kateteri (SVK) olan, mekanik ventilasyon ve total parenteral beslenme (TPN) uygulanan bireyleri içeren duyarlı hasta gruplarında yüzeysel enfeksiyonlardan, septik şok ve yüksek mortalite ile ilişkili kan akımı enfeksiyonlarına (KAE) kadar çeşitli hastalıklara neden olan mikroorganizmalardır (1). Kandidemi en yaygın hastane enfeksiyonları arasında olup KAE'nin en sık dördüncü sebebidir (2). İnsidansının son yıllarda artış göstermesi yüksek ölüm oranları ve artan antifungal direnç nedeniyle en büyük halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir. Özellikle YBÜ'lerde artış göstermesi mortalitenin de artmasına sebep olmaktadır (3-5).

Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), antifungal duyarlılık testi (AFDT) için referans yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir (6). Bu yöntemin zaman alıcı ve emek yoğun olması nedeniyle rutin mikrobiyolojik raporlama için ticari olarak geliştirilmiş yöntemler bulunmaktadır. Yeni yöntemlerden VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) kullanışlı ve etkili olup klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından günlük işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ancak referans yöntem ile uyumu hala araştırılmaktadır (7, 8).

Kandidemi olgularındaki artış ve antifungallerin tedavide kullanılması, tüm dünyada invaziv *Candida* enfeksiyonlarında ilk seçenek ilaçlar arasında önerilen azol sınıfı ilaçlara direnç gelişimine ve sonuçta terapötik başarısızlıklara neden olmaktadır. Bu durum özellikle *C. parapsilosis* izolatlarında daha önce ülkemizde bildirilen direnç oranlarının yükselebileceğine işaret etmesi nedeniyle aktif sürveyans çalışmalarının gerekli olduğunu, terapötik ve ampirik tedavileri yönlendirmek amacıyla azol direncinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2021-2023 yılları arasında periferik damarlardan alınan kan örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı saptanmış, referans yöntem olan EUCAST sıvı mikrodilüsyon testi ile antifungal ilaçlara duyarlılık durumu belirlenmiştir. YBÜ ve diğer servislerde kandidemi

hastalarının özellikleri, hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve türlere göre antifungal duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca antifungal duyarlılıkların belirlenmesinde kullanılan otomatize VITEK 2 sistemi (BioMérieux, Fransa) EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Hastanemizde belirtilen tarihler arasında kandideminin ana etkeni olması ve referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yüksek düzeyde azol direnci saptanması nedeniyle azollere artmış temasta duyarlı/dirençli *C. parapsilosis* izolatlarında moleküler incelemeler ile azollere direnç mekanizması araştırılmıştır. *C. parapsilosis* izolatlarında literatürde azol direncine sebep olduğu bilinen *erg11* genindeki en sık saptanan A395T (Y132F) nokta mutasyonunun hızlı ve uygun tespiti için iki farklı protokol ile multipleks allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MAS PZR) yapılmıştır. Ayrıca ilacı hücre dışına taşıyan dışa atım pompalarını (DAP) düzenleyen *mrr1* genindeki mutasyonların araştırılması amacıyla, PZR ile hedef gen çoğaltılmış ve ardından dizi analizi ile gendeki mutasyonların varlığı gösterilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Mikoloji, mantarları ve mantarlarla oluşan hastalıklarla ilgilenen bilim dalıdır. İsim kaynağı Yunanca “mykes” (şapkalı mantar) kelimesidir. Doktorlar eski çağlardan beri mantarların vücudun birçok yerinde hastalığa neden olabileceğine inansa da 19. yüzyıldan sonra bu mikroorganizmalar hakkındaki bilgilerimiz artarak klinik önemi anlaşılır hale gelmiş ve Tıbbi Mikrobiyoloji'nin en yeni bilim dallarından biri olmuştur (9). Mantarlarla ilişkili tarihsel gelişmeler incelendiğinde ilk izler MÖ 2000-1000 yıllarında Hindu yazıtlarında (Samhita) görülmüş ve bugün miçetoma olarak tanımladığımız hastalıktan bahsedilmiştir (10, 11). MÖ 400-200 arasında Hipokrat ve Galen ağızdaki pamukçuk ile ilgili yazılı tanımlamalarda bulunmuştur. Galen tarafından bu lezyonlara “ad aphthas albus” ismi verilmiştir (12, 13). *Candida* mantarının kandidiyazis olgularıyla ilişkilendirilmesi ise 19. yüzyılda modern tıp ve mikrobiyoloji ile başlamıştır (13).

1835 yılında ipekböceklerinin muskardin adı verilen bulaşıcı hastalığının mikotik doğasını İtalyan avukat ve çiftçi Agostino Bassi (1773-1856) keşfetmiştir. Bassi etkene *Beauveria bassieni* adını vermiştir. Bassi'nin bir hayvan hastalığını bir mantarla ilişkilendirmesi, diğer mantarların neden olabileceği insan hastalıklarının araştırılmasına yönelik bir ilgi uyandırmıştır (9). Tifüslü bir hastanın pamukçuk lezyonundan alınan kazıntı örneğinde mantar hücrelerinin varlığını 1839'da Langenbeck saptamıştır. Ancak gözlemlediği mantar hücrelerini yanlışlıkla tifüs etkeni olarak yorumlamıştır (12). Bu yanlış anlama, *Candida* mantarının etyolojisi üzerine yapılan erken çalışmaların önemli bir dönüm noktasını oluşturmuştur. Gruby 1842'de pamukçukta gözlenen zarın iltihaplı bir eksuda olmadığını, bugün *Candida albicans* olarak bilinen mayanın saf bir kültürü olduğunu göstermeyi başarmıştır. Gruby bu organizma üzerinde mikolojik bir araştırma yapmış ve onu *Sporotrichum* cinsine yerleştirmiştir. Gruby'nin öğrencilerinden biri olan ve bebek pamukçukları üzerine çalışan F.T. Berg (1846) ise mantarın dokuda uzun filamanlar oluşturduğunu göstermiştir. Charles Robin 1853 yılında bu mantarı *Oidium albicans* olarak adlandırmış ve botanikçi W. Zopf (1890) ise *Monilia albicans* adını vermiştir. Bu maya 1923 yılında C.M. Berkhout tarafından *C. albicans* olarak adlandırılmış ve *Candida* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Bugüne kadar *C. albicans* için yaklaşık 177 isim verilmesine rağmen bunlardan en sık kullanılanlar

Monilia albicans ve *C. albicans* olmuştur (9). 1861'de Zenker ilk invaziv kandida vakasını tanımlamıştır (serebral kandidoz). İlk *Candida* kaynaklı endokardit vakası ise 1940 yılında tanımlanmıştır. *Candida* enfeksiyonlarının tarihindeki en önemli dönem ise antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmaya başlandığı 1940'lı yıllarda başlamıştır. Bu tarihten sonra, *Candida* enfeksiyonlarının neredeyse tüm formlarının görülme sıklığı artarak devam etmiş ve buna paralel olarak konuyla ilgili gelişmeler de hız kazanmıştır (12).

4.2. Sınıflandırma

Günümüzde mayaların taksonomik kategorilerinin belirlenmesinde filogenetik analiz yöntemleri ve DNA dizilimi kullanılmaktadır (14). *Ascomycota* şubesi içinde bilinen yaklaşık 64000 tür yer almaktadır ve bu hali ile mantarlar aleminin en büyük şubesidir. İsimlendirilmiş mantar türlerinin yaklaşık %50'sini, klinik olarak önemli olan mantar türlerinin ise %80'ini kapsamaktadır. Bu şube içinde yer alan *Saccharomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Pneumocystidomycetes*, *Sordariomycetes* tıbbi açıdan önemlidir (15).

Tıbbi açıdan önemli *Candida* cinsi mantarlar taksonomik olarak incelendiğinde; *Saccharomycetaceae* ailesinde, *Saccharomycetales* takımında, *Saccharomycetes* (*Hemiascomycetes*) sınıfında, *Saccharomycotina* alt şubesinde, *Ascomycota* şubesinde yer almaktadır. Bu sınıflandırma çoklu gen analizleri sonucu belirlenmektedir (16). *Candida* cinsi içinde yaklaşık 200 tür bulunmaktadır, ancak filogenetik gelişmeler ile bu sayı sürekli değişim göstermektedir (17). Çok sayıda türden sadece 30 *Candida* türü insan patojeni olarak tanımlanmıştır (18). *C. albicans* bu gruptaki başlıca patojen olmaya devam etmektedir ve *Candida claussenii* ve *Candida langeronii* de dahil olmak üzere çok sayıda tür *C. albicans* ile birleştirilmiştir. *Candida dubliniensis*, *C. albicans* ile birçok fenotipik ve genotipik benzerliğe sahiptir (17). *albicans* dışı *Candida* (non-*albicans* *Candida*, NAC) türlerinin sınıflandırılmasında ise “tür kompleksleri” veya “kriptik türler” dikkat çekmektedir. Bunlar fenotipik ve morfolojik olarak birbirleriyle oldukça benzer yapıda olup ayrımlarında “multilocus sequence typing” (MLST), “restriction fragment length polymorphism” (RFLP), “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE), “internal transcribed spacer” (ITS) gen sekansı, mitokondriyal DNA dizi farklılıkları gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile, *Candida parapsilosis* izolatlarının diğer *Candida* türlerine göre genotipik olarak daha heterojen olduğu gösterilerek üç türden oluşan bir tür kompleksi olduğu saptanmıştır. Bu türler, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* tir. *Candida glabrata*

tür kompleksi ise, *Candida bracarensis* ve *C. nivariensis*'i içermektedir ve bunlar fenotipik olarak ayırt edilememektedir. Diğer NAC türlerinde ise türler resmi olarak ayrılmamıştır (14, 17, 19).

4.3. Morfolojik Özellikleri

Candida türleri, maya, psödohif ve hif olmak üzere üç ana morfolojide büyüme yeteneğine sahiptirler (20, 21). Blastokonidyum olarak isimlendirilen maya formları çoğunlukla tek hücreli, tomurcuklanma ile çoğalan, küçük ($2-5 \times 3-7$ µm çapında), ince duvarlı hücrelerdir (12, 20). Blastokonidyumlar yuvarlak olabileceği gibi oval veya uzamış şekilde de görünebilir (17). Nadir de olsa antimikrobiyal tedavi gören hastalardan izole edilenler oldukça pleomorfik olabilir ve çoğunlukla da daha büyük maya hücreleri şeklinde görülürler (22). Mayalarda eşeysiz üreme multilateral tomurcuklanma ile olur (23). Psödohif ve hif, hücrelerin polarize şekilde büyümesi ve uç uca bağlanarak uzaması nedeniyle genellikle filamentöz morfolojiler olarak adlandırılırlar (21, 23). Psödohifler maya hücrelerinden veya hiflerden tomurcuklanma yoluyla oluşur ve yeni gelişen tomurcuk ana hücreye bağlı kalır (20, 22). Psödohifler, polarize büyüme ve uzama özellikleri yönünden hiflerle benzer özellikler taşıırken şekil olarak elipsoid olması, hücre duvarının boğumlar şeklinde bir yapı göstermesi ve septal bağlantı noktalarında darlıklarının olması ile hiflerden ayrılmaktadır (24). Hifler, düzgün bir genişliğe ve paralel kenarlı duvarlara sahip, daralmaları olmayan gerçek septalara sahip uzun yapılardır (23). Psödohiflerin aksine hifal hücreler septalarında hücreler arası iletişime izin veren ve polarize bir şekilde büyüme eğiliminde olan gözeneklere sahiptirler (21, 23-25). *Candida* cinsi maya mantarlarında gerçek hiflerin gelişimi, hücrenin boğum oluşturmada apikal uzaması ve daha sonra hifleri ayrı mantar birimlerine bölen septalarla dallanan bir germ tüpü (ilk kısa filament) oluşumu ile başlamaktadır (20). Psödohif ve mayada nükleer bölünme ve septum halkası oluşumu ana tomurcuk boynu boyunca gerçekleşirken, hifal formların çekirdekleri germ tüpü içinde ancak septum bölmesinin dışında bölünmektedir ve bölünmeden sonra bir çekirdek ana hücreye geri dönerek diğeri germ tüpünün merkezine doğru hareket etmektedir (23, 24, 26).

C. albicans ve *C. dubliniensis*, hif ve/veya psödohif oluşturma yetenekleri nedeniyle polimorftir ve gerçek hifler veya daha sık olarak psödohifler gibi filamentöz bir büyüme gösterirler. Bu türler aynı zamanda tanısal bir özellik olan germ tüp oluştururlar. Buna karşılık, *C. glabrata* polimorfik değildir ve sadece blastokonidya (maya) olarak büyümektedir (20). Tarihsel olarak, bu tür başlangıçta psödohif oluşumunun olmaması nedeniyle *Torulopsis* cinsi

içinde sınıflandırılmıştır. Ancak 1978 yılında, psöдохif oluşturma yeteneğinin *Candida* cinsi üyeleri için güvenilir bir ayırt edici özellik olmadığı belirlenmiş ve *Torulopsis glabrata*'nın insanlarda enfeksiyona sebep olması nedeniyle *Candida* cinsi içinde sınıflandırılması önerilmiştir (27). *C. parapsilosis* ise maya formunda olup gerçek hif üretmez, ancak karakteristik olarak büyük ve kıvrımlı olan ve genellikle “dev hücreler” olarak adlandırılan psöдохifler üretebilir (22). *C. tropicalis*, mısır unu Tween 80 agar üzerinde ve 25°C'de 72 saatte, psöдохif ve gerçek hif üretmektedir (20, 22).

C. albicans ve *C. dubliniensis* türlerinde gözlenen son bir morfolojik yapı da klamidosporlardır. Klamidosporlar büyük (mayanın 3-4 katı büyüklüğünde), yuvarlak, kalın duvarlı hücrelerdir ve tipik olarak hif filamentlerinin uçlarında oluşurlar. Bu hücreler, besin açısından fakir zorlu koşullara yanıt olarak oluşma eğilimindedir. Klamidosporlar enfekte dokuda nadiren gözlenir ve bu hücrelerin biyolojik işlevi hakkında çok az şey bilinmektedir (23, 26).

Candida cinsi mantarların üretilmesinde Sabouraud dekstroza agar (SDA) besiyeri kullanılmaktadır. Plakların inkübasyonu 24-48 saat oda sıcaklığında (22-25°C) ya da vücut sıcaklığında (36±2°C) yapılmaktadır ve kolonilerin büyümesi hızlı olup beş gün içerisinde maturasyonu tamamlanmaktadır (22). Mantar besiyerinde üreme 24 saat gibi erken bir sürede tespit edilebilir; ancak koloniler genellikle 48-72 saat içinde gözlenebilmektedir (17). Makroskopik olarak, SDA üzerindeki *Candida* kolonilerinin görünümü, türe bağlı olarak değişmek üzere, pürüzsüz ve parlak, pürüzsüz ve kuru veya buruşuk ve mat olabilir. Kolonileri genellikle pürüzsüz ve tüysüzdür ve nemli veya kuru görünümlü olabilir; genellikle beyaz-krem rengindedir, ancak bazıları ten rengi, pembemsi veya turuncudur (22). Birçok *C. albicans* izolatu koyun kanlı agarda (KKA) "ayaklı koloniler" (yani kısa marjinal uzantılara sahip koloniler) oluştururken, diğer mayaların çoğunda bu durum görülmemektedir (*C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatlarının %25'inde görülebilmektedir). Bu koloniler hif/psöдохif hücreleri içermesi sebebiyle germ tüp testleri yapmak için kullanılmamalıdır (17).

4.4. Hücresel Özellikler

Candida cinsi maya mantarları sert bir hücre duvarı ile çevrili ökaryotik hücre yapısına sahiptir. Hücre duvarı hücre zarının dışında yer alan fiziksel ve kimyasal saldırılara karşı koruyucu, hücre canlılığı, morfogenez, patogenez ve immünitede rol oynayan, konak hücre ile

ilk temas eden, antijenik belirleyicileri yüzeyinde taşıyan, patojenin adezyon, kolonizasyon ve invazyonunda görev alan, iç turgor basıncına direnerek canlılığı korumada önemli, sakkarit ve proteinden oluşan bir kılıftır. Çeşitli sinyallere yanıt olarak bir dizi koordineli mekanizma ile yeniden yapılandırılabilen ve güçlendirilebilen dinamik bir organeldir. (28-32).

Elektron mikroskopik incelemelerde *Candida* hücre duvarının iki tabakalı bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. *Candida*'nın üreme dönemine, üreme şekline ve üreme ortamına göre katmanların sayısı ve morfolojisi farklılık göstermektedir (31). Hücre zarının proksimalinde elektron saydam bir tabaka (iç) ve dış kısımda dışa doğru uzanan iplik benzeri filamentler veya fibrillerden zengin elektron yoğun bir tabaka (dış) bulunmaktadır (29, 33). İç hücre duvarı, hücre duvarının sağlamlığından ve şeklinden sorumlu olan $\beta(1,3)$ -d-glukan (BDG) ve kitin iskeletinden oluşmaktadır (34). Bu katman sitoplazma ve hücre membranı tarafından hücre duvarına uygulanan iç hidrostatik basınca karşı direnç gösteren ana yapısal bileşendir. Kitin, hücre duvarının iç katmanında yer almaktadır ve güçlü hidrojen bağlı yapılar oluşturmaktadır (34, 35). *Candida* hücre duvarının ana bileşeni BDG'dir ve duvarın %40'ını oluşturmaktadır (29). BDG, plazma membranında bulunan ve glukan sentaz adı verilen Fksp ve Rho1p olmak üzere iki alt birime sahip bir enzim kompleksi tarafından sentezlenmektedir. Fksp üç ortolog gen tarafından kodlanmaktadır: *fkp1*, *fkp2* ve *fkp3*. Bu genlerden birinin kaybı hücre büyümesini etkilemektedir; iki tanesinin ortadan kaldırılması ise hücre ölümüne neden olmaktadır (35).

$\beta(1,6)$ -glukanlar, hidrojen bağları ile stabilize edilen, karmaşık yapılar oluşturabilen, değişken uzunluk ve dağılımlara sahip yan zincirlerdir. Farklı hücre duvarı proteinlerini glikozilfosfatidil inositol (GPI) proteinleri aracılığıyla BDG-kitin çekirdeğine bağlayan bir bağlayıcı molekül olarak hareket etmektedir (36).

Candida türlerinde hücre duvarının dış tabakası, GPI ile modifiye edilmiş ve $\beta(1,6)$ -glukan aracılığıyla BDG'ye bağlanan mannopteinlerden oluşmaktadır (29, 30). Dış tabaka yaklaşık 150 nm genişliğindedir (33). Mannozilasyon bölgesine bağlı olarak, hücre yapışmasını ve ayrıca hücre duvarı bütünlüğünü etkileyen N-bağlı (asparajine bağlı oligosakkaritler) ve O-bağlı (serin/treonine bağlanan oligosakkaritler) mannanlar bulunmaktadır (37). Mannanlar, β -glukanlar ve kitine kıyasla daha az serttir, bu nedenle hücre şeklini etkilemezler. Ancak, hücre duvarının antifungal ilaçlara ve konak savunma mekanizmalarına karşı direncini etkileyen düşük geçirgenlikte ve gözenekli bir yapıya sahiptirler. β -glukanları konak bağışıklık hücrelerinden gizleyen mannanlar, immün yanıtta kaçışta önemli yapılardandır. Hücre

duvarını parçalayan enzimlerin sitoplazma membranına ulaşmasını engellemektedirler. Mannanlar birçok konak reseptörünün tanınmasında görev alarak hücre-hücre tanıma olayına katılmaktadır (14).

Memeli hücreleri gibi maya hücreleri de sitoplazma membranları için yapısal bir bileşen olarak sterole ihtiyaç duymaktadır (38). Hayvan hücrelerinin başlıca sterolü kolesterol iken mayalar ana bileşen olarak ergosterol içermektedir (39). Karmaşık de novo ergosterol biyosentezi Erg proteinleri olarak bilinen yaklaşık 30 enzim tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu sentez yolu mevalonat biyosentezi, farnesil pirofosfat biyosentezi ve ergosterol biyosentezi olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (40, 41). Ergosterol, fosfolipitlere bağlanarak zar yapısını stabilize eder ve zarın akışkanlığını, geçirgenliğini, zara bağlı enzim faaliyetlerini ve madde transportunu düzenlemektedir. Ayrıca membrana bağlı ATPaz aktivitelerini düzenleyerek besinlerin emilimini ve kullanımını etkilemektedir. Hücre membranının hareketliliğini etkileyerek fosfolipazların taşıma etkinliğini düzenlemektedir. Ergosterol sitoplazmadaki lipit damlacıklarında steril ester formunda depolanabilir ve bu şekilde hücre içi sterol dengesini korumak için bir sterol havuzu görevi görmektedir. Aynı zamanda ergosterol mantarların büyümesini ve çoğalmasını uyarması nedeniyle bir “mantar hormonu” olarak kabul edilmektedir. Ergosterol stres adaptasyonunda da rol oynamaktadır (41). Ergosterolün, makrofaj hücrelerinde piroptozu doğrudan tetikleyerek patojeniteye katkı sağlayan immün aktif bir molekül olduğu saptanmıştır (42, 43) Önemli işlevleri, benzersiz yapısal özellikleri ve özel biyosentez adımları nedeniyle ergosterol, klinik olarak mevcut antifungal ilaçların çoğunun hedefidir (43).

4.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Candida türlerinin patojenitesine, konak dokuya ve tıbbi cihazlara adezyon yeteneği ve biyofilm oluşumu, maya-hif dimorfizmi sergileyebilmesi, hücre yüzey hidrofobikliği, maya ve hifal formlar arasında fenotipik dönüşüm yeteneği, konak savunmasından kaçma yeteneği, dokuya zarar veren hidrolitik enzimlerin (örn. proteazlar, fosfolipazlar ve hemolizinler) üretimi ve thigmotropizm dahil olmak üzere bir dizi virülans faktörü aracılık etmektedir (20). Değişen bir çevreye adaptasyon, *Candida* türlerinin hayatta kalma yeteneğini kolaylaştırmaktadır. Virülans için gerekli genler konak ortamı ve çevresel sinyallere yanıt olarak düzenlenmektedir. Bu sinyaller arasında sıcaklık, pH, CO₂, ozmotik basınç, demir ve kalsiyum iyonu konsantrasyonları yer almaktadır. *Candida* türleri bu sinyallerdeki dalgalanmalara karşı hızlı

adaptasyon göstermesi, metabolik esnekliğe sahip olması, güçlü besin toplama sistemlerinin olması ve güçlü stres yanıt mekanizmaları ile patojenitelerini artırmaktadır (44-46).

4.5.1. Adezyon (Tutunma)

Candida türlerinde enfeksiyonunun ilk adımı epitelyal kolonizasyondur; bu da mikroorganizmanın epitelyal hücrelere ve proteinlere yapışmasına bağlıdır ve bu yetenek virülans ile ilişkilendirilmiştir (44). Sık izole edilen patojenik *Candida* türlerinin adezyon yeteneği daha yüksektir (44, 47). Adezyonda ligand-reseptör etkileşimi gibi özgün mekanizmalar ve elektrostatik etkileşimler ve van der Waals kuvvetlerinin rol oynadığı özgün olmayan mekanizmalar birlikte rol almaktadır (48). *Candida* türleri diğer mikroorganizmalara, abiyotik yüzeylere ve konak hücrelere yapışmaya aracılık eden özelleşmiş bir dizi proteine (adezinler) sahiptir (49). Bunlar: aglütinin benzeri sekanslar (Als, “agglutinin like sequences”) yüzey glikoproteinleri ailesi, hifal hücre proteini 1 (Hwp1, “hyphal wall protein 1”), Int-1p yüzey reseptör proteinleri, mannoproteinler, kompleman3b (C3b) reseptörü, kompleman 3d (C3d) reseptörü, fibronektin reseptörü, östrojen reseptörü, laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinlerdir (44, 49-51).

En iyi bilinen adezinler sekiz üyeden oluşan bir aile olan Als proteinleridir (Als1-7 ve Als9). *als* genleri GPI bağlantılı hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlamaktadır. Sekiz Als proteini arasında, hifle ilişkili adezin olan Als3 adezyon için özellikle önemlidir. Oral epitel hücrelerinin ve vajinal hücrelerin enfeksiyonu sırasında *Candida* hücrelerinde Als3 ekspresyonu artmaktadır. Hifle ilişkili GPI bağlantılı bir protein olan Hwp1 ise memeli transglutaminazları için bir substrat görevi görerek *Candida* hiflerini konak hücrelere kovalent olarak bağlayan önemli bir adezindir (45).

4.5.2. İnvazyon

Candida türlerinin, konak hücrelere invazyonu iki farklı mekanizma kullanılarak gerçekleşmektedir. 1. indüklenmiş endositoz 2. aktif penetrasyon (45). *Candida* türlerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmaktan kaçınmada kullandığı bir strateji olan indüklenmiş endositoz, epitel hücreleriyle ilk temastan sonraki dört saat içinde gerçekleşen pasif bir olaydır (45, 46). İndüklenmiş endositoz için, mantar hücre yüzeyinde konak ligandlarına (epitel

hücrelerinde E-kaderin ve endotel hücrelerinde N-kaderin gibi) bağlanmaya aracılık eden özel proteinler (invazinler) eksprese edilmektedir ve bu invazinlerin hücre tarafından tanınması indüklenmiş endositozu tetiklemektedir (45). Bugüne kadar *C. albicans*'ta iki invazin (Als3p ve Ssa1p) tanımlanmıştır (46). Epitel hücre reseptörlerinden bağımsız olarak da, indüklenmiş endositoz meydana gelebilir. Bu durum, konak epitel hücre epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR/HER2) *Candida* hücresinde Als3p ve Ssa1p ile etkileşimi yoluyla mümkün olmaktadır (46). Aktif penetrasyon ise mantar tarafından yürütülen bir süreçtir ve canlı *C. albicans* hifleri gerektirmektedir. Konak hücrelere invazyonun bu ikinci yoluna hangi faktörlerin aracılık ettiği hala tam olarak bilinmemekle birlikte fungal adezyon ve fiziksel kuvvetlerin görev aldığı düşünülmektedir. Salgısal aspartil proteazların (SAP) da aktif penetrasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (45).

4.5.3. Hidrolitik Enzimler

Virülans sürecine katkıda bulunan faktörlerden biri, mayaların patojenitesinde merkezi bir rol oynadığı bilinen hidrolitik enzim üretimidir (52). *Candida* türleri tarafından üretilen en önemli üç hücre dışı hidrolitik enzim proteazlar, lipazlar ve fosfolipazlardır (52). Bu enzimlerin adezyon, doku penetrasyonu, invazyon, konak doku hasarı demir kazanımı ve bağışıklık sisteminin üstesinden gelmede önemli rolleri bulunmaktadır (53, 54).

Fosfolipaz: Doku invazyonu sırasında aktiviteleri çok yüksek olan fosfolipazlar, hücre zarını oluşturan gliserofosfolipidlerdeki bir veya daha fazla ester bağının hidrolizinden sorumludur (54). Yedi fosfolipaz geni tanımlanmıştır: *pla*, *plb1*, *plb2*, *plc1*, *plc2*, *plc3* ve *pld1* (53). Hidroliz ettikleri ester bağına göre A, B, C ve D olmak üzere dört tip fosfolipaz vardır. Tüm fosfolipaz tiplerinin hidrolaz aktivitesi vardır ancak fosfolipaz B (PLB), ek olarak lizofosfolipaz transaçilaz aktivitesine de sahip olması nedeniyle virülans için oldukça önem taşımaktadır. PLB, doku invazyonu sırasında hifal uçlarda bulunan 84 kDa'luk bir glikoproteindir (53). PLB, fosfolipitlerden yağ asitlerini ve lizofosfolipidlerden kalan yağ asidini serbest bırakabilir ve daha sonra serbest bir yağ asidini lizofosfolipidlere aktararak fosfolipid üretebilmektedir (54-56).

Lipaz: Mikrobiyal hücre dışı lipazların görevleri arasında besin alımı için lipidlerin sindirimi, konak hücrelere ve dokulara yapışma, bağışıklık hücrelerini etkileyerek enflamatuvar süreçlerin spesifik olmayan bir şekilde başlatılması ve rakip mikroflorayı parçalayarak kendini

savunma yer almaktadır (53). Lipazlar, triaçilgliserollerin hidrolizi yoluyla hücre zarının bozulmasında rol oynamaktadır. *C. albicans*'da lipaz enziminin kodlanmasından on gen sorumludur (*lip1-10*). Lipazların virülanstaki rolleri ise hala araştırılmaktadır (20).

Proteaz (salgisal aspartil proteazlar, SAP): Tüm proteazlar proteinlerdeki peptit bağlarının (CO-NH) hidrolizini katalize etmektedir, ancak özgülük ve etki mekanizması açısından belirgin farklılıklar göstermektedirler (52). *sap* genleri ailesi, benzer işlevlere ve karaktere sahip enzimleri kodlayan, ancak moleküler kütle, izoelektrik noktası ve optimum aktivite için gerekli pH gibi farklı moleküler özelliklere sahip on farklı *sap* (*sap 1-sap 10*) genini içermektedir. *C. albicans* hücre dışı proteazlar ürettiği bilinen tek *Candida* türü değildir. *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* de dahil olmak üzere patojenik *Candida* türlerinin çoğu *sap* genlerine sahiptir ve in vitro aktif, hücre dışı proteaz üretmektedir. *C. tropicalis*'in dört, *C. parapsilosis*'in iki ve *C. dubliniensis*'in dokuz *sap* geni bulunmaktadır (52). *C. albicans* ise 10 *sap* genine sahiptir. *sap1-sap8* ekstraselüler enzimler iken *sap9* ve *sap10* GPI ile modifiye edilmiştir ve mantar hücre duvarı ile ilişkilidir. *sap5*, *sap9* ve *sap10* genleri biyofilmlerde, oral ve vajinal kandidozlu bireylerde daha fazla ifade edilmektedir. *sap9* diğer *sap* genlerinin faaliyetlerini de düzenlemektedir, insan antimikrobiyal peptidi katelisinidin LL-37'yi inaktive etmektedir, ayrıca hücre duvarı stresine ve kaspofungine yanıt olarak ekspresyonu artmaktadır. *sap1-sap3* sadece maya hücreleri tarafından, *sap4-sap6* genleri çoğunlukla hişlerde eksprese edilir ve integrinleri bağlamaktadır. *sap6* geni ise fungal hücre yüzeyi proteazlarından ve proteolitik aktivitelerinden bağımsız olarak diğer hücre yüzeylerini bağlayabilen ligandları kodlamaktadır (57, 58). *sap7* ve *sap8*'in sentezi ve işlevi ise araştırılmaktadır.

Kollajen, laminin, fibronektin, müsin, tükürük laktoferrini, $\alpha 2$ -makroglobulin, neredeyse tüm immünoglobulinler, proenflamatuvar sitokin olan interlökin-1 β , laktoperoksidaz, katepsin D, kompleman, sistatin A ve çeşitli kan pıhtılaşma faktörlerinin öncüleri dahil olmak üzere birçok konak proteini SAP'lar tarafından hidrolize edilmektedir. SAP aktivitesi için optimum pH spektrumu 2,0-7,0 arasındadır, bu nedenle bu enzimler mantar patogeneze ve farklı bölgelerde gelişen enfeksiyonlara katkıda bulunmaktadır (54).

4.5.4. Biyofilm

Biyofilm, hücrelerin bir hücre dışı matriks (“*ekstracelluler matrix*”, ECM) ile çevrelediği, belirli işlevleri yerine getirmede uzmanlaştığı ve birbirleriyle iletişim kurduğu oldukça heterojen, çok hücreli ve çok katmanlı üç boyutlu bir yapı olarak tanımlanmaktadır (58). Sinyal moleküllerinin kontrolünde olan spesifik ve organize hücre topluluklarıdır. Biyofilm, antimikrobiyallerin penetrasyonunu sınırlandırarak ve hücreleri konak bağışıklık tepkilerinden koruyarak antifungal tedaviye önemli ölçüde direnç kazandırmaktadır. Bu etkileriyle morbidite ve mortaliteyi artıran önemli virülans faktörlerindendir (53). Biyofilm oluşum süreci dört faza ayrılmaktadır: erken (yapışma), ara (çoğalma, filamentasyon ve ECM üretimi), olgunlaşma ve yayılma (dağılma) (58). ECM’in üretimi ve içeriği türlere, suşlara, yapıştığı yüzeye ve çevresel koşullara (pH, ortam bileşimi, oksijen) bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *C. glabrata* idrar varlığında silikon yüzeylerde *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*’e kıyasla daha yüksek biyofilm biyokütlesi üretmektedir. (20). Biyofilmin, yüksek glikoz ve lipid konsantrasyonları içeren ortamlarda *C. parapsilosis* hücreleri tarafından kolayca oluşturulması sebebiyle TPN alan hastaların KAE’de *C. parapsilosis* prevalansı artmıştır (59). Ayrıca *C. parapsilosis*’ in kateterleri ve intravasküler cihazları kolonize etme kapasitesi yüksektir (60). *C. albicans*’ın aksine, *C. parapsilosis* biyofilmleri daha ince, daha az yapılıdır ve yalnızca blastosporlardan oluşmaktadır (61). Ayrıca *C. parapsilosis* biyofilmlerinin karbonhidrat içeriği oldukça fazla miktardadır. Protein içeriği ise *C. glabrata* ve *C. tropicalis* biyofilmlerinden daha azdır (53).

4.5.5. Temas Algılama ve Thigmotropizm

C. albicans’ta hif ve biyofilm oluşumunu tetikleyen önemli bir çevresel uyarı temas algılamadır. Belirli topolojilere sahip yüzeylerde (sırtların varlığı gibi), maya hücreleri hifal çoğalmaya geçmektedir (26). Agar veya mukozal yüzeyler gibi belirli substratlarda, bu hifler substratın içine doğru invaze olmaktadır. Katı yüzeylere temas durumu da biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Bu tür tepkiler için kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (45).

4.5.6. Morfogenez, Dimorfizm

Maya ve hif formları arasındaki geçiş, dimorfizm olarak adlandırılmaktadır ve her iki büyüme formu da patojenite için önemlidir. Kommensal form olarak düşünülen maya, yüzeysel kolonizasyondan ve yayılmadan; invaziv form olan hifler ise konak bariyerini aşmadan ve derin dokulara erişimden sorumludur (45, 62). Maya formundan hif formuna geçiş, besinler, nötral pH, 37-40°C sıcaklık, yaklaşık %5,5 CO₂ konsantrasyonu ve N-asetil-d-glukozamin, serum, bazı amino asitler ve biyotin varlığı ile kolaylaştırılmaktadır. Hif yapısından maya formuna geçiş ise daha düşük sıcaklıklar, asidik pH, serum yokluğu ve daha yüksek glikoz konsantrasyonu ile tetiklenmektedir (51). Fiziksel sinyallerin yanı sıra kimyasal sinyallerin de morfogenezi etkilediği gösterilmiştir. *cph1* ve *efg1* tarafından kodlanan transkripsiyon faktörü, filamentasyondan sorumludur (49).

4.5.7. Fenotipik Değişim

Fenotipik değişim, mikroorganizmanın bir dizi koloni morfolojisi arasında spontan ve reversibl olarak geçiş yapma kapasitesi şeklinde tanımlanmaktadır (63). Beyaz ve opak morfoloji geçişi 450'den fazla gen ile düzenlenmektedir ve bu farklılıklar *Candida* türlerinin patojenitesini, biyofilm oluşumunu ve antifungal ilaçlara duyarlılığını etkilemektedir (64). Farelerde beyaz hücrelerin sistemik enfeksiyon modelinde daha virülan olduğu, opak hücrelerin ise kutanöz enfeksiyon modelinde derinin kolonizasyonunda daha etkili olduğu saptanmıştır (63). Beyaz hücreler pürüzsüz ve yuvarlak görünümlüken; opak hücreler pürüzlü veya bazen pürüzsüz ancak oval şekildedir. Beyaz hücrelerin kolonileri kubbeli, opak hücrelerin kolonileri ise düz ve yarı saydam kolonilerdir (65). Çalışmalarda beyaz hücrelerin opak hücrelere göre daha virülan ve biyofilm oluşturma özelliğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (66).

4.6. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Candida türleri kommensal mikroorganizmalardır ve normal insan florasının bir parçası olarak cilt, gastrointestinal (Gİ) ve genital yollarda lokalizedirler. Ancak bazı duyarlı hasta gruplarında yüzeysel enfeksiyonlardan, septik şok ve yüksek mortalite ile ilişkili KAE'ye kadar çeşitli hastalıklara neden olabilmektedirler (1). Pediatrik ve erişkin hastalarda kandidemi, mortalitede sırasıyla %10-%14,5, yatış süresinde ortalama 10-21 gün ve hasta başına toplam

hastane masraflarında ortalama 39.331-92.266 dolar artış ile ilişkilendirilmiştir (67). Yüksek ölüm oranları ve pahalı tıbbi maliyetlere sebep olmaları nedeniyle kandidemi en büyük halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir (68). Kandidemi insidansı ve prevalansı coğrafi bölge, sağlık sistemi, hasta demografisi ve çevresel faktörler gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Toplum kaynaklı vakalar, kandidemi vakalarının dörtte birinden daha azını oluşturmaktadır. Yüksek gelirli ülkelerde genel nüfusta insidans oranları 4/100.000'tür ve *Candida* türleri tüm KAE'lerinin yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır. Dünya genelinde ise hastanede yatan hastalarda hastalık yükü belirgin şekilde daha yüksektir (100.000 yatışta 100) ve YBÜ'deki hastalarda ise en yüksek insidansa (1.000 YBÜ yatışı başına 5,5-7 atak) ulaşmaktadır. Yenidoğanlar, özellikle prematüre bebekler, daha yüksek kandidemi riski altındadır ve ABD'de 100.000 doğumda 12'ye varan bir insidans söz konusudur. Bu yenidoğanların çoğu YBÜ'de yatan SVK'sı olan ve TPN alan hastalardan oluşmaktadır (69).

İnvaziv kandidiyazis için epidemiyolojik risk faktörleri arasında siyah ırk, erkek cinsiyet, >65 yaş yetişkinler ve yenidoğanlar özellikle prematüreler olduğu (69), tıbbi risk faktörleri arasında ise kök hücre veya solid organ transplantasyonu, hematolojik veya onkolojik hastalıklar, steroidleri de içeren immünsupresif tedavi, YBÜ'de yatış, nötropeni ve cerrahi en sık rastlananlardır (69, 70). Bu hasta gruplarında, hastaların immünsupresif olması, tıbbi cihazlar veya mukozal enflamasyon nedeniyle epitelyal bariyerlerin bozulması ve antibiyotik tedavisi ile *Candida* türleriyle artan kolonizasyon sonucunda kandidemi meydana gelmektedir (68). Geniş ve tam kat yanıklar, Gİ perforasyonlar, akut veya nekrotizan pankreatit, Gİ cerrahi, kemoterapinin neden olduğu mukozit, kalıcı intravasküler kateterlerin varlığı ve idrar sondası nedeniyle cilt veya mukozal bariyerlerdeki hasarlar, *Candida* türlerinin kan akımına geçme olasılığını arttırmaktadır. TPN, hemodiyaliz veya periton kateterleri, sol ventrikül destek cihazları, ventriküloperitoneal şantlar veya ventrikül drenleri gibi kalıcı protez malzemeleri olan hastalar da normal anatomik savunmanın bütünlüğünü kaybetmesi nedeniyle yüksek invaziv *Candida* enfeksiyonu riski altındadır (69, 70).

Candida enfeksiyonu gelişebilecek hasta gruplarını belirleyip erken tedavi başlanmasına yardımcı olabilmesi amacıyla risk faktörlerinin varlığına dayanan bazı skorlama sistemleri kullanılmaktadır. Bu skarlardan ilki ve en basit olanı Kandida Kolonizasyon İndeksi (KKİ)'dir. *Candida* üremesi saptanan kan kültürü dışındaki vücut bölgelerinin sayısının kültür uygulanan örnek sayısına oranı şeklinde hesaplanmaktadır. KKİ'nin $\geq 0,5$ olması (bölgelerin %50'sinin aynı türe sahip olması), kandidemi riskinde bir artış olduğunu göstermektedir (71). Nötropenik olmayan kritik hastalarda mantar kolonizasyonu ve enfeksiyonu insidansını

belirlemek amacıyla León ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen ikinci bir indeks ise Kandida Skoru'dur (72). YBÜ'ye kabul sırasında ameliyat, TPN kullanımı, sepsis ve çoklu organ kolonizasyonunu kandidemi ile ilişkili risk faktörleri olarak tanımlamışlardır ve puanlama sonucunda Kandida Skoru $\geq 2,5$ olarak saptandığında invaziv kandidiyazis riskinde yaklaşık sekiz katlık bir artış olduğu saptanmıştır. Çok merkezli bir çalışma grubu tarafından üçüncü bir skor geliştirilmiş (Ostrosky klinik tahmin kuralı) ve intravasküler kataterin varlığı ve antibiyotik kullanımı majör risk faktörleri; herhangi bir ameliyat, immünsupresif tedavi, pankreatit, TPN, diyaliz, mekanik ventilasyon veya steroid kullanımı ise minör risk faktörleri olarak saptanmıştır (73). Bu tanısal skorların en büyük avantajı, yüksek negatif prediktif değerlerinin olmasıdır. Negatif skoru olan hastalarda kandidemi gelişme olasılığı %1'in altındadır (74).

4.7. Klinik Tablolar

Candida türlerinin neden olduğu fırsatçı mantar enfeksiyonları kandidiyazis olarak isimlendirilmektedir (18). Deri hastalıkları gibi yüzeysel enfeksiyonlar; orofarengeal veya vulvovajinal kandidiyazis gibi mukozal enfeksiyonlar; ve invaziv/sistemik olmak üzere kandidiyazis çeşitli şekillerde görülmektedir (75). Yüzeysel kandidiyazis, normal florada bulunan saprofitik *Candida* blastosporlarının deri, GI, vajinal, özofageal ve orofaringeal mukozayı etkileyerek beyaz lezyonlar veya plaklar oluşturmasıyla ortaya çıkan oldukça sık görülen enfeksiyonlardır (18). Kadınların yaklaşık %75'i yaşamları boyunca en az bir kez vulvovajinal kandidiyazis geçirmektedir. Orofaringeal kandidiyazis ise insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunun ilk belirtilerinden biridir ve HIV pozitif hastaların %90'ında görülmektedir (76).

İmmünsupresif bir konakta, yüzeysel kandidiyazis, *Candida* türlerinin kan dolaşımına geçmesiyle kandidemi adı verilen invaziv/sistemik kandidiyazise dönüşebilir ve hayati organları kolonize ederek dissemine kandidemiye neden olabilir. Bu; KAE, kateterler gibi invaziv tıbbi cihazlar yoluyla da meydana gelebilmektedir (18). İnvaziv/sistemik kandidiyazis yüzeysel enfeksiyonlardan daha az sıklıkta görülmekle birlikte, her bir *Candida* türü için %35-80 arasında değişen yüksek mortaliteye sahiptir ve küresel olarak yılda yaklaşık 1,5 milyon ölümle sonuçlanmaktadır (76). *C. albicans*, kandidemi ve invazif kandidiyazisten sorumlu baskın *Candida* türü olsa da NAC türlerinde son yıllarda küresel olarak bir artış gözlenmektedir (18).

İnvaziv kandidiyazis kliniği, derin yerleşimli kandidiyazis olmadan oluşan kandidemi, derin yerleşimli kandidiyazis ile ilişkili kandidemi ve kandidemi ile ilişkili olmayan derin yerleşimli kandidiyazis olmak üzere üç farklı şekilde görülmektedir (77, 78). Primer kandidemi çoğunlukla kommensal olarak bulunan *Candida*'nın Gİ sisteme translokasyonundan veya intravenöz kateterin kontaminasyon/kolonizasyonundan kaynaklanmaktadır. Primer kandidemilerin yaklaşık %50'si hematogen yayılım yoluyla sekonder derin yerleşimli kandidiyazise neden olmaktadır. Primer derin yerleşimli kandidiyazis ise *Candida*'nın en sık Gİ hasarını takiben karın boşluğuna geçmesi veya enfekte periton kateteri gibi yollarla steril bölgelere nonhematojen olarak girmesinden kaynaklanmaktadır. Bu tür primer derin yerleşimli kandidiyazislerin yalnızca %5-20'si kandidemiye (sekonder kandidemi) yol açmaktadır (77).

SVK ve diğer intravasküler cihazlar yaygın olarak kandidemi ile ilişkilendirilmektedir (79). Kandidemili hastalardaki mortalite, tedavi ve/veya kaynak kontrolünün zamanlamasıyla yakından ilişkili olarak saptanmıştır. Uygun antifungal tedavi ile erken müdahale ve kontamine SVK'nın çıkarılması veya enfekte materyalin drenajı mortalite üzerinde olumlu sonuçlarla ilişkilidir (79). İnvaziv kandidiyazis, yenidoğan kandidiyazisi, akut dissemine kandidiyazis, endokardit, osteomyelit, artrit, endoftalmit ve kronik dissemine kandidiyazis gibi çeşitli klinik şekillerde görülebilmektedir (80).

4.8. Kandideminin Laboratuvar Tanısı

4.8.1. Kültür

İnvaziv kandidiyazis ve kandidemi tanısında kullanılan altın standart yöntem kan kültürüdür ve bu yöntemin duyarlılığı %50-60 arasındadır. *Candida* türleri için pozitif olan kan kültürlerinin çoğu (%95'i) 96 saat içinde pozitif hale gelmektedir, ancak pozitifliğe kadar geçen süre türe bağlı olarak (örneğin *C. glabrata*, *C. albicans*'tan daha yavaş; *C. parapsilosis* ise daha kısa sürede pozitiflik vermektedir) değişmektedir. Kan kültürünün duyarlılığını etkileyen diğer faktörler arasında kan hacmi, antifungal ilaç kullanımı ve spesifik kan kültürü tekniği yer almaktadır (78). CO₂'nin kolorimetrik tespiti yoluyla bakteri üremesini sürekli olarak izleyen otomatik kan kültürü sistemlerinde, üremenin tespit edilmesine kadar geçen süre bakteri yüküyle ters orantılıdır ve kantitatif kan kültürlerinin yerine kolaylıkla kullanılmaktadır (81).

Kültürler canlı *Candida*'yı tespit etmede duyarlıdır ve ilk pozitif kan kültürü sırasında ortalama *Candida* konsantrasyonu, 1 Koloni Oluşturan Birim (KOB)/ml'dir. Kan kültürleri, aktif kandidemi sırasında alınırsa çoğu hastada pozitif olarak saptanmaktadır. Ancak *Candida* kan dolaşımından temizlendikten sonra devam eden derin yerleşimli enfeksiyonla komplike olan kandidemili hastaların yalnızca %40'ında pozitifdir ve kandidemi ile ilişkili olmayan derin yerleşimli kandidiyazis hastalarında ise negatiftir. Bu sebeple invaziv kandidiyazis spektrumu boyunca, kan kültürlerinin duyarlılığı %50'dir. Yavaş geri dönüş süresi (tanımlama süresi beş güne kadar uzamaktadır) ve hastalık seyrinin sonlarına kadar pozitif saptanmamaları kan kültürlerinin diğer kısıtlamaları arasında yer almaktadır. Derin enfeksiyon bölgelerinden toplanan materyallerin kültürleri de küçük örnek hacimleri, *Candida* hücrelerinin düzensiz dağılımı ve düşük *Candida* yükü sebebiyle yaklaşık %50 duyarlılığa sahiptir. Ayrıca, derin doku kültürlerinin toplanması, *Candida* enfeksiyonu riski taşıyan hastalarda riskli veya kontrendike olabilecek invaziv prosedürler gerektirmeleri sebebiyle tercih edilmemektedir (77, 78, 82).

4.8.2. *Candida* Türlerinin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Candida türleri, KKA ve beyin-kalp infüzyon agar, SDA veya SDA-Emmons agar, patates dekstroza agarda 36-72 saat arasında üremektedir. Sikloheksimid içeren besiyerleri üremelerini engellediğinden dolayı *Candida*'dan şüpheleniliyorsa kullanılmamalıdır; ancak *C. albicans* %0,04 sikloheksimid içeren besiyerlerinde üreyebilmektedir (16, 83).

4.8.3. Germ Tüp Oluşumunun İncelenmesi

C. albicans'ın ön tanımlamasında kullanılan hızlı ve basit testlerden biridir ancak *C. albicans* izolatlarının tümü germ tüp oluşturmaz (%5). Bu testte, psödohipf oluşturan *C. tropicalis* ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca *C. dubliniensis* de germ tüp pozitifdir. *C. parapsilosis* gerçek hif üretmemektedir ve germ tüp testi negatiftir. Pozitif test kontrolü olarak bilinen bir *C. albicans* kültürünün kullanılmasına ek olarak, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın kullanıldığı negatif kontroller de teste dâhil edilmelidir (84).

4.8.4. Mısır Unlu Agarda Üreme Şekilleri

Mısır unlu agarda yalancı hif ve blastokonidya varlığı *Candida* cinsinin bir özelliğidir. Germ tüp negatif izolatların tanımlanmasında faydalıdır. Ancak, *C. albicans* izolatlarının klamidospor üretiminin gözlenmesi dışında kesin tanımlama yapılamamaktadır. Karbonhidrat asimilasyon testleri veya ticari maya tanımlama sistemleri ile yapılan tür tanımlamasında kalite kontrolü sağlaması açısından önem taşımaktadır. *C. parapsilosis* bu besiyerinde çalı şekline benzeyen, ekim çizgilerine bitişik çok sayıda fokal alanı olan satellit üreme paterni göstermektedir (85).

4.8.5. Kromojenik Agarlar

Koloni özelliklerine dayanarak *Candida* türlerinin olası tanımlaması, kromojenik agar besiyeri ile elde edilebilir (86). Özellikle kan kültürlerinin %3-10'unda gözlenen karışık üremelerde koloni morfolojisi ve renklerindeki farklılıklar ile *Candida* türleri arasında ayırım yapılabilmektedir. Bu agarlar kloramfenikol içermeleri nedeniyle seçici besiyerleridir. Renkler, her bir türe özgü enzim için kromojenik substratların karışımının bir sonucu olarak oluşmaktadır. İzolatların 30 °C veya 37 °C'de inkübasyonu, belirli bir tür için aynı renkte koloniler üretmektedir ve üreticinin önerilerine göre tanımlama yapılmaktadır (83, 85).

4.8.6. Asimilasyon ve Fermantasyon Testleri

Asimilasyon, bir mayanın oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak belirli bir karbonhidratı kullanma yeteneğini ölçen testlerdir(87). Karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımına ise fermentasyon denir. Wickerham sıvı besiyeri asimilasyonu ve fermentasyon testleri gibi geleneksel testler güvenilir yöntemlerdir ancak sonuçların elde edilmesinin oldukça karışık bir süreç olması ve uzun sürmesi nedeniyle klinik laboratuvarlarda nadiren kullanılmaktadır. Günümüzde otomatize sistemlerde kullanılan testlerdir (83, 84).

4.8.7. Serolojik Yöntemler

4.8.7.1. Antijen Tespiti

Çoğu *Candida* antijeninin, düşük serum konsantrasyonları ve kan dolaşımından hızlı bir şekilde temizlenmesi nedeniyle tanıda sınırlı bir yere sahiptir. En başarılı hedefler mannan ve BDG gibi hücre duvarının bol miktarda bulunan bileşenleridir (77). Mannan, *Candida* hücre duvarının önemli bir bileşenidir, toplam kuru hücre ağırlığının %7'sini oluşturmaktadır ve enfeksiyon sırasında kan dolaşımına salınmaktadır. ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) formatında kan (serum) örneklerinde mannan antijeni varlığının tespiti genel olarak %40-60 duyarlılık ve %93-98 özgüllük ile kandidemi tanısında kullanılmaktadır. Kısa yarı ömrü olması nedeniyle yüksek riskli hastalarda testin haftada iki veya üç kez yapılması önerilmektedir (77, 88, 89). BDG, *Cryptococcus* türleri, *Blastomyces* türleri ve *Mucorales* hariç olmak üzere *Candida* ve çoğu patojenik mantarın önemli bir hücre duvarı bileşenidir. Test, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Çoğunlukla YBÜ hastalarında değerlendirilmiş olup, genel duyarlılığı %77 ve özgüllüğü %85 olarak saptanmıştır (88). Hücre duvarındaki daha düşük BDG içeriği nedeniyle *C. parapsilosis* enfeksiyonları için BDG duyarlılığı daha düşük saptanmıştır (77). Bu durum özellikle *C. parapsilosis* prevalansının yüksek olduğu bölgelerde dikkate alınmalıdır (86). Test haftada iki kez uygulanmaktadır ve tek bir pozitif test sonucu enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Antifungal tedaviye yanıt veren hastalarda BDG titrelerinin giderek azaldığı ve sonunda negatifleştiği gösterilmiştir. En büyük dezavantajı, hemodiyaliz, abdominal cerrahi, β -laktam antibiyotiklerle tedavi ve Gram negatif bakteriyemiye bağlı lipopolisakkarit varlığı gibi çeşitli durumlara bağlı yanlış pozitif sonuçlara sebep olmasıdır. Ancak, testin negatif prediktif değerinin yaklaşık %100 olması nedeniyle, BDG saptanmaması invaziv mantar enfeksiyonunu dışlamak için oldukça yararlıdır (88).

4.8.7.2. Antikor Tespiti

Anti-*Candida* antikor testleri ile ilgili en büyük endişeler, immünsupresif hastalarda duyarlılığın azalabileceği, tespit edilebilir yanıtların oluşması için zamana ihtiyaç olması, pozitif sonuçların akut enfeksiyonları geçmiş enfeksiyonlardan ayırt edememesi ve *Candida*’ların flora üyesi olmasıdır. Bu endişelere rağmen, çeşitli antikor testleri nötrofil ve

hücre aracılı immün defekti olan hastalar da dâhil olmak üzere çalışmalarda iyi performans göstermiştir. Serum immünoglobulin G (IgG) yanıtlarını ölçen testler, genel olarak, IgM ölçen testlerden daha iyi performans göstermiştir, bu da birçok hastanın hızlı amnestik yanıtlar verdiğini düşündürmektedir. NAC türleri ile enfekte olan hastalar da, *C. albicans* antijenlerine verilen yanıtlarla tanımlanabilmektedir (77). Bir kandidemi atağından sonra kısa yarı ömre sahip olan mannan kaybolduğunda hastalarda gelişen anti-mannan antikorlarını tespit eden ELISA tabanlı testin genel duyarlılığı çeşitli çalışmalarda %59 ve genel özgüllüğü %83 olarak bildirilmiştir. Test eş zamanlı mannan antijen tespiti ile birleştirildiğinde, kandidemili hastalarda duyarlılık ve özgüllük değerleri önemli ölçüde artmıştır (sırasıyla %83 ve %86). Çalışmalar, mannan ve anti-mannan antikorlarının tespitinin, invaziv kandidiyazlı hastalarda, özellikle enfeksiyonun mikrobiyolojik olarak belgelenmesinin daha zor olduğu hepato-onkolojik hastalarda, tek başına her iki testten daha yararlı bir tanı yardımı sunduğunu göstermiştir. İndirekt immüno Floresan testi ile *C. albicans* germ tüp antikorunun (CAGTA, IgG) tespitinin genel duyarlılığı %77-89 ve özgüllüğü %91-100 arasında değişmektedir. Bu testin kritik hastalarda kandidemi tanısında doğrulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (77, 88).

4.8.8. Moleküler Yöntemler

DNA tabanlı olmayan moleküler teknikler arasında, çeşitli enzimatik proteinlerin göçünü jel bazlı analizi yoluyla değerlendirerek polimorfizmleri tahmin edebilen “multilocus enzyme electrophoresis” (MLEE) bulunmaktadır. DNA tabanlı moleküler tekniklerden PZR, nükleik asit dizi analizi, peptit nükleik asit-floresan in-situ hibridizasyon (“Peptide nucleic acid-fluorescent in situ hybridization”, PNA-FISH), “Pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE), “Restriction enzyme analysis” (REA), “Random amplified polymorphic DNA (RAPD), “Amplified fragment length polymorphism” (AFLP) gibi yöntemler tanı ve tiplendirmede kullanılmaktadır (90). *Candida* KAE'leri için moleküler testlerin geliştirilmesinde potansiyel olarak sınırlayıcı bir faktör organizma yüküdür. Kandaki mililitre başına düşen *Candida* sayısı hastalığın erken döneminde düşükse, DNA tabanlı bir testin beklenen duyarlılığı düşük saptanmaktadır. Güvenilir DNA tabanlı PZR analizlerinde tespit için gereken tahmini *Candida* yükü 5-10 KOB/ml'dir (82).

Kan kültüründen gerçekleştirilen moleküler testler: Bu test sistemleri pozitif kan kültürlerinden çalışılmaktadır. Bu nedenle, kan kültürünün pozitifleşmesi için gereken süre

ortadan kaldırılamamaktadır, ancak patojen yükünün yüksek olması nedeniyle bu testlerin duyarlılığı yüksektir (91). Bu yöntemler arasında, matriks aracılı laser desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrofotometrisi (“*Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrophotometry*”, MALDI-TOF MS) ile tanımlama yapabilen yöntemler, multipleks PZR tabanlı yöntemler, “nested” multipleks PZR sistemleri, otomatize FISH tekniği kullanan yöntemler bulunmaktadır.

Kan kültüründen bağımsız moleküler testler: Pozitif kan kültürlerini beklemeye gerek kalmadan doğrudan tam kan, serum veya plazma örneklerinde gerçekleştirilebilen bu testlerde, zaman tasarrufu potansiyeli kan kültürüne bağlı test sistemlerine göre daha yüksektir ancak kandaki patojen yükü düşük olduğundan, bu test sistemlerinin duyarlılığı bir sorun olabilmektedir (91). Hedefe yönelik multipleks testler ve geniş spektrumlu/panfungal testler bu testler arasında yer almaktadır. Tüm mantar türlerinde bulunan korunmuş hedef bölgeleri çoğaltmaya dayalı geniş spektrumlu/panfungal testlerde türlerin tanımlanması için, elde edilen ampikonların daha fazla analiz edilmesi gerekmektedir. Panfungal testlerin duyarlılığı türe özgü primerlerle belirli patojenleri hedefleyen testlere göre düşüktür ancak sadece en sık görülenleri değil tüm fungal patojenleri tespit etme yeteneğine sahiptir. Hedefe yönelik multipleks PZR testlerinde ise negatif sonuç invazif bir mantar enfeksiyonunu dışlamak için yeterli değildir. Bu nedenle, klinik mikrobiyoloji/mikoloji laboratuvarı tarafından oluşturulan raporlarda hangi patojenlerin kapsandığının belirtilmesi önemlidir. Nükleik asitlerin ekstraksiyonu için kullanılan protokolün testin sonucu üzerinde etkisi olması sebebiyle, kendi DNA ekstraksiyon yöntemine sahip olmayan analizlerin standartlaştırılması daha zordur (91).

4.9. *Candida* Enfeksiyonlarında Tedavide Kullanılan Antifungal İlaçlar

Konak hücreler için toksik olmadan ökaryotik maya mantarlarına etkili bir ilaç hedefinin bulunmasındaki zorluklardan dolayı antifungal ilaçların geliştirilmesi antibiyotiklere kıyasla daha sınırlı olmuştur (20).

4.9.1. Polienler

Bugüne kadar yaklaşık 100 polien antibiyotik tanımlanmasına rağmen çok azı klinik kullanım için geliştirilmiştir. Amfoterisin B ve lipid formülasyonları sistemik mantar

enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan en eski antifungal ilaçlardır. Polienler, duyarlı mantar hücrelerinin membranlarındaki başta ergosterol olmak üzere sterollere bağlanarak membran bariyer fonksiyonunun bozulmasına, porin kanallarının oluşumu ile hücre bileşenlerinin sızmasına, transmembran potansiyelinin kaybına, metabolik bozulmaya ve hücre ölümüne neden olmaktadır (92). Membran permeabilize edici etkilerine ek olarak, hücre membranının lipoperoksidasyonuna bağlı bir dizi oksidatif reaksiyon yoluyla mantar hücrelerinde oksidatif hasara neden olabilmektedir. Ayrıca, polienler makrofaj aktivasyonuna yol açan immünomodülatör ajanlar olarak hareket edebilmektedirler (93, 94). Amfoterisin B memeli hücre membranlarının ana sterolu olan kolesterole de bağlanır, ancak bunu ergosterole göre daha az avidite ile yapmaktadır. Kolesterole bağlanma, amfoterisin B'nin gözlemlenen toksisitesinin çoğunu oluşturmaktadır (95). Amfoterisin B, başlangıçta amfoterisin B deoksikolat olarak formüle edilmiştir, ancak uzun süreli tedavi ve/veya yüksek dozlarda renal distal tübül membranlarında kolesterol ile etkileşime girerek nefrotoksositeye sebep olmuştur (95). 1990'lı yıllarda, amfoterisin B'nin nefrotoksik etkisini hafifletmek amacıyla lipidle bağlandığı yeni formülasyonlar geliştirilmiştir (94). Formülasyondaki kolesterol, mantar hücre duvarına ulaşana kadar ilacı bağlamaktadır. Lipozomal formülasyondaki lipozomlar daha sonra mantar hücre duvarına bağlanarak ilacın ergosterol ile etkileşime girmesini sağlamaktadır (95).

4.9.2. Pirimidinler: Flucytosine (5- fluorocytosine)

En eski antifungal ilaçlardan biridir. İlk olarak 1957 yılında sentezlenmiş, ancak *Cryptococcus neoformans* ve *Candida* türlerine karşı aktivitelerinin gösterildiği 1964 yılına kadar önemli antifungal özelliklere sahip olduğu keşfedilmemiştir (96). Başlangıçta anti-kanser ilaç olarak geliştirilmiş bir florlu pirimidin türevidir. Mantar hücresine *fcy2* tarafından kodlanan sitozin permeaz ile aktif olarak taşınarak, biri protein sentezi inhibisyonu diğeri DNA sentezi inhibisyonu olmak üzere iki bağımsız mekanizma ile mantar hücresine hasar vermektedir. Hem DNA hem de RNA sentezini inhibe etmektedir. Flusitozin, pürin ve pirimidin alımının yarışmalı inhibisyonu yoluyla doğrudan ve 5-florourasile hücre içi metabolizma yoluyla dolaylı olarak mantarlar üzerinde etkilidir (16, 96). Sitozin permeaz ile hücre içine giren flusitozin, *fcy1* geni tarafından kodlanan sitozin deaminaz tarafından hücre içi deaminasyonla 5-florourasile dönüştürülür. İnsanlar ve diğer memeliler bu enzime sahip olmadığından flusitozin memeli hücrelerinde DNA ve RNA sentezini inhibe etmemektedir (97). Mantarlarda 5-florourasil daha sonra iki farklı nükleotide dönüştürülür: 5-florouridin trifosfat ve 5-florodeoksiuridin monofosfat. 5-florourasil *fur1* genleri tarafından kodlanan urasil fosforibozil

transferaz enzimi ile 5-fluorouridin monofosfata ardından 5-fluorouridin trifosfata dönüştürülür (98, 99) 5-fluorouridin trifosfatın RNA sentezine katılması RNA'dan amino asit translasyonu sırasında yanlış kodlama ile sonuçlanır ve protein sentezi sırasında yapısal anormalliklere neden olur. 5-fluorodeoksiuridin monofosfat ise DNA sentezi için gerekli timidilat sentazı inhibe etmektedir. Sonuçta hedef hücrede dengesiz büyüme ve ölüm meydana gelmektedir (16, 100). Antifungal monoterapi olarak kullanıldığında hızlı direnç oluşması nedeniyle genellikle amfoterisin B veya flukonazol ile birlikte uygulanmaktadır (101).

4.9.3. Azoller

Azoller, 1944 yılından bu yana mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan en önemli antifungal ilaç sınıflarından biri olmuştur. İmidazoller (iki nitrojen) ve triazoller (üç nitrojen) olarak azol halkarındaki nitrojen atomlarının sayısına göre kimyasal olarak kategorize edilmektedirler. Ketokonazol, bifonazol, mikonazol ve klotrimazol imidazoller arasında yer alırken; itrakonazol, flukonazol, isavukonazol ve vorikonazol ise triazoldür (101). Mikonazol ve klotrimazol topikal; diğerleri ise çeşitli sistemik ve lokalize mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan oral ilaçlardır (102). İmidazollerin çoğu, toksik etkilerinden dolayı (sistemik olarak kullanılabilen ketakonazol hariç) topikal olarak kullanılmaktadır. İnvaziv mantar hastalığının tedavisinde ise triazoller kullanılmaktadır. *A. fumigatus'* a karşı fungisidal aktiviteye sahip olan vorikonazol dışında, azoller tipik olarak fungistatiktir (103, 104).

Tüm azoller, ergosterol biyosentezinde görev alan, *erg11* veya *cyp51* tarafından kodlanan fungal sitokrom P450/lanosterol 14- α -demetilaz enziminin aktif bölgesinde bulunan hem grubundaki bir demir atomuna bağlanmaktadır. Bu enzim lanosterolün ergosterole dönüşümünde lanosterol ve diğer sterol prekürsörlerinden monooksidasyon tepkimesi ile 14-alfa metil grubunun uzaklaştırılmasını (demetilasyon) sağlamaktır. Azolün hedefine bağlanması lanosterolün demetilasyonunu inhibe ederek ergosterol tükenmesine ve toksik sterol ara ürünlerinin birikmesine neden olur, bu da hücre zarının normal yapısının ve işlevinin bozulmasına, ciddi membran stresine ve sonuçta hücrel büyüme ve bölünmenin engellenmesine sebep olmaktadır (95, 103).

Azoller insan karaciğer sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilir ve bu enzimlerin inhibitörleri diğer ilaçların metabolizması üzerinde önemli etkilere yol açmaktadır. Bu durum özellikle antifungal profilaksi veya invazif fungal enfeksiyon tedavisi için azol

verilen hematoloji ve solid organ nakli yapılan hastalarda, immünsupresanların ve diğer ilaçların seviyelerini etkileyebileceği için önem taşımaktadır. Ketokonazol, itrakonazol ve posakonazol CYP3A4, flukonazol CYP2C9 ve CYP3A4, isavukonazol CYP3A4 ve CYP3A5 ve vorikonazol CYP2C19, CYP2C9 ve CYP3A4 tarafından metabolize edilir ve CYP2C19 metabolizmada önemli bir role sahiptir. CYP2C19 polimorfiktir ve farklı genotipler vorikonazolün farmakokinetiğinde önemli bir role sahiptir (95). Ayrıca doksisiklin gibi ilaçlar, muhtemelen hem ile ilişkili demiri tüketerek flukonazol gibi azollerin etkisini artırmaktadır. Azollerin ana hedef bileşenleri olan kitin, glukan ve mannan insan vücudunda bulunmadığından ve ergosterol ile kolesterol (konak hücre duvarlarının ana sterolü) arasındaki yapı farkı nedeniyle konak hücre duvarlarına müdahale etmezler (68, 105-107).

4.9.4. Ekinokandinler

Ekinokandinler (mikafungin, kaspofungin ve anidulafungin), hücre duvar sentezini BDG sentaz enzimini inhibe ederek bozmaktadırlar. Duyarlı mantarların hücre duvarının önemli bir fibriler yapısal elemanı olan BDG oluşumunun inhibisyonu meydana gelmektedir. İnhibisyon, hücrenin ozmotik lizisine ve sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır (94). Ekinokandin ilaçlar, *Candida* türlerinde üç *fks* geni tarafından kodlanan BDG sentazın majör alt birimi olan Fksp'ye bağlanmaktadır (108, 109). Ekinokandinler *Candida* türleri için fungisidal, *Aspergillus* spp.'de hiflerin apikal uçlarının büyümesini engelleyerek fungistatiktir (94). Moleküler ağırlıklarının yüksek olması ve oral biyoyararlanımlarının düşük olması nedeniyle, ekinokandinler sadece intravenöz olarak kullanılmaktadır (94). İnvaziv kandidiyaza karşı etkili oldukları, *Aspergillus* türlerine karşı orta düzeyde etkinlik gösterdikleri, ancak *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. veya *Mucorales*' in neden olduğu enfeksiyonlarda etkisiz oldukları kanıtlanmıştır (95, 100).

4.9.5. Alilaminler

Alilamin sınıfı antifungal ilaçlar ergosterol biyosentezini inhibe ederek mantar büyümesini engeller ve genellikle yüzeysel dermatofitozların kontrolü için önerilmektedirler. Bu ilaçlar arasında terbinafin (oral ve topikal) ve naftifin (topikal) bulunmaktadır (110). Terbinafin, skualenin skualen-2,3 epokside dönüşümünü katalize eden enzim olan fungal skualen epoksidazı seçici olarak inhibe ederek, ergosterol eksikliğine sebep olmaktadır. Bu

durum hücre membranının bütünlüğüne zarar vererek azol antifungal bileşiklerde görülene benzer bir fungistatik etkiye neden olmaktadır. Bu etkiye ek olarak, toksik etki gösteren skualenin hücre içinde birikimine neden olarak fungisidal bir etki göstermektedir. Terbinafinin insan sitokrom P-450 enzim ailesine afinitesi çok düşük olduğundan dolayı ilaç etkileşimleri azollerden daha azdır (96, 111).

4.10. Antifungal Duyarlılık Testleri (AFDT)

Ağır immünsüpresyon, uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotiklere maruz kalma, implante edilmiş tıbbi cihazlar gibi invaziv mantar enfeksiyonu için risk faktörleri taşıyan hastaların sayısındaki artışlar nedeniyle son yıllarda AFDT'ne ihtiyaç artmıştır. Ekinokandin sınıfı antifungallerin eklenmesi ve klinik olarak mevcut triazollerin sayısının artması, antifungal ilaçların kapsamını genişletmiştir (112). Ayrıca, antifungal ilaçların artan kullanımı nedeniyle duyarlı türlerin yerini dirençli türler almış ve bunların tedavisinde kullanılan sekonder antifungallere de direnç gelişimi sonucu mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisi değişmiştir (113). Bu sebeple antifungal ilaç direncini tespit edilmesi, spesifik bir mantar türü için en iyi tedavinin belirlenmesi, antifungal direncin yerel ve küresel epidemiyolojisinin belirlenmesi ve yeni antifungal ilaçların değerlendirilmesi amacıyla doğru in vitro duyarlılık verilerine olan ihtiyaç her zamankinden daha fazladır (112, 113).

AFDT sıklıkla klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından uygun antifungal ilacın seçimine yardımcı olacak bir araç olarak gerçekleştirilmektedir. Tanım gereği, bir organizmayı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak adlandırılan gözle görülür düzeye kadar inhibe etmek için gereken ilaç konsantrasyonunu belirleyerek duyarlılığın ve direncin in vitro ölçümünü sağlamaktadır (112). Daha fazla terapötik seçenek mevcut oldukça, hem intrinsik hem de edinsel antifungal direnci tespit etmenin değeri ve antifungal ilaç seçiminin optimizasyonuna ihtiyaç artmıştır. Hangi mantar enfeksiyonlarının tedaviye yanıt verip vermeyeceğini tahmin etme ihtiyacının artmasıyla birlikte, laboratuvar için standartlaştırılmış test yöntemlerinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. AFDT için standardizasyon, tekrarlanabilir teknikler uygulamak, tedaviye yanıtı güvenilir bir şekilde tahmin etmek, raporlamada standardizasyon sağlamak ve laboratuvarlar arası karşılaştırmaları ve anlaşmayı kolaylaştırmak için çok önemlidir. Organizmanın inokulum miktarı, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve test için kullanılan ortam dahil olmak üzere in vitro AFDT'nin sonucunu birçok faktör etkilemektedir. Bu tür faktörlerin değişkenliğinin nihai MİK değeri üzerindeki etkisini en aza

indirmek, standardizasyonun arkasındaki temel mantıktır. Standardizasyon olmadan, MİK değerlerinin laboratuvarlar arası karşılaştırmaları mümkün değildir (112).

Mikrodilüsyon yöntemleri, altın standart veya referans AFDT teknikleridir. İki kuruluş, EUCAST ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), AFDT'yi gerçekleştirmek için standartlaştırılmış yöntemlere sahiptir ve dirençli *Candida* izolatlarını belirlemeye yönelik bazı antifungallerin sınır değerlerini geliştirmişlerdir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemleri, klinik laboratuvarlar için zaman alıcı, emek yoğun ve zahmetli testlerdir. Manuel, yarı otomatize ve otomatize yöntemler de dâhil olmak üzere ticari olarak temin edilebilen bazı yöntemlerin, karmaşık işlem adımları yoktur ve antifungal ilaçları rutin kullanımda *Candida* izolatlarına karşı in vitro olarak test etmek için uygun maliyetli alternatif yöntemler olarak son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (113).

4.10.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleri

4.10.1.1. Referans Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleri

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI): 1985 yılında, daha önce Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCLS) olarak bilinen CLSI, AFDT üzerine bir alt komite oluşturmuş ve 1997 yılında M27A "Mayaların Sıvı Dilüsyon Antifungal Duyarlılık Testi için Referans Yöntem; Onaylanmış Standart" belgesini yayınlamıştır. Bu belge, bazı antifungaller ve bunların *Candida* ve *Cryptococcus* gibi mayalara karşı etkileri için MİK ve karşılık gelen klinik sınır değerleri ile referans suşları tanımlamıştır. O tarihten bu yana çeşitli güncellemeler yapılarak en son versiyonu 2020 yılında M60 dökümanında yayımlanmıştır (113, 114).

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST): EUCAST'ın AFDT alt komitesi 1997 yılında kurulmuş ve 2008 yılında mayalar (*Cryptococcus* dâhil) için bir duyarlılık testi standardı yayınlamıştır. 2023 yılında bu standardın son güncellemesi yapılarak EUCAST web sitesinde (www.eucast.org) ücretsiz olarak çevrimiçi erişime açılmıştır (6).

Her iki referans yöntem (CLSI, EUCAST) arasındaki farklar temel olarak inokulum miktarı, inkübasyon süresi, besiyeri içeriği ve sonuçların değerlendirimi ile ilgilidir. Bu farklılıklara rağmen, her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılabilir niteliktedir (115).

Her iki yöntemde de RPMI (“*Roswell Park Memorial Institute*”) sıvı besiyeri kullanılmakta olup besiyeri içeriğindeki glukoz oranı CLSI’da %0,2, EUCAST’da ise %2 oranındadır (112). CLSI yönteminde antifungal ilaç stok konsantrasyonu en az 1280 µg/ml veya test edilecek en yüksek konsantrasyonun 10 katı (hangisi daha büyükse) olacak şekilde hazırlanırken; EUCAST, test edilecek en yüksek konsantrasyondan en az 200 kat daha yüksek konsantrasyonlarda ilaç stoklarının hazırlanmasını önermektedir. CLSI, mikroorganizmanın en az iki kez alt kültür yapıldıktan sonra test edilmesini önerirken EUCAST yönteminde herhangi bir alt kültür sayısı belirtilmemiştir. CLSI’da kullanılan mikropak U tabanlı iken EUCAST doku ile muamele edilmiş düz tabanlı mikropak kullanılmasını tavsiye etmektedir. İki yöntem arasındaki diğer bir fark ise inokulum miktarlarıdır; CLSI $0,5-2,5 \times 10^3$ hücre/ml, EUCAST ise $1-5 \times 10^5$ hücre/ml olarak kullanılacak mikroorganizma miktarını standardize etmiştir. Sonuçlar CLSI’da görsel olarak değerlendirilirken, EUCAST spektrofotometrik değerlendirilmeyi önermektedir. Ayrıca amfoterisin B için CLSI üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuğu MİK değeri olarak belirlerken EUCAST %90 inhibisyonun olduğu kuyucuğu MİK değeri olarak saptamaktadır. Her iki yöntemde de azoller ve ekinokandinler için üremede %50 inhibisyon MİK değerini vermektedir (112, 116).

Referans sıvı dilüsyon bazlı AFDT yöntemlerinin bazı dezavantajları mevcuttur. Bunlardan ilki uzun bir süre gerektirmesidir. Sonucun raporlanması için gereken süre testin yapılmasını takiben 24-72 saattir. Ayrıca referans yöntemler amfoterisin B’ye dirençli izolatları duyarlı olanlardan ayırmada başarısızdır. Test ortamı olarak “Antibiotic Medium 3”ün ve/veya test yöntemi olarak gradient şerit testin (GST, “*Gradient stripe test*”) kullanılmasının amfoterisin B’ye dirençli suşları tespit etme kabiliyetini artırdığı öne sürülmüştür (117).

4.10.1.2. Kolorimetrik Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

MİK değerlerinin okunmasındaki zorluklar, doğru görsel okumayı kolaylaştırmak için kolorimetrik göstergeler içeren testlerin geliştirilmesine ve kullanılmasına yol açmıştır. Sensititre “Yeast One” (SYO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA [eski adıyla TREK Diagnostic Systems]) bu amaçla kullanılan ve en çok çalışılan, ticari olarak temin edilebilen kurutulmuş kolorimetrik paneldir (117). ASTY kolorimetrik antifungal paneli ise (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Japonya), üzerinde az sayıda çalışma yapılan, MİK tespitinde oksidasyon-redüksiyon kolorimetrik indikatörü kullanan, ticari olarak hazırlanmış bir diğer mikrodilüsyon panelidir (118). Diğer sıvı mikrodilüsyon formları gibi, SYO paneli de

antifungal ilacın seri dilüsyonlarını içeren 96 kuyucuklu bir plaktan oluşmaktadır. Ancak, ek olarak, kuyucuklar kolorimetrik üreme göstergesi olan resazurin (AlamarBlue) içermektedir, bu nedenle mantar çoğalması ve MİK tayini, tanımlanmış bir üreme miktarından ziyade kuyucuktaki renk değişimine dayanmaktadır. Bu sistemde kırmızı renk üremeyi gösterirken, mor renk üremenin engellendiğini, mavi renk ise büyümenin olmadığını göstermektedir. Plaklar kuru olarak gönderilir, oda sıcaklığında yaklaşık 24 aylık bir raf ömrüne sahiptir ve tek tek paketlenmiştir, bu da testlerin seyrek olarak yapıldığı bir klinik laboratuvarında kullanım için idealdir (112, 116).

Ticari olmayan ve tetrazolyum tuzu olan 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-[(sülfenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum-hidroksit) (XTT)'in mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından indirgenmesine dayanan bir başka kolorimetrik yöntem de AFDT için araştırılmaktadır. Bu metabolik test, mantar metabolizmasını değerlendirerek mantar çoğalmasını spesifik olarak ölçmektedir. XTT'nin formazan türevine dönüşümü, sarıdan mora renk değişimi ile gösterildiği gibi, optik yoğunluğun spektrofotometrik değerlendirmesi ile de ölçülmektedir (117).

4.10.1.3. VITEK 2 Maya Antifungal Duyarlılık Paneli

VITEK 2 (BioMérieux, Fransa), klinik olarak ilgili *Candida* türleri için bir MİK değeri belirlemek üzere spektrofotometrik okumaları kullanan, otomatize AFDT yöntemidir. Kartlar, besiyeri içinde kurutulmuş antifungal ilaç konsantrasyonları bulunan kuyucuklar içermektedir. İzolat, salin içinde standart bir konsantrasyona ayarlandıktan sonra, ilaç kuyularını rehidrate etmek için kullanılır ve kart bir VITEK 2 kart okuyucu/inkübatöre yerleştirilir. Her bir kuyucuktaki üreme optik bir tarayıcı ile 36 saate kadar (ortalama 12 ila 14 saat) izlenir ve karttaki her bir antifungal için yorumlayıcı kategori ile birlikte bir MİK değeri içeren bir rapor oluşturulur. Bu testin sağladığı otomasyon, yüksek test hacmine sahip klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için idealdir. Özel mikoloji eğitimi gerektirmez ve sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılabilir doğru sonuçlar üreten hızlı bir AFDT yöntemidir. Bununla birlikte, manuel okumalar mümkün değildir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, bu sistem aracılığıyla AFDT için FDA tarafından yalnızca flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin onaylanmıştır (112).

4.10.2. Agar Bazlı Duyarlılık Testleri

4.10.2.1. Disk Difüzyon Testi (DDT)

DDT, hazırlığı ve yorumlama kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve ucuz olması nedeniyle ideal bir tarama testidir. CLSI tarafından *Candida* türlerinde azoller ve ekinokandinlerin antifungal duyarlılığının belirlenmesi için DDT (CLSI M44 serisi) geliştirilmiş ve geçerli kılınmıştır. Sabit bir antifungal ilaç konsantrasyonu içeren ticari kağıt diskler kullanılmaktadır (112). CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile EA değeri >%90 saptanmıştır (119). Bu testte %2 glukoz ve 0,5 mg/L metilen mavisi içeren Mueller Hinton agar (MHA) kullanılmaktadır (113). Glukoz mantar üremesini desteklemek için, metilen mavisi ise zon kenarının belirginleşmesi için eklenmektedir (112). Kullanılan MHA'nın pH'sı 7,2-7,4 arasında olmalı ve agar 4 cm yüksekliğinde hazırlanmalıdır. $1-5 \times 10^6$ KOB/mL inokulum ayarlanarak agar yüzeyine eşit olarak dağıtılmalıdır ve 3-15 dk kurutulduktan sonra diskler yerleştirilerek 35 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmelidir. Yetersiz üreme gözlemlendiğinde inkübasyon süresi 48 saate uzatılabilmektedir. Bu doküman *Candida* türleri için kaspofungin, flukonazol ve vorikonazol için çok sayıda izolataın MİK değerlerine göre belirlenen zon çapı yorumlama kriterlerine sahiptir. Sınır değere sahip olmayan *Candida* türleri ve antifungal ilaçların disk difüzyon yorumlama kriterleri bulunmamaktadır. En önemli kısıtlılığı ise MİK değerinin saptanamaması, yeni ortaya çıkan türler ve yeni geliştirilen antifungal ilaçların değerlendirilmesinde kullanılamamasıdır (112).

4.10.2.2. Gradient Şerit Difüzyon Testi (“Gradient Strip Test”, GST)

Referans sıvı mikrodilüsyon yöntemlerine göre daha ucuz, MİK değeri saptanabilen, kullanımı kolay, agar bazlı bir ticari AFDT yöntemidir. Bu şeritler, bir antifungal ilaç gradienti içeren ve bir konsantrasyon ölçeği ile işaretlenmiş ince plastik veya nitroselüloz şeritlerdir. Mantar hücreleri agar plağına inoküle edildikten sonra gradient difüzyon şeritleri eklenerek 24-48 saat süreyle inkübe edilmektedir. Bu süre zarfında antifungal ilaç agara yayılır ve mayanın elips şeklindeki büyümesinin şeritle kesiştiği nokta MİK değeri olarak belirlenmektedir (112, 116). En yeni triazol ilaç olan isavukonazol dâhil olmak üzere tüm onaylanmış antifungal ilaçlar için şeritler mevcuttur. Gradient şerit difüzyon testinin sıvı mikrodilüsyona kıyasla önemli bir avantajı amfoterisin B testidir. *Candida* türlerinin amfoterisin B'ye karşı sıvı mikrodilüsyon

testi, 0,25-1 µg/ml aralığında sıkıca kümelenmiş MİK değerlerini ortaya çıkarken, GST kullanılarak test yapıldığında, çok daha geniş ve çeşitli MİK değerleri elde edilir ve hem *Candida* hem de *Cryptococcus* türlerinde amfoterisin B'ye duyarlı ve dirençli izolatlar arasında ayırım yapılabilmektedir (112).

Flukonazol ve itraconazol gibi azoller, *Candida*'nın tam olmayan/kısmi büyüme inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu etkinin bir sonucu olarak, bazı *Candida* izolatları, duyarlılık testinde ilacın konsantrasyonlarının geniş bir aralığında azalmış ancak kalıcı büyüme göstermektedir. Bu fenomen “trailing growth effect (takip eden/iz bırakan büyüme etkisi)” olarak adlandırılmaktadır ve azol duyarlılık testlerinde görsel son noktaların yorumlanmasında zorluklara neden olmaktadır. Azoller için “trailing” çoğunlukla *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatları için rapor edilmiştir. Bu özelliği gösteren izolatların, in vivo çalışmalarda flukonazole duyarlı olduğu saptanmıştır. Çeşitli *Candida* türleri için flusitozin ve ekinokandinlerle de “trailing” gözlenmiştir. Ekinokandin duyarlılık testlerinde “trailing” sıklıkla hafif ve daha az yaygın görülmektedir ve MİK'lerin yorumlanmasına fazla müdahale etmemektedir. DDT ve GST gibi agar bazlı AFDT'lerinin önemli avantajlarından biri de “trailing” özelliği gösteren izolatları saptamada sıvı mikrodilüsyon testlerine göre daha başarılı olmalarıdır. “Trailing growth”, sırasıyla DDT ve GST'te inhibisyon bölgesi veya inhibisyon elipsi içinde mikrokolonilerin yoğun üremesi olarak gözlenmektedir (117, 120).

4.10.2.3. Agar Dilüsyon Yöntemi

Bu geleneksel duyarlılık testi yöntemi, *Candida* türlerinde flukonazol, itraconazol, ketokonazol, flusitozin ve amfoterisin B için çalışılmıştır. Çalışmaların çoğunda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle iyi bir korelasyon gösterse de, standardize edilmemiştir ve özellikle referans metodolojilerin kapsadığı antifungal-maya kombinasyonları için artık daha az kullanılmaktadır (117). Kromojenik *Candida* besiyeri ile birlikte belirli bir flukonazol konsantrasyonunu (8 µg/ml) içeren agar dilüsyon bazlı bir yöntemin, flukonazol direncinin taranmasında faydalı olduğu gözlenmiştir (116). Ancak bu yöntemde flukonazole dirençli olduğu saptanan izolatlara resmi bir AFDT yöntemi uygulanması gerekmektedir. Yarı katı agara dayalı bir agar dilüsyon yönteminin de referans yöntemle önemli ölçüde uyum sağladığı bildirilmiştir. %20 CO₂ içeren ortamda inkübasyonun, agar dilüsyon yönteminde son noktayı netleştirmede kolaylık sağladığı gösterilmiştir (116). Bu yöntem *Malassezia* gibi bazı zor üreyen mantarlar için araştırılmaktadır (117).

4.10.3. Yeni Geliştirilen Yöntemler

Referans yöntemler ve ticari olarak geliştirilmiş rutin AFDT yöntemlerinin en önemli dezavantajı sonuç elde etmek için 24-48 saat gerekmesidir. Rutin yöntemlerin dışında standart moleküler yöntemler ve henüz araştırma aşamasında olan yeni yöntemler de mevcuttur. Akım sitometrisi, gözenekli alüminyum oksitte (PAO) floresan mikroskopi, izotermal mikrokalorimetre, MALDI-TOF MS ve moleküler teknikler son dönemde çalışılan yöntemlerdir (117).

Akım Sitometrisi ve Vital Boyaların Kullanımı: Flow sitometri (“fluorescence-activated cell sorting”, floresanla aktive edilen hücre ayırma-FACS) maya ve küflerin AFDT için araştırılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin en önemli avantajı, ortalama 4-6 saat gibi kısa bir inkübasyon süresine sahip olmasıdır. FUN-1, propidyum iyodür, 3,3'-dipentiloksakarbosiyanin iyodür veya akridin oranj gibi membran potansiyeline duyarlı veya DNA bağlayıcı özelliği olan çeşitli canlılığı belirten boyalar da antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesinde araştırılmaktadır. Testte kullanılan boyaya bağlı olarak sonuçlar, ilaca maruz kalmayı takiben boya ile boyanan hücrelerin floresan yoğunluğundaki azalma veya artışın değerlendirilmesiyle belirlenmektedir (116, 117).

Ergosterol Miktar Tayini: Bu yöntem çoğalmanın inhibisyonu yerine hücresel ergosterol içeriğinin ölçümüne dayanmaktadır. Ergosterol sabunlaştırma (saponifikasyon) yoluyla tüm maya hücrelerinden izole edilmekte ve sabunlaştırılmayan lipitler heptan ile ekstrakte edilmektedir. Ergosterol 240 ve 300 nm arasındaki spektrofotometrik absorbanans profili ile tanımlanmaktadır (116, 117).

MALDI-TOF MS: Genel olarak bu yöntemde izolat, belli bir antifungal ilaç konsantrasyonuna maruz bırakılır ve ilaçsız bir kontrole kıyasla proteomdaki herhangi bir değişiklik, antifungal kaynaklı hasarın bir göstergesi olarak yorumlanır. Minimal profil değişim konsantrasyonu (“minimal profile change concentration”, MPCC) saptanarak değerlendirme yapılmaktadır (112, 116, 117).

4.10.4. Moleküler Yöntemler

Günümüzde antifungal direnç mekanizmalarını tespit etmek için kullanılabilecek moleküler testlerin geliştirilmesine yönelik çabalar sürmektedir (112). Nükleik asit dizisine dayalı amplifikasyon teknikleri, hedef genin mRNA transkriptlerini tespit etme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle direnç fenotipleri daha güvenli ve hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir (121). Ancak, bu tür testler yalnızca direnç mekanizmaları bilindiğinde ve etken kimliği doğrulandığında kullanılabilmektedir. Ekinokandinlere dirençten sorumlu *fksl* (tüm *Candida* türleri) ve *fk2* (*C. glabrata*) genlerinin sıcak nokta bölgelerindeki nokta mutasyonlarının tespiti için, gerçek zamanlı multipleks moleküler işaret problemleri, erime eğrisi analizi, asimetrik PZR ile mikroküre bazlı testler ve DNA dizi analizi de dahil olmak üzere çeşitli moleküler testler tanımlanmıştır. Ancak, bu testler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak uygulanmamaktadır (112, 121). *Candida* türlerinde azol direncinden sıklıkla sorumlu olan *erg11* genindeki mutasyonlar PZR temelli testler veya DNA dizi analizi kullanılarak saptanabilmektedir. Ayrıca ABC ve MFS grubu DAP'nin transkripsiyonunu düzenleyen genlerdeki (*tac1*, *mrr1* vb.) mutasyonların moleküler yöntemlerle belirlenmesi yoluyla da azol direnci saptanabilmektedir (112).

Direnç gelişiminde önemli olan bu genlerdeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) PZR tabanlı bir yöntemle saptanmasında MAS PZR kullanılabilmektedir. MAS PZR dizisiye özgü bir "mismatch" amplifikasyon test yöntemidir ve önceden bilinen mutasyonları saptayabilmektedir. Bu yöntemde kullanılan primer veya problemler mutasyona özgü şekilde tasarlanmaktadır ve bu mutasyonu saptamak için PZR amplifikasyonu yapılmalıdır. Uygun primer ve prob tasarımı MAS PZR'de reaksiyonu etkileyen en önemli noktalardandır (122).

4.11. *Candida* Türlerinde Antifungal İlaç Direnci

4.11.1. Azol Direnci

Candida türlerinde azollere karşı dört ana direnç mekanizması tanımlanmıştır. Herhangi bir mantar türünde birden fazla mekanizma birlikte rol oynayabilmektedir (92).

a. Azalmış İlaç Konsantrasyonu: DAP aktivasyonu, ilacın hedef bölgesindeki konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. DAP, *Candida* türlerinde iki taşıyıcı gen ailesi tarafından kodlanmaktadır: ATP bağlayıcı kaset süper ailesinin (“*ATP binding cassette*”, ABC) *cdr* genleri ve majör kolaylaştırıcı süper aile sınıfının (“*major facilitator superfamily*” MFS) *mdr* genleri (107). ABC proteinleri, genellikle ATP hidrolizini katalize eden iki transmembran domeyni (TMD) ve iki sitoplazmik nükleotid bağlayıcı domeynden (NBD) oluşmaktadır (123). Bugüne kadar *C. albicans*'ta en az yedi *cdr* geni tanımlanmıştır, ancak şimdiye kadar sadece *cdr1* ve *cdr2* azol direnci ile ilişkilendirilmiştir (124). Uzun süreli antifungal tedavi alan hastalarda, *cdr1* ve *cdr2*'nin artmış ekspresyonunun, azol direncinden sorumlu olduğu saptanmıştır (123). *cdr1* ve *cdr2* 'nin ekspresyonu *C. albicans*'ta transkripsiyon faktörü *tac1* tarafından düzenlenmektedir ve *tac1* geninde meydana gelen fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar (“gain of function”, GOF) Cdr1 ve Cdr2 DAP'nin ekspresyonunu artırarak azol direncine sebep olmaktadır (106). *cdr* geni tarafından kodlanan DAP'nin artmış ekspresyonu neredeyse tüm azollere direnç gelişmesine neden olmaktadır (92, 125). *C. albicans*'ın MFS taşıyıcı geni *mdr1* (eski adıyla benomil direnci için BENr), DHA1 ailesinin bir üyesidir. *mdr1* geni tarafından kodlanan DAP'nin ekspresyonunun artması ise flukonazole özgü daha düşük düzey direnç oluşturmaktadır ve diğer azollere çapraz dirençle ilişkili değildir (92, 123, 124). *mdr1* geninde ya da bu genlerin transkripsiyon faktörlerinden *mrr1* geninde meydana gelen GOF nokta mutasyonları sonucunda genlerin ekspresyonlarının artmasıyla flukonazole direnç gelişmektedir (68).

b. Hedef Bölge Değişikliği: *Candida* türlerinde kazanılmış azol direnci temel olarak ergosterol biyosentez yolunun modifikasyonu ile ilişkilidir. *erg11*'in sıcak nokta bölgelerinde meydana gelen SNP'ler azollerin hedef enzime (lanosterol C14 α -demetilaz) bağlanma bölgelerinde aminoasit değişimlerine sebep olur ve bu da azollerin hedef enzime bağlanma yeteneğini düşürerek antifungallerin toksik aktivitesini azaltmaktadır (92, 126). Bu gende birden fazla farklı mutasyon bir arada bulunabilmektedir (92). *erg11* genindeki SNP'lerin haploid organizmalarda (örn. *C. glabrata*) diploidlere (örn. *C. albicans*) kıyasla daha büyük bir etkiye sahip olma potansiyeline ragmen, *C. glabrata* 'da da en yaygın direnç mekanizması ilaçların DAP yoluyla dışarı atılmasıdır (127).

c. *erg11*'in Aşırı Ekspresyonu *C. albicans*'ın azol dirençli klinik izolatları arasında yaygın olarak saptanan diğer bir *erg11* ilişkili direnç mekanizmasıdır. Hedef enzim miktarında yaşanan artış, inhibisyon için daha fazla ilaç gerektirdiğinden bu durum dirence doğrudan katkıda bulunmaktadır (127). *erg11*'in aşırı ekspresyonunu açıklayan birden fazla mekanizma bulunmaktadır. İlk olarak, *erg11* geninin amplifikasyonu, *erg11*'in bulunduğu kromozom 5'in

sol kolunun iki kopyası ile bir izokromozom oluşumu (i(5L)) veya tüm kromozomun duplikasyonu ile meydana gelebilir (128). İkinci olarak, transkripsiyon faktörü *upc2*'yi kodlayan gendeki GOF mutasyonları *erg11*'in yapısal olarak daha fazla ekspresyonuna yol açmaktadır (129). *upc2* mutasyonuna sahip *C. albicans* izolatlarının ise azollere karşı artmış duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir (107). Enzim seviyelerindeki az miktarda meydana gelen artış nedeniyle bu mekanizmanın *Candida* türlerindeki genel azol direncine çok az katkıda bulunduğu düşünülmektedir (92). Bu tip azol direnç mekanizması *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatları için de bildirilmiştir (107).

d. Baypas Yollarının Geliştirilmesi: Azol bileşiklerine maruz kalma sonucunda mantar hücre membranında ergosterol tükenir ve toksik ürün 14 α -metil-3,6-diolün birikmesi sonucunda hücre büyümesi durur. *erg3* geninin mutasyonu 14 α -metilfekosterolden 14 α -metil-3,6-diol oluşumunu engellemektedir. Ergosterol tükenmesine rağmen alternatif sterollerin (4 α -metilfekosterol) birikimi ile, değişmiş membran bileşimi meydana gelerek, azol varlığında büyümenin devam etmesi sağlanmaktadır. Bu şekilde *erg3* mutasyonu azollerin ergosterol biyosentez yolu üzerindeki etkisini ortadan kaldırmaktadır. *erg3* mutasyonuna sahip *Candida* izolatlarının hücre membranları ergosterolden yoksun olduğu için bu mutasyonu taşıyan izolatlar polienlere karşı da dirençlidir (92, 107, 124, 126, 130). *erg3* aracılı azol direnci, protein fosfataz kalsinörin, protein kinaz Pkc1, moleküler şaperon Hsp90 ve muhtemelen tanımlanmayı bekleyen diğer düzenleyiciler gibi temel stres yanıtı düzenleyicilerine yakından bağlıdır (106).

4.11.2. Ekinokandin Direnci

Ekinokandinler, klinikte kullanıma sunulan en yeni antifungal ilaç sınıfıdır ve azollere dirençli *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır, ancak son zamanlarda hem laboratuvarlarda hem de klinik kullanımda ekinokandinlere dirençli *Candida* türleri ortaya çıkmaktadır. Ekinokandin direnci esas olarak glukon sentazı kodlayan *fk1* (tüm *Candida* türleri) ve *fk2* (*C. glabrata*) genlerinin yüksek oranda korunmuş spesifik bölgelerindeki (Sıcak bölge, “Hot-spot region”, HS) tek nükleotid polimorfizmleri nedeniyle oluşan aminoasit değişimleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu aminoasit değişimleri ile ilacın hedef bölgesinde değişiklik meydana gelmesi sonucunda ilaç etki edememektedir. Bu HS bölgeleri farklı *Candida* türleri arasında korunmaktadır ve direnç seviyeleri mutasyonlara (131) ve bu genlerin ekspresyonuna bağlı olarak değişmektedir (132). *C. glabrata*'da *fk2* ekspresyonu kalsinörine bağımlıdır, bu nedenle *fk2* tarafından sağlanan direnç FK506 gibi kalsinörin inhibitörlerinin uygulanmasıyla geri döndürülebilmektedir (106, 132). *Candida* türlerinde uzun

sürekli ekinokandin ilaçlara maruz kalmanın özellikle tekrarlayan kandidemisi olan bağışıklığı baskılanmış hastalarda ekinokandin duyarlılığının azalmasına yol açtığı saptanmıştır (133). Genel olarak klinik açıdan önemli *Candida* türlerinin çoğu ekinokandinlere duyarlıdır, ancak, bazı *Candida* türleri, *fks* genlerinde doğal olarak oluşan polimorfizmlere sahiptir ve bu da onları ekinokandinlere karşı daha az duyarlı hale getirmektedir. Hem *C. parapsilosis* kompleks (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*) hem de *C. guilliermondii* diğer duyarlı *Candida* türlerine göre daha yüksek MİK değerlerine sahiptir. *C. parapsilosis* ailesinde, HS-1'de Pro660Ala polimorfizmi, *C. guilliermondii*'de Leu633Met ve Thr334Ala polimorfizimleri izlenmektedir. Bu değişiklikler glukon sentazın ilaca olan duyarlılığını bir miktar azaltarak MİK değerlerinin yükselmesine neden olmaktadır (126, 132). *C. albicans*'ta ise Ser641 ve Ser645'teki amino asit değişiklikleri en sık görülen ve en belirgin direnç fenotipine neden olan değişikliklerdir. *C. glabrata*'da ise *fks2*'de Phe 659 ve Ser663, *fks1*'de Ser629 pozisyonlarındaki aminoasit değişiklikleri en sık izlenen aminoasit değişimleridir (132). Ayrıca *C. glabrata*'da çoklu ilaç direnci, kaspofungin direnci ile ilişkili *fks2*'deki nokta mutasyonların yanı sıra flukonazol ve vorikonazol direnci ile bağlantılı CgCDR1 ve CgCDR2 DAP'nin aşırı ekspresyonu yoluyla meydana gelmektedir (125).

4.11.3. Polien Direnci

Uzun yıllar klinik kullanıma rağmen amfoterisin B'ye karşı minimal direnç gelişmiştir (134). *C. lusitanae* ve *C. guilliermondii*, amfoterisin B'ye intrensek dirençlidir. Poliene dirençli klinik izolatların çoğunun membranlarında büyük ölçüde azalmış ergosterol içeriği vardır. Membran yapısındaki veya membrandaki sterol/fosfolipid oranındaki değişikliklerin dirençle ilişkili olabileceğini öne süren kanıtlar vardır (130). Ergosterol sentezinde görev alan enzimleri kodlayan genlerde (*erg2*, *erg3*, *erg5*, *erg6*, *erg11*) meydana gelen mutasyonlar sonucunda ergosterol sentezinin azalmasına bağlı olarak amfoterisin B direnci gelişmektedir (99). Ergosterol biyosentezinde rol oynayan *erg3* genindeki mutasyonlar, mantar membranında diğer sterollerin birikmesine yol açmaktadır. Polien dirençli *Candida* izolatları, polien duyarlı izolatlarla kıyasla nispeten düşük ergosterol içeriğine sahiptir. Amfoterisin B'ye direnç, oksidatif hasara karşı duyarlılığın azalmasıyla birlikte artan katalaz aktivitesi ile de gelişebilmektedir. Ayrıca hastanın önceden azollere maruz kalması durumunda da hücre zarında Amfoterisin B'nin hedefi olan sterol miktarı azalarak Amfoterisin B'ye direnç gelişmektedir (92, 98).

4.11.4. Flusitozin (5- fluorocytosine) Direnci

Monoterapi olarak kullanıldığında flusitozine direnç hızla ortaya çıkmaktadır. Sitozin permeazı kodlayan *fcy2* geni, sitozin deaminazı kodlayan *fcy1* geni ve urasil fosforibozil transferazı kodlayan *fur1* genindeki nokta mutasyonlar, edinilmiş flusitozin direncinden sorumludur. Ayrıca, yakın zamanda *C. glabrata*'da flusitozin direncini etkileyen arginin homeostazı, hücre duvarı yeniden şekillenmesi ve plazma membranında yer alan bir gliserol kanalı olan Fps'ler ve regülatörlerinin değişikliklerini içeren çeşitli biyolojik süreçlerin de dirençte rol oynayabileceği bildirilmiştir (98, 99).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. İzolatların Seçimi

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve İbn-i Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi bünyesinde yürütülmüş ve gerekli etik kurul onayı İ8-539-21 numara ile 16/09/2021 tarihinde alınmıştır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina hastanesinin erişkin klinik servislerinden İbn-i Sina Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na hastaların tanı ve tedavi süreçlerinde kan akımı enfeksiyonu (KAE) şüphesi ile 1.1.2021-31.12.2023 tarihler arasında gönderilen kan kültürlerinde üremiş *Candida* spp. izolatları değerlendirilmiştir.

VITEK MS (BioMérieux, Fransa) otomatik kan kültür cihazında beş günlük inkübasyon süresi içinde üreme sinyali alınan şişeler çalışmaya alınmıştır. Bu izolatlar için rutin laboratuvar işlemleri sırasında şişelerden Gram boyama yapıp, %5 koyun kanlı agar (KKA), çikolata agar (ÇA) ve eozin-metilen mavisi (EMB) agara pasajlar alınmış, Gram boyamada maya hücresi görüldüğünde Saouraud Dekstroz agar (SDA) besiyerine de ekim yapılmıştır. Plaklarda üreyen mikroorganizmalar belirtilen tarihler arasında VITEK MS (BioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. AFDT işlemleri VITEK 2 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Rutin işlemleri tamamlanan izolatların stokları belirtilen süre boyunca toplanarak 1 ml %20 gliserol ilave edilmiş beyin kalp infüzyon buyyonu içinde -20 °C'de saklanmıştır.

Laboratuvarımızda 2021-2023 yılları arasında KAE etkeni olarak 220 kan kültüründe *Candida* spp. izole edilmiştir. Kandidemisi olan hastaların tekrarlayan üremeleri olduğunda duyarlılık sonuçlarını etkilememesi amacıyla çalışmaya sadece ilk izolat alınmıştır. Bir hastada farklı *Candida* türü ile kandidemi geliştiğinde ise tüm izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir. Belirtilen tarihler arasında tekrarlamayan 182 *Candida* KAE olduğu saptanmıştır. İzolatların dağılım oranları incelendiğinde sırasıyla %36,3 *C. parapsilosis* (n=66), %28,6 *C. albicans* (n=52), %18,1 *C. glabrata* (n=33), %7,7 *C. auris* (n=14), %3,8 *C. tropicalis* (n=7), %2,2 *C. kefyr* (n=4), %2,2 *C. krusei* (n=4) ve %1,1 *C. dubliniensis* (n=2) olduğu saptanmıştır. Bu izolatların VITEK 2 AFDT sonucu olan, stoklardan üretilen, izolat sayısı 20'nin üzerinde olan türler çalışmanın geri kalanında kullanılmıştır. Buna göre çalışmaya, 2021-2023 yıllarında

132 hastadan alınan kan kültürlerinde üremiş olan *C. parapsilosis* (n=57), *C. albicans* (n=49) ve *C. glabrata* (n=28) olmak üzere toplam 134 *Candida* izolatı alınmıştır.

Moleküler testler için, fenotipik AFDT sonucunda, EUCAST 2023 Antimikrobiyal Duyarlılık Sınır Değerlerine göre en az bir azol grubunda (flukonazol, vorikonazol ve itrakonazol) ilaca artmış temasta duyarlı ya da dirençli kategoride saptanan *C. parapsilosis* izolatları seçilmiştir. EUCAST E.Def 7.4'e göre *Candida* spp. için kullanılan ECOFF ve Klinik Sınır Değerler Tablo 5.1'de gösterilmiştir (135). Azol dirençli *C. parapsilosis* izolatlarında *erg11* geninde en sık saptanan mutasyon olan A395T mutasyonunu taramak amacıyla iki farklı MAS PZR yöntemi tüm *C. parapsilosis* izolatlarında (n=57) araştırılmıştır. *mrr1* genindeki polimorfizmleri belirlemek için ise azollere dirençli ve artmış temasta duyarlı saptanan 41 *C. parapsilosis* izolatı değerlendirilmiştir.

5.2. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi

C. parapsilosis ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları kalite kontrolü için kullanılmıştır. Çalışma izolatları ve kalite kontrol suşlarının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, mikafungin sodyum, kaspofungin, anidulafungin ve amfoterisin B'ye in vitro duyarlılıkları EUCAST 2023 önerilerine göre test edilmiştir. Bu amaçla yapılan tüm testler EUCAST E.Def 7.4, "Mayalar İçin Antifungal İlaçların Sıvı Dilüsyon ile Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarını Belirleme Yöntemi Kılavuzu" doğrultusunda yapılmıştır (6). Bu yöntemde, sıvı kültür besiyeri ve antimikrobiyal ilaçların seri sulandırımını içeren mikrodilüsyon plak kuyucuklarında mantarların üreme yeteneği araştırılarak MİK değeri belirlenmektedir. Çalışma sonuçları EUCAST E.Def 7.4'e göre *Candida* spp. için kullanılan epidemiyolojik sınır değer (ECOFF) ve klinik sınır değerler kullanılarak değerlendirilmiştir (135) (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. EUCAST E.Def 7.4'e göre *Candida* türleri için kullanılan Epidemiyolojik (ECOFF) ve Klinik Sınır Değerleri

<i>Candida</i> Türü	Antifungal İlaç	ECOFF (mg/L)		Klinik Sınır Değer (mg/L)	
		WT ≤	S ≤	I	R >
<i>C. parapsilosis</i>	Flukonazol	2	2	4	4
	Vorikonazol	0,06	0,125	0,25	0,25
	İtrakonazol	0.125	0.125		0.125
	Mikafungin	2	2		2
	Anidulafungin	4	4		4
	Amfoterisin B	1	1		1
<i>C. albicans</i>	Flukonazol	0,5	2	4	4
	Vorikonazol	0,03	0,06	0,125-0,25	0,25
	İtrakonazol	0,03	0,06		0,06
	Mikafungin	0,016	0,016		0,016
	Anidulafungin	0,03	0,03		0,03
	Amfoterisin B	1	1		1
<i>C. glabrata</i>	Flukonazol	16	0,001		0,001
	Vorikonazol	1	-		-
	İtrakonazol	2	-		-
	Mikafungin	0.03	0.03		0.03
	Anidulafungin	0.06	0.06		0.06
	Amfoterisin B	1	1		1

ECOFF: Epidemiyolojik sınır değer, WT: Sokak tipi (Wild type), S: Duyarlı (susceptible), I: Artmış temasta duyarlı (Susceptible, increased exposure), R: Dirençli (resistant)

5.2.1. İlaç Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

AFDT'de kullanılacak flukonazol (Sigma-Aldrich, ABD), vorikonazol (Sigma-Aldrich, ABD), itrakonazol (Sigma-Aldrich, ABD), mikafungin sodyum (Sigma-Aldrich, ABD), kaspofungin (Sigma-Aldrich, ABD), anidulafungin (Sigma-Aldrich, ABD) ve amfoterisin B (Sigma-Aldrich, ABD) antifungalleri toz formunda temin edilmiştir. Antifungal ilaçların tümünde EUCAST önerileri doğrultusunda çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Antifungallerin ana stoklarını hazırlamak için gerekli olan çözücü hacmini belirlemede aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hacim (ml)} = \text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens değeri (}\mu\text{g/mg)} / \text{Konsantrasyon (}\mu\text{g/ml, mg/L)}$$

Bu formüle göre stok solüsyonları flukonazol için 12.800 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol, itrakonazol ve amfoterisin B için 1.280 $\mu\text{g/ml}$ ve ekinokandinler için 2.560 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hazırlanmıştır. Tamamen çözünen antifungal stok solüsyonları, steril mikrosantifüj tüplerine 100 μl olacak şekilde bölünmüş ve kullanılına kadar -80 °C'de saklanmıştır. Stok çözeltilerin

hazırlanması için çözücüler, antifungal ilaçlar için özellikler ve uygun test konsantrasyon aralıkları Tablo 5.2’de belirtilmiştir.

Tablo 5.2. İlaç stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler, antifungal ilaçların stok konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyon aralıkları

Antifungal ilaç	Çözücü	Stok Konsantrasyonu (µg/ml)	EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Test Aralığı (µg/ml)	VITEK 2 Test Aralığı (µg/ml)
Flukonazol	DMSO	12800	0,125 - 64	0,5 - 64
Vorikonazol	DMSO	1280	0,015 - 8	0,125 - 8
İtrakonazol	DMSO	1280	0,015 - 8	-
Mikafungin	DMSO	2560	0,015 - 8	0,06 - 8
Kaspofungin	DMSO	2560	0,015 - 8	0,125 - 8
Anidulafungin	DMSO	2560	0,015 - 8	-
Amfoterisin B	DMSO	1280	0,03 - 16	0,25 - 16
Flusitozin	-	-	-	1 - 64

DMSO: Dimetil sülfoksit

5.2.2. Besiyerinin Hazırlanması

AFDT için L-glutamin ve %2 glukoz içeren toz RPMI 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich, ABD) bikarbonat içermeyen bir pH indikatörü (3-N-morfolino propanasülfonik asit, MOPS) kullanılarak EUCAST önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Son konsantrasyonu 0,165 mol/L olacak şekilde MOPS tamponu (Merck, Almanya), RPMI 1640 besiyeri içine eklenmiştir. Bu amaçla iki kat güçte (2x) hazırlanan besiyeri için 900 ml distile suya 20,8 g toz RPMI 1640 besiyeri ve 69,06 g MOPS tamponu ve 36 g glukoz (Merck, Almanya) eklenmiş ve içerikler tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Besiyeri pH’sı 1 M NaOH (Merck, Almanya) çözeltisi ile 7-7,2’ye ayarlanmış ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenmiştir. Çözelti 0,22 µm por çaplı filtreden (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya) süzülerek steril edilmiş ve 100’er ml olacak şekilde alikotlanarak 2-8°C’de saklanmıştır. Kalite kontrol amacıyla; hazırlanan besiyerinden sterilite kontrolleri yapılmış, pH değeri test edilmiş (6,9-7,1 kabul edilebilir değerlerdir, pH Indicator Strips, Isolab, Almanya) ve referans köken olan *C. parapsilosis* ATCC 22019 kullanılarak üreme kontrolü yapılmıştır.

5.2.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması

Test için, EUCAST önerileri doğrultusunda düz tabanlı 96 kuyucuklu, tek kullanımlık ve yaklaşık 300 µl'lik nominal bir kapasiteye sahip steril mikrodilüsyon plakları (Roll, Piove di Sacco, İtalya) kullanılmıştır. Antifungallerin iki katlık seri sulandırılmaları yapılmıştır. Antifungal ilaçların test aralığı EUCAST önerileri, kalite kontrol suşlarının hedef değerleri, çalışılacak *Candida* türlerinin sınır değerleri doğrultusunda ve VITEK 2 yönteminin test aralığını da kapsayacak şekilde belirlenmiştir (Tablo 5.2). Mikrodilüsyon plağının her bir satırındaki 1'den 10'a kadar olan kuyucuklara, antifungal ilacın RPMI besiyeri içinde ilgili konsantrasyonundan 100 µl dağıtılmıştır. 11. ve 12. kuyucuklara sadece RPMI besiyeri konulmuştur. Kalite kontrolü için 11. kuyucuk besiyeri sterilit kontrolü, 12. kuyucuk ise üreme kontrolü olarak belirlenmiştir. Hazırlanan plaklar -80 °C'de altı ayı geçmeyecek şekilde saklanmıştır.

5.2.4. İnokulum Hazırlanması

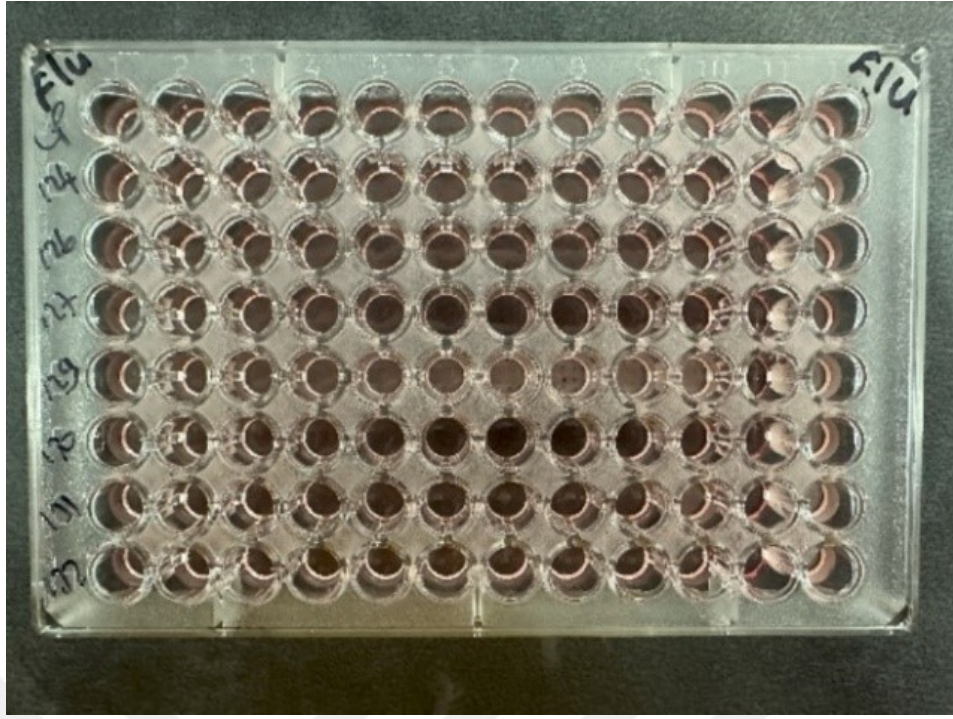
Çalışma izolatları ve kalite kontrol suşları stoklardan çıkarılıp %5 KKA ve SDA besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Kültürden alınan kolonilerin steril distile su içerisinde süspansiyonu hazırlanarak inokulum hazırlanmıştır. Hücre yoğunluğu nefelometri (Biosan, Türkiye) ile inokulum 0,5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Bunun sonucunda $1-5 \times 10^6$ koloni oluşturan birim (KOB)/mL'lik maya süspansiyonu elde edilmiştir. Bu standart süspansiyonun steril distile suda 1/10'luk sulandırımı yapılarak $1-5 \times 10^5$ KOB/mL olacak şekilde çalışma süspansiyonu hazırlanmıştır.

5.2.5. Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu ve Değerlendirilmesi

Daha önce besiyeri ve antifungal ilaç kullanılarak hazırlanıp -80°C'de dondurulan plaklar, oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir izolattan hazırlanan çalışma süspansiyonundan her bir satırda 11. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µl dağıtılmıştır. Böylece son inokulum $0,5-2,5 \times 10^5$ KOB/mL olmuştur. 11. kuyucuk besiyeri kontrolü olarak kullanıldığından inokulum eklenmemiş, inokulum hazırlığında kullanılan steril distile sudan 100 µl konmuştur.

İnokulasyonu tamamlanan plaklar $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de normal atmosfer şartlarında 24 saat inkübe edilmiştir.

Sonuçlar spektrofotometrik mikrolak okuyucu (Molecular Devices VersaMax Microplate Reader, ABD) ile 530 nm dalga boyunda SoftMax Pro programı ile değerlendirilmiştir. Onbirinci kuyucuk (besiyeri kontrolü) zemin okuma değeri olup bu kuyucuğun absorbansı diğer tüm kuyucuklardan çıkarılmıştır. Azoller ve ekinokandinlerin MİK değeri, ilaç içermeyen üreme kontrol kuyucuğuna (12. kuyucuk) göre üremede $\geq 50\%$ inhibisyona yol açan en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Amfoterisin B'nin MİK değeri ise, ilaç içermeyen üreme kontrol kuyucuğuna göre üremede $\geq 90\%$ inhibisyona yol açan en düşük konsantrasyon olarak alınmıştır. Çalışma sonuçları EUCAST'ın *Candida* spp. için belirlediği "ECOFF ve Klinik Sınır Değerler" dökümanına göre değerlendirilmiştir (135) (Tablo 5.1). EUCAST yöntemine göre gerçekleştirilen flukonazole ait sıvı mikrodilüsyon sonucunda bir çalışmanın plak fotoğrafı ve plağın spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda okutulduğunda elde edilen sonuçlar Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



A

Plate#1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,109	0,110	0,113	0,115	0,119	0,135	0,192	0,273	0,306	0,293	0,128	0,308
B	0,125	0,168	0,181	0,176	0,173	0,174	0,175	0,176	0,197	0,263	0,134	0,550
C	0,152	0,187	0,176	0,171	0,179	0,170	0,169	0,171	0,195	0,280	0,120	0,459
D	0,165	0,221	0,232	0,218	0,173	0,161	0,152	0,150	0,151	0,164	0,118	0,313
E	0,146	0,218	0,361	0,455	0,484	0,560	0,711	0,699	0,714	0,807	0,117	0,753
F	0,147	0,149	0,163	0,163	0,160	0,155	0,147	0,145	0,150	0,184	0,120	0,570
G	0,125	0,157	0,162	0,181	0,162	0,170	0,162	0,183	0,222	0,620	0,116	0,686
H	0,145	0,149	0,165	0,169	0,156	0,154	0,147	0,160	0,151	0,228	0,117	0,543
Endpoint L1 Automix: Off Plate Last Read: 530 Calibrate: On 22/09/2002 03:38												
Formula: L1												
Data Mode: Absorbance												

B

Şekil 5.1. EUCAST yöntemine göre gerçekleştirilen flukonazole ait; A. Sıvı mikrodilüsyon testi plak görüntüsü B. Spektrofotometre sonucu

5.3. VITEK 2 ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi

İzolatlardan antifungal duyarlılık tayini, VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) Yarı Otomatize Antifungal Duyarlılık Sisteminde, VITEK 2 AST-YS08 kartı (BioMérieux, Fransa) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışma izolatları SDA plaklarına pasajlanarak 18-24 saat inkübe edilmiştir. Kolonilerden inokulum

süspansiyonu, polistren tüplerde 2.5 ml steril serum fizyolojik içinde 2.0 McFarland (1,8-2,2 aralığında kabul edilebilir) olacak şekilde BioMérieux DensiChek cihazı ile hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar 30 dakika içerisinde kullanılmıştır. İnokulum içeren tüpler tek numaralı kartuşlara, boş tüpler ise çift numaralı kartuşlara yerleştirilmiştir. Tek numaralı tüplere VITEK YST kartları, çift numaralı tüplere VITEK 2 AST-YST antifungal duyarlılık kartları yerleştirilmiştir. Sırayla kartların barkodları okutulduktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. 18 saat inkübasyon sonucunda sonuçlar otomatik olarak okunmuş ve mililitre başına mikrogram cinsinden MİK değeri olarak ifade edilmiştir. VITEK 2 AST-YS08 kartı ile çalışılan antifungal ilaçların konsantrasyon aralıkları Tablo 5.2’de verilmiştir. VITEK 2 yöntemi ile gerçekleştirilen AFDT’ne ait örnek sonuç raporu ve çalışılan kite ait fotoğraf Şekil 5.2’de gösterilmiştir.



Organizma Miktarı: BP Enfeksiyon Bölgesi:		Seçilen Organizma: Candida albicans			
Yorumlar:					
Identifikasyon Bilgileri					
Organizma Kaynağı		MYLA*			
Seçilen Organizma		Candida albicans		İşlemi Yapan: Download	
Girildi:		16.Tem.2022 14:02 AST		İşlemi Yapan: Download	
Analiz Mesajları:					
Duyarlılık Bilgileri		Kart:	AST-YS08	Parti Numarası:	2882692403
		Durum:	Son	Analiz Zamanı:	14,57 saat
		Son Kullanım Tarihi:	10.Nis.2024 12:00 AST	Tamamlandı:	17.Tem.2022 04:37 AST
Antimikrobiyal	MIK	Yorum	Antimikrobiyal	MIK	Yorum
Flukonazol	<= 0,5	S	Micafungin	<= 0,06	S
Vorikonazol	<= 0,12	S	Amfoterisin B	1	S
Caspofungin	<= 0,12	S	Flusitozin	<= 1	IE
IE= Türün tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair Yetersiz Kanıt; MİK yorumlanmadan raporlanabilir					
AES Bulguları:		Son Değiştirilme Tarihi:		Parametre Seti: EUCAST+Fenotipik 2022	
Uyum Düzeyi:		Analiz gerçekleştirilmemiş			

Şekil 5.2. VITEK 2 yönteminde kullanılan kit ve elde edilen sonuç raporu

5.4. *C. parapsilosis* İzolatlarında Azol Direncine Neden Olan Moleküler Mekanizmaların Belirlenmesi

Hastanemizdeki kandidemi olgularının primer sorumlusu olması nedeniyle *C. parapsilosis* izolatlarında azol grubu antifungal ilaçlara direncin moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 antifungal testleri ile azollere (flukonazol, vorikonazol ve itrakonazol) duyarlı olmayan (artmış temasta duyarlı ve dirençli) olarak saptanan *C. parapsilosis* izolatları çalışmanın ilerleyen moleküler aşamalarına dahil edilmiştir. *C. parapsilosis* izolatlarında literatürde yaygın şekilde tespit edilen *erg11* genindeki mutasyonun hızlı ve ekonomik tespiti için iki farklı MAS PZR yöntemi çalışılmıştır. Ayrıca MDR tipindeki DAP'nın transkripsiyon faktörlerinden *mrr1* genindeki tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) araştırmak için PZR ile amplifikasyonu takiben iki yönlü dizi analizi yapılmıştır.

5.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* izolatlarının DNA izolasyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Her izolat stoktan SDA besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile pasajlanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. 450 µl steril distile su içeren steril mikrosantrifüj tüplerinde 10 µl'lik bir öze dolusu maya kolonileri süspanse edilmiştir. İzolatların DNA izolasyonu ve saflaştırılması ticari nükleik asit ekstraksiyon kiti (EZ1&2 Virus Mini Kit v2.0, Qiagen, Almanya) kullanılarak QIAGEN EZ1 Advanced XL Otomatik ekstraksiyon (DNA-RNA) cihazı (Qiagen, Almanya) ile yapılmıştır. Bu amaçla üreticinin önerileri doğrultusunda ekstraksiyon işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Kit içinde liyofilize halde bulunan carrier RNA (cRNA) 310 µl AVE buffer eklenerek sulandırılmıştır. İzolatlar cihaza yüklenmeden hemen önce her izolat için ayrı bir mikrosantrifüj tüpünde 56,2 µl AVE buffer ve 3,8 µl cRNA karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan tüpler pipetaj yapıldıktan sonra otomatik ekstraksiyon cihazına yüklenene kadar 2-8°C'de saklanmıştır. Otomatik saflaştırma cihazına gerekli malzemeler, kit içeriği ve mikrosantrifüj tüplerinde bulunan maya süspansiyonu yerleştirilmiştir. İçinde, etanol, elüsyon buffer, Taq polimeraz, manyetik boncuklar (bead), lizis tamponu, yıkama tamponu, proteinaz K gibi solüsyonlar bulunan reaktif kartuşları, cihaz üzerindeki ilk kartuşa sırayla yüklenmiştir ve bu kartuşun arkasında yer alan boşluğa karışımların yapılabilmesi amacıyla 2 ml hacimli boş tüpler

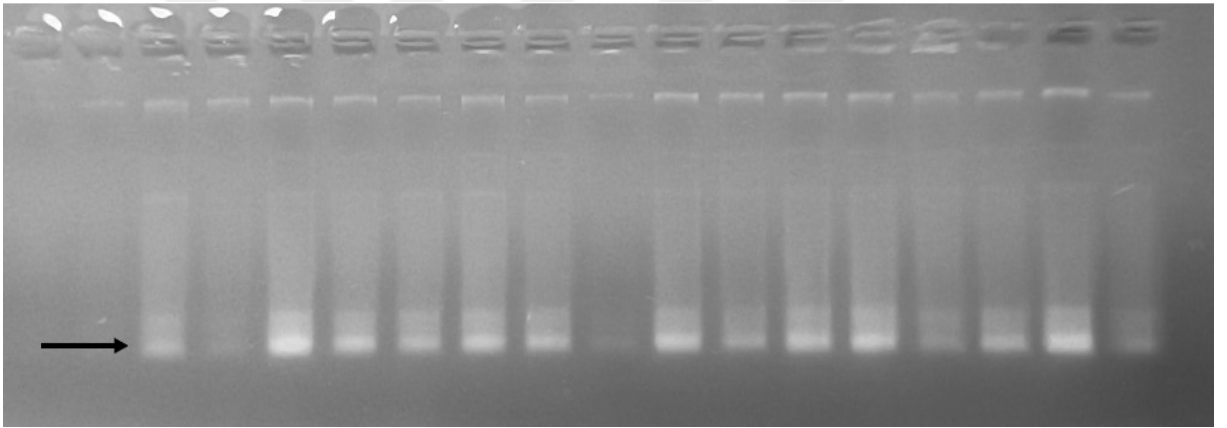
yerleştirilmiştir. Manyetik partikülleri karıştırmak için reaktif kartuşları üç kez ters-düz yapılarak karıştırıldıktan sonra kartuş rafına yüklenmiştir. Lizis için reaktif kartuşlarında bulunan ısıtma bloğuna EZ1&2 Virüs Mini Kiti v2.0 ile birlikte verilen etekli olmayan 2 ml'lik tüpler yerleştirilmiştir (EZ1&2 Virüs Mini Kiti v2.0 ile birlikte verilen etekli olmayan 2 ml tüpler kullanılmıştır). Cihazın ikinci kartuşunda ilk sıraya (en öndeki sıra) DNA'nın aktarılacağı 1,5 ml'lik boş elüsyon tüpleri yerleştirilmiştir. İkinci sıraya 1000 µl hacimli pipet ucu içeren uç tutucuları yerleştirilmiştir. Üçüncü sıraya hazırlanan AVE buffer içinde cRNA bulunan tüpler (1,5 ml) yerleştirilmiştir. Dördüncü sıraya ise maya süspansiyonu bulunan tüpler (2 ml) yerleştirilmiştir. Cihaz üzerinde yer alan ekrandan elüsyon hacmi 60 µl olacak şekilde ayarlanarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır.

Manyetik partikül teknolojisine sahip olan bu ekstraksiyon kiti, silika bazlı nükleik asit saflaştırma yöntemine sahiptir. Saflaştırma prosedürü, proteinaz K ile lizis, manyetik partiküllere bağlanma, bağlı nükleik asitlerin yıkanması ve saflaştırılmış nükleik asitlerin elüsyonu olmak üzere dört adımdan oluşmaktadır. Bu adımlardan ilki olan proteinaz K ile lizis (proteoliz), yüksek sıcaklıklarda, yüksek denatüre edici koşullar altında proteinaz K ve lizis tamponu varlığında gerçekleştirilmektedir. Manyetik partiküllere bağlanma basamağında bağlanma koşullarını ayarlamak için parçalanmış izolatlara bağlanma tamponu eklenmektedir. *Candida* nükleik asitlerinin (DNA) silika yüzeyine optimum adsorpsiyonunu sağlamak için lizatlar manyetik partiküllerle iyice karıştırılmaktadır. Üçüncü basamak olan bağlı nükleik asitlerin yıkanması esnasında *Candida* DNA'sı manyetik partiküllere bağlı kalırken, kontaminantlar önce yıkama tamponu 1 (wash buffer 1), daha sonra yıkama tamponu 2 (wash buffer 2) ve ardından etanol kullanılarak bir dizi yıkama adımı ile uzaklaştırılmaktadır. Son adımda, saflaştırılmış nükleik asitlerin elüsyonu için yüksek oranda saflaştırılmış fungal DNA, AVE tamponu içinde elüe edilmektedir. Saflaştırılan nükleik asitler PZR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

5.4.2. DNA Ekstraksiyonu Sonrası DNA Varlığının Araştırılması

DNA ekstraksiyonu sonrasında DNA varlığının değerlendirilmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Hassas terazide tartılan bir gram (g) moleküler düzey agaroz (Prona Biomax, İspanya) bir balon joje içerisinde 100 ml 0,5X tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (0,11 M Tris, 90 mM Borat, 2,5 mM EDTA, pH:8,3, Thermo scientific, ABD) ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatılmadan ısıtılarak eritilmiştir.

Agaroz 40-45 °C'ye soğutularak içerisine 5 µl “Redsafe Nucleic Acid Staining Solution” (Intron Biotechnology, Kore) 20.000X eklenmiştir. Jel tabağına (Thermo, Almanya) taraklar yerleştirildikten sonra hava kabarcıkları oluşturmayacak şekilde hazırlanan agaroz aktarılmış ve jelin donması için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra jel tabağı elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın içine 0,5X TBE çözeltisi eklenmiştir. Kuyucukları kapatan tarak çıkartılarak bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde pipetaj yapılarak karıştırılan 5 µl ekstrakte edilmiş DNA ile 2 µl yükleme solüsyonu (Fermentas, Litvanya) kuyucuklara aktarılmıştır. Elektroforez güç kaynağında (Thermo, Almanya) akım 100 V olacak şekilde ayarlanıp bir saat süreyle elektroforez işlemi uygulanmıştır. Daha sonra jel, elektroforez tankından alınarak UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile 312 nm'de görüntüleme yapılmıştır (Şekil 5.3). Ayrıca ekstraksiyon sonrasında elde edilen DNA miktarı nanofotometre (Implen, Almanya) ile ölçülmüştür. Elde edilen DNA, vidalı kapaklı 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerinde -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 5.3. Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA'nın %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü DNA'lar ok ile gösterilmiştir.

5.4.3. *mrr1* Genine Yönelik PZR

DNA ekstraksiyonunun ardından test edilen her üç azol grubu antifungalden (flukonazol, vorikonazol, itrakonazol) herhangi birine karşı duyarlı bulunmayan (artmış temasta duyarlı ve/veya dirençli) *C. parapsilosis* izolatlarında direncin moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak amacıyla *mrr1* gen bölgesinin amplifikasyonu için üç ayrı PZR uygulanmıştır. Çoğaltılacak gen bölgesi için kullanılacak primer dizileri, PZR ürünlerinin büyüklüğü (baz çifti, bç) ve kaynak olarak kullanılan literatür Tablo 5.3'te verilmiştir. Tüm primerler (BOLIGO) liyofilize halde ve yüksek saflık derecesinde (HPLC) üretilmiştir (Bioligo, Çin).

Tablo 5.3. *mrrI* geni için PZR primer dizileri, özellikleri

Gen bölgesi	Primerler	Nükleotid Dizisi (5'-3')	bç	Kaynak
<i>mrr1</i>	<i>mrr1</i> -F1F	CTGTATGGAGAGTGAGATTTTAGGTT	1308	(136)
	<i>mrr1</i> -F3R	TCCTTGGTTACCTCATTGCTC		
	<i>mrr1</i> -F4F	ATGGAGACCATTAATTTTTTTTGACA	1401	
	<i>mrr1</i> -F6R	GAATGACTTCATTGAAATGTAATGCT		
	<i>mrr1</i> -F7F	AAGAAAATTCTTAGCTTAACTGGA	1468	
	<i>mrr1</i> -F9R	AGAAAATCTAATTGGTAAAGAAGAAAGGA		

bç: baz çifti

Primerler stok konsantrasyonu 100 µM, son çalışma konsantrasyonu ise 10 µM olacak şekilde üretim konsantrasyonuna göre steril distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Tüm PZR işlemleri için Arktik Thermal Cycler Block (Thermo Fisher Scientific, Finlandiya) ısı döngü cihazı kullanılmıştır. *C. parasilosis* ATCC 22019 PZR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Primerlerin bağlanması esnasında “touchdown” PZR protokolü, bağlanma sıcaklığı 58 °C’den başlanarak ikişer derece azaltılıp ve 54 °C’de sonlandırılarak gerçekleştirilmiştir. PZR için hazırlanan karışımın içeriği ve PZR koşulları Tablo 5.4 ve Tablo 5.5’te gösterilmiştir.

Tablo 5.4. *mrrI* geni için PZR içeriği

Distile su	8,5 µl
10X KCl Buffer	2,5 µl
dNTP (1000 mM)	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Taq Polimeraz	1,5 U
<i>mrrI</i> Forward primer (F1F/ F4F/ F7F) (10 mM)	1,5 µl
<i>mrrI</i> Reverse primer (F3R/ F6R/ F9R) (10 mM)	1,5 µl
DNA	2,5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 5.5. *mrrI* geni için PZR döngüleri

PZR Adımı	Sıcaklık	Süre (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5	
Denatürasyon	95 °C	1	2
Primer bağlanması	58 °C	1	
Uzama	72 °C	2	
Denatürasyon	95 °C	1	2
Primer bağlanması	56 °C	1	
Uzama	72 °C	2	
Denatürasyon	95 °C	1	30
Primer bağlanması	54 °C	1	
Uzama	72 °C	2	
Son uzama	72 °C	5	

5.4.3.1. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

mrr1 genini amplifiye etmek için yapılan üç PZR sonrasında aranan gen bölgesinin varlığının belirlenmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında TBE tamponu, 10X TBE stok solüsyondan 0,5X TBE olacak şekilde distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır. Bir gram (gr) moleküler düzey agaroz (Prona Biomax, İspanya) tartılarak 100 ml 0,5X TBE ile bir balon joje içerisinde karıştırılarak mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynamadan berraklaşınca kadar eritilerek hazırlanmıştır. Agaroz jel oda sıcaklığında 40-45 °C'ye kadar soğutularak içerisine 5 µl "*RedSafe Nucleic Acid Staining Solution*" (Intron Biotechnology, Kore) 20.000X eklenmiştir. Balon joje içerisindeki karışım çalkalandıktan sonra uygun tarakların konulduğu jel tabağına (Thermo, Almanya) aktarılmıştır. Yaklaşık 30 dk beklenip agarozun donmasının ardından, agaroz jel tabağıyla birlikte elektroforez tankı (Thermo, Almanya) içerisine yerleştirilmiştir. Tankın içine 0,5X TBE tampon çözeltisi ile doldurulduktan sonra tarak çıkartılarak bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde pipetaj yapılarak 5 µl PZR ürünleri ve 2 µl yükleme solüsyonu (Fermentas, Litvanya) kuyucuklara aktarılmıştır. Elektroforez güç kaynağında (Thermo, Almanya) bir buçuk saat 150 V elektrik akımında uygulanan elektroforez işleminden sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerini değerlendirilmek için belirteç olarak 100 bp plus DNA Ladder (Bioron GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

5.4.3.2. *mrr1* Genindeki Mutasyonların DNA Dizi Analizi ile Saptanması

mrr1 genindeki mutasyonların araştırılması için hedef gen bölgesi PZR ile Grossman ve ark.'nın (136) tanımladığı şekilde çoğaltılmıştır. Üç ayrı PZR sonucunda oluşan ampikonların her birinin iki yönlü DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi için hizmet alımı yapılmıştır. PZR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Gen dizilimine ait kromatogramlar SnapGene Viewer ve Unipro UGENE programları ile görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir. Elde edilen kromatogramların analizi ve değerlendirmesi

on-line veritabanı (Genbank BLAST®) kullanılarak yapılmıştır. Nükleotid ve aminoasit dizileri sokak tipi (wild type, WT) *C. parapsilosis* izolatı CDC317 *mrr1* dizisi (Genbank erişim numarası. KT160017) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen diziler referans gen ile karşılaştırılarak mutasyonlar taranmış ve tespit edilen mutasyonların aminoasit dizilimine etkisi belirlenmiştir. Aminoasit diziliminin değiştiği durumlarda, ilgili mutasyonun literatürde azol direnci ile ilişkilendirilip ilişkilendirilmediği araştırılmıştır. Elde edilen dizilere ait veriler NCBI Genbank sistemine PQ037952, PQ037953 numaraları ile yüklenmiştir.

5.4.4. *erg11* genine yönelik MAS-PZR

Lanosterol α -demetilaz (*erg11*) genindeki mutasyonlar, *C. parapsilosis*'deki azol direncinin baskın mekanizmalarından biridir. *erg11* geninde Y132F aminoasit değişikliğine neden olan A395T nokta mutasyonu azollere dirençli *C. parapsilosis* izolatlarında oldukça sık görülmektedir. *erg11* genindeki Y132F mutasyonunun *C. parapsilosis*'deki flukonazol direnci ile güçlü ilişkisi göz önüne alındığında, flukonazole dirençli *C. parapsilosis* için hızlı ve ucuz bir tarama testi olarak çalışmamızda literatürde yer alan iki ayrı MAS PZR yöntemi değerlendirilmiştir.

5.4.4.1. MAS PZR-1 Yöntemi ile A395T (Y132F) Mutasyonunun Saptanması

Çalışmamızda ilk kullanılan MAS PZR yöntemi Asadzadeh ve ark. (137) tarafından belirlenen, A395T (Y132F) mutasyonunu tespit etmek amacıyla üç ayrı primer kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde forward ve revers primerlere ek olarak mutasyonun varlığında bağlanabilecek bir mutasyon primeri bulunmaktadır. Yönteme göre *erg11* geninde A395T mutasyonu olmayan izolatlarda 323 bp uzunluğunda tek bir bant gözlenirken, A395T mutasyonu taşıyan izolatlarda 323 bp ve 231 bp uzunluğunda iki bant oluşması beklenmektedir. Çalışmada, primerler stok konsantrasyonu 100 μ M, son çalışma konsantrasyonu ise 10 μ M olacak şekilde üretim konsantrasyonuna göre steril distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Tüm PZR işlemleri için Arktik Thermal Cycler Block (Thermo Fisher Scientific, Finlandiya) ısı döngü cihazı kullanılmıştır. *C. parapsilosis* ATCC 22019 suşları PZR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda literatürden farklı olarak primerlerin bağlanması esnasında aşamasında “touchdown” PZR protokolü bağlanma sıcaklığı 60 °C’den başlanarak kademeli bir şekilde azaltılıp ve 55 °C’de

sonlandırılarak gerçekleştirilmiştir. PZR için kullanılan primerler, hazırlanan karışımın içeriği ve PZR koşulları Tablo 5.6, Tablo 5.7 ve Tablo 5.8’de verilmiştir.

Tablo 5.6. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 için primer dizileri, özellikleri

Gen bölgesi	Primer	Nükleotid Dizisi (5’-3’)	Kaynak
<i>erg11</i>	CPerg11-132F	TATCTTATGGACAGGATCCATA	(137)
	CPerg11-132R	ATAATCCAAAATTTCCCCTCTAA	
	CPerg11-132Phe	GTCTTGCATTCGGACAATCGAA	

Tablo 5.7. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 içeriği

Distile su	31,3 µl
10X KCl Buffer	5 µl
dNTP (1000mM)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM (5 µl)
Taq Polimeraz	1 U
CPerg11-132F (Forward primer) (10 mM)	1 µl
CPerg11-132R (Revers primer) (10 mM)	1 µl
CPerg11-132Phe (Mutasyon primeri) (10 mM)	0,1 µl
DNA	3 µl
Toplam Hacim	50 µl

Tablo 5.8. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 döngüleri

PZR Adımı	Sıcaklık	Süre (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5	
Denatürasyon	95 °C	1	2
Primer bağlanması	60 °C	0,5	
Uzama	72 °C	1	
Denatürasyon	95 °C	1	2
Primer bağlanması	58 °C	0,5	
Uzama	72 °C	1	
Denatürasyon	95 °C	1	30
Primer bağlanması	55 °C	0,5	
Uzama	72 °C	1	
Son uzama	72°C	10	

5.4.4.1.1. MAS PZR-1 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroföresi ile Görüntülenmesi

erg11 geninde azol direncinden ana sorumlu A395T (Y132F) mutasyonu varlığını saptamak amacıyla gerçekleştirilen MAS PZR-1’in değerlendirilmesi için %2’lik agaroz jel elektroföres yapılmıştır. Hassas terazide tartılan iki gram (gr) moleküler düzey agaroz (Prona Biomax, İspanya) bir balon joje içerisinde 100 ml 0,5X TBE tamponu ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatılmadan ısıtılarak eritilmiştir. Agaroz 40-45 °C’ye

soğutularak içerisinde 5 µl “*Redsafe Nucleic Acid Staining Solution*” (Intron Biotechnology, Kore) 20.000X eklenmiştir. Jel tabağına (Thermo, Almanya) taraklar yerleştirildikten sonra hava kabarcıkları oluşturmayacak şekilde hazırlanan agaroz aktarılmış ve jelin donması için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra jel tabağı elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın içine 0,5X TBE çözeltisi eklenmiştir. Kuyucukları kapatan tarak çıkartılarak bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde pipetaj yapılarak karıştırılan 5 µl PZR ürünleri ile 2 µl yükleme solüsyonu (Fermentas, Litvanya) kuyucuklara aktarılmıştır. Elektroforez güç kaynağında (Thermo, Almanya) akım 150 V olacak şekilde ayarlanıp bir buçuk saat süreyle elektroforez işlemi uygulanmış ve 312 nm’de UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerini değerlendirmek için belirteç olarak Gene Ruler DNA Ladder, 50 bp (Thermo, Almanya) kullanılmıştır.

5.4.4.2. MAS PZR-2 Yöntemi ile A395T (Y132F) Mutasyonunun Saptanması

erg11 geninde Y132F değişikliğine sebep olan mutasyonu (A395T) taramak için 2023 yılında geliştirilen bu ikinci yöntemde ise her izolata iki ayrı PZR reaksiyonu uygulanmaktadır (138). PZR amplifikasyonlarından ilki WT alelin varlığını tespit etmek için, ikincisi ise Y132F değişikliğinin varlığını tespit etmek için yapılmaktadır. WT alelin tespitinde forward primer olarak *erg11*-WT: 5’-CCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATGTA-3’ kullanılmaktadır. Y132F değişikliğini belirlemek için ise forward primeri olarak *erg11*-Y132F: 5’-CCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATGTT-3’ kullanılmaktadır. Her iki reaksiyonda da aynı revers primer olan *erg11*-Rev: 5’-CAATGTCACCCGTCTCTCTTCTTC-3’ kullanılmaktadır. Yönteme göre *erg11* geninde A395T mutasyonu olmayan izolatlarda *erg11*-WT primeri ile yapılan PZR sonrasında yapılan jel elektroforezde 443 bp uzunluğunda bir bant beklenirken, A395T mutasyonu taşıyan izolatlarda ise *erg11*-Y132F primeri ile yapılan PZR sonrasında 443 bp uzunluğunda bir bant oluşması beklenmektedir. Çalışmada, primerler stok konsantrasyonu 100 µM, son çalışma konsantrasyonu ise 10 µM olacak şekilde üretim konsantrasyonuna göre steril distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Tüm PZR işlemleri için Arktik Thermal Cycler Block (Thermo Fisher Scientific, Finlandiya) ısı döngü cihazı kullanılmıştır. *C. parasilosis* ATCC 22019 suşları PZR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PZR için kullanılan primerler, hazırlanan karışımın içeriği ve PZR koşulları Tablo 5.9, Tablo 5.10 ve Tablo 5.11’de verilmiştir.

Tablo 5.9. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 için primer dizileri, özellikleri

Gen Bölgesi	Primer	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Kaynak
<i>erg11</i>	<i>erg11</i> -WT	CCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATGTA	(138)
	<i>erg11</i> -Y132F	CCCCTGTTTTTGGAAAAGGTGTTATGTT	
	<i>erg11</i> -Rev	CAATGTCACCCGTCTCTCTTCTTC	

Tablo 5.10. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 içeriği

Distile su	9,5 µl
Master mix	12,5 µl
<i>erg11</i> -WT (10 mM)	0,5 µl
<i>erg11</i> -Y132F (10 mM)	0,5 µl
<i>erg11</i> -Rev (10 mM)	0,5 µl
DNA	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 5.11. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 döngüleri

PZR Adımı	Sıcaklık	Süre (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	3	
Denatürasyon	95 °C	0,5	35
Primer bağlanması	59 °C	0,5	
Uzama	72 °C	1	
Son uzama	72°C	5	

5.4.4.2.1. MAS PZR-2 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi

erg11 geninde azol direncinden ana sorumlu A395T mutasyonu varlığını saptamak amacıyla gerçekleştirilen ikinci yöntem olan MAS PZR-2'nin değerlendirilmesi için %1'lik agaroz jel elektrofrez kullanılmıştır. Hassas terazide tartılan bir gram (gr) moleküler düzey agaroz (Prona Biomax, İspanya) bir balon joje içerisinde 100 ml 0,5X TBE tamponu ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatılmadan ısıtılarak eritilmiştir. Agaroz 40-45 °C'ye soğutularak içerisine 5 µl “Redsafe Nucleic Acid Staining Solution” (Intron Biotechnology, Kore) 20.000X eklenmiştir. Jel tabağına (Thermo, Almanya) taraklar yerleştirildikten sonra hava kabarcıkları oluşturmayacak şekilde hazırlanan agaroz aktarılmış ve jelin donması için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra jel tabağı elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Tankın içine 0,5X TBE çözeltisi eklenmiştir. Kuyucukları kapatan tarak çıkartılarak bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde pipetaj yapılarak karıştırılan 5 µl PZR ürünleri ile 2 µl yükleme solüsyonu (Fermentas, Litvanya) kuyucuklara aktarılmıştır. Elektrofrez güç kaynağında (Thermo, Almanya) akım 150 V olacak şekilde ayarlanıp bir saat

süreyile elektroforez işlemi uygulanmış ve 312 nm’de UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerini değerlendirmek için belirteç olarak 100 bp plus DNA Ladder, (Bioron GmbH, Almanya) kullanılmıştır. WT izolatlarda, *erg11-WT* ve *erg11-Rev* primerleri ile yapılan PZR sonrası jel elektroforezde 443 bp, mutasyon taşıyan izolatlarda ise *erg11-Y132F* ve *erg11-Rev* primerleri ile yapılan PZR sonucunda 443 bp uzunluğunda bant saptanması beklenmektedir.

5.5. İstatistiksel Analiz

EUCAST referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile VITEK 2 yöntemi arasındaki uyumu değerlendirmede Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (“*U.S. Food and Drug Administration*”, FDA) önerileri doğrultusunda; çok büyük hata (ÇBH), büyük hata (BH), küçük hata (kH), esansiyel uyum (EU) ve kategorik uyum (KU) hesaplanmıştır (139). Referans değerlerin +/- iki dilüsyonu içindeki MİK’ler, EU olarak kategorize edilmiştir. KU’nun hesaplanmasında EUCAST türlerle özgü sınır değerleri uygulanmıştır. Test ve referans MİK’ler aynı yorumlayıcı kategoriye girdiğinde kategorik uyumlu olarak kabul edilmiştir. ÇBH, EUCAST mikrodilüsyon yöntemiyle dirençli ancak test yöntemiyle duyarlı (yanlış duyarlı) izolatların oranını tanımlamıştır. ÇBH hesaplanırken “ÇBH= ÇBH saptanan izolat sayısıx100/Referans yöntem ile dirençli saptanan izolat sayısı” formülü kullanılmıştır. BH, EUCAST mikrodilüsyon yöntemiyle duyarlı ancak test yöntemiyle dirençli (yalancı dirençli) izolatların oranını tanımlamıştır BH hesaplamak için kullanılan formül; “BH= BH saptanan izolat sayısıx100/Referans yöntem ile duyarlı saptanan izolat sayısı”dır. kH ise referans kategori sonucu dirençli veya duyarlı ve VITEK 2 sonucu artmış temasta duyarlı saptanan veya referans sonucu artmış temasta duyarlı olduğunda VITEK 2 cihaz sonucu dirençli veya duyarlı saptanmasıdır. kH oranını hesaplamak için kullanılan formül; “kH= kH saptanan izolat sayısıx100/tüm izolatlar”dır. FDA tarafından iki yöntemin karşılaştırılmasında en az 30 dirençli izolat kullanılması önerilmektedir. FDA tarafından değerlendirilen yöntem için kabul edilebilirlik kriterleri şu şekildedir (139):

- 1) EU ve KU yüzdesi > %89,9
- 2) Test edilen duyarlı organizma sayısına bağlı olarak <%3 BH oranı
- 3) Test edilen dirençli organizma sayısına bağlı olarak gerçek ÇBH oranı için %95 üst güven aralığı sınırı %7,5’in altında, %95’lik alt güven sınırı %1,5’in altında olmalıdır.

- 4) Test edilen yöntemin test edilen herhangi bir cins veya tür için üreme başarısızlığı oranları $< \%10$ olmalıdır.

Çalışmada VITEK 2 yönteminde ÇBH için %95 güven aralığı belirlenerek referans yöntemle uyumu değerlendirilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkiyi incelemek için Pearson Ki-Kare Testi ve Fisher's Exact Testi uygulanmıştır. Yaş ortalamaları arasındaki farkın değerlendirilmesinde Bağımsız Örneklem T Testi (Independent Samples T Test) kullanılmıştır. $p < 0,05$ değeri iki değişken arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki varlığı şeklinde kabul edilmiştir. Çalışmada kullanılan istatistik analizlerinde IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılmıştır.



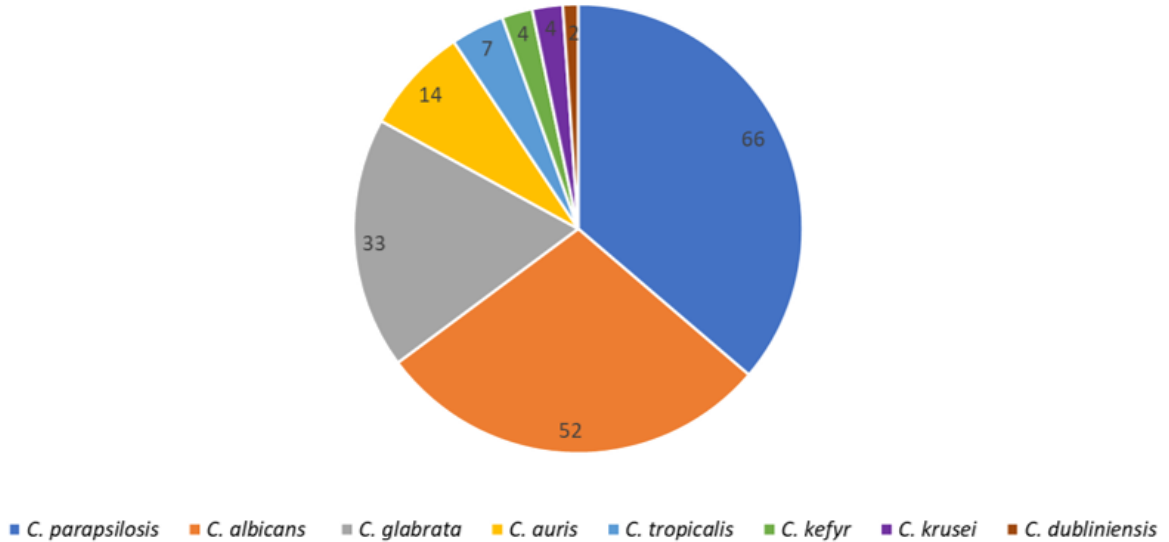
6. BULGULAR

6.1. İzolatlar Ait Genel Özellikler

Laboratuvarımızda 2021-2023 yılları arasında 220 *Candida* ilişkili KAE saptanmıştır. Çalışma protokolü uyarınca, her hastadan aynı *Candida* türüne ait sadece ilk izolat değerlendirmeye alındığında 182 *Candida* ilişkili KAE olduğu değerlendirilmiştir.

İzolatların dağılımları incelendiğinde 66 *C. parapsilosis* (%36,3), 52 *C. albicans* (%28,6), 33 *C. glabrata* (%18,1), 14 *C. auris* (%7,7), yedi *C. tropicalis* (%3,8), dört *C. kefyr* (%2,2), dört *C. krusei* (%2,2) ve iki *C. dubliniensis* (%1,1) olduğu saptanmıştır (Şekil 6.1). Bu izolatlar arasından VITEK 2 sonucu olan, stok kültürlerinden canlandırılabilen ve izolat sayısı 20'nin üzerinde olan türler çalışmada değerlendirmeye alınmıştır. Buna göre, 2021-2023 yıllarında 132 KAE öntanıli hastadan alınan kan kültürlerinde üremiş olan 57 *C. parapsilosis* (%42,5), 49 *C. albicans* (%36,6) ve 28 *C. glabrata* (%20,9) olmak üzere toplam 134 *Candida* izolatı incelenmiştir.

2021-2023 Yılları Arasında *Candida* Kan Akımı İzolatlarının Dağılımı



Şekil 6.1. 2021-2023 yılları arasında kandidemi etkenlerinin dağılımı

*Şekil üzerinde izolat sayısı yer almaktadır.

İzolatları çalışmaya alınan 132 hastanın 65'i (%49,3) erkek, 67'si (%50,7) kadındır. Hastaların 81'i (%61,4) YBÜ'de, 51'i ise (%38,6) diğer servislerde yatmaktaydı. Hastalara ait

özellikler ve kandidemi açısından tanımlanmış risk faktörlerinin varlığı açısından ve YBÜ ve diğer servislerin karşılaştırması Tablo 6.1’de verilmiştir.

Tablo 6.1. Hastalara ait özellikler ve kandidemi risk faktörlerinin yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde karşılaştırması

Hasta Özellikleri		Toplam [n (%)]	YBÜ [n (%)] 61,4 (81)	Diğer Servisler [n (%)] 38,6 (51)	p
Cinsiyet	Erkek	%49,2 (65)	%44,4 (36)	%56,8 (29)	0,165
	Kadın	%50,3 (67)	%55,6 (45)	%43,2 (22)	
Yaş ortalaması		65,6 ±2	65,6 ±1,8	65,5 ±2,4	0,984
İnvaziv tıbbi cihaz varlığı		%63,6 (84)	%75,3 (61)	%45,1 (23)	0,000
SVK varlığı		%62,1 (82)	%65,4 (53)	%56,8 (29)	0,323
Kronik hastalıklar*		%61,4 (81)	%60,5 (49)	%62,7 (32)	0,664
Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı		%51,5 (68)	%55,5 (45)	%45,1 (23)	0,242
Mekanik ventilasyon		%49,2 (65)	%65,4 (53)	%23,5 (12)	0,000
Cerrahi öyküsü		%31,1 (41)	%28,4 (23)	%35,3 (18)	0,404
Önceden flukonazol kullanımı		%27,3 (36)	%30,9 (25)	%21,6 (11)	0,243
Malignite		%27,3 (36)	%28,4 (23)	%25,5 (13)	0,715
TPN		%25 (33)	%23,5 (19)	%27,4 (14)	0,606
İmmüsupresif tedavi		%13,6 (18)	%16,4 (13)	%9,8 (5)	0,309
İntraabdominal cerrahi		%10,6 (14)	%8,6 (7)	%13,7 (7)	0,356
Hemodiyaliz uygulanması		%5,3 (7)	%4,9 (4)	%5,9 (3)	0,814

Genel %: 132 hastada risk faktörünün bulunma yüzdesi

YBÜ %, Diğer %: Risk faktörünün YBÜ ve diğer servislerde yatan hastalar arasındaki bulunma oranı

n: İzolat sayısı

SVK: Santral venöz katater

TPN: Total parenteral nutrisyon

*Kronik hastalıklar içerisinde kronik böbrek hastalığı, koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, diyabetes mellitus yer almaktadır.

Servislere göre izolatların dağılımı incelendiğinde, izolatların 84’ü (%62,7) YBÜ’de 29’u (%21,6) dahili servislerde ve 21’i (%15,7) cerrahi servislerde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilmiştir. Suşların izole edildiği hastaların yattığı servislere göre tür düzeyinde dağılımı Tablo 6.2’de gösterilmiştir.

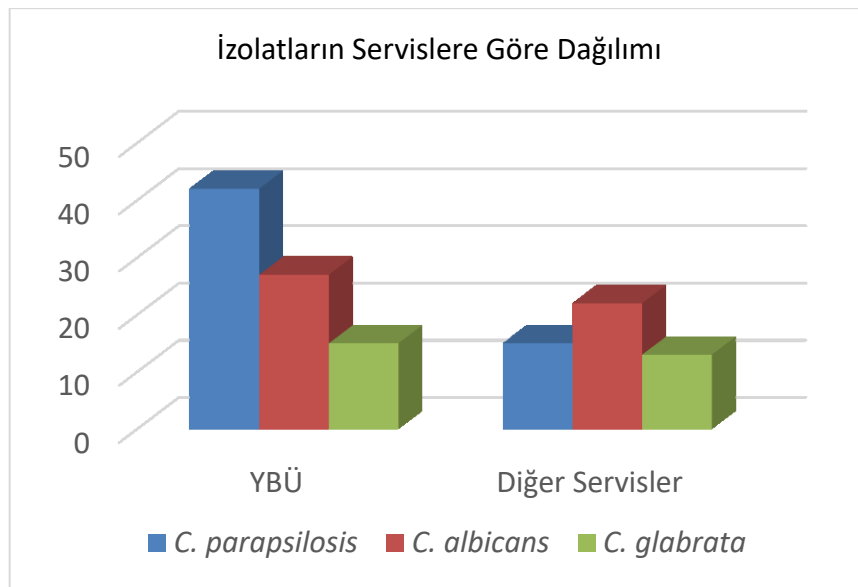
Tablo 6.2. Servislere göre izolatların tür düzeyinde dağılımı

<i>Candida</i> Türü	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler		Toplam [n (%)]	p
		Dahili Servisler [n (%)]	Cerrahi Servisler [n (%)]		
<i>C. parapsilosis</i>	42 (50)	9 (31)	6 (28,6)	57 (42,5)	0,016
<i>C. albicans</i>	27 (32,1)	12 (41,4)	10 (47,6)	49 (36,6)	0,168
<i>C. glabrata</i>	15 (17,9)	8 (27,6)	5 (23,8)	28 (20,9)	0,205
Toplam	84 (62,7)	29 (21,6)	21 (15,7)	134 (100)	

*Tabloda verilen yüzde (%) değeri izolatın YBÜ, Dahili ve Cerrahi servislerdeki izole edilme oranını ifade etmektedir.

YBÜ’de kandidemi hastalarından en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%50, n=42) iken diğer servislerde *C. albicans* (%44, n=22) olmuştur. YBÜ’de *C. parapsilosis*’i sırasıyla *C. albicans* (%32,1, n=27) ve *C. glabrata*

(%17,9, n=15) izlerken diğer servislerde *C. albicans*’ı sırasıyla *C. parapsilosis* (%30, n=15) ve *C. glabrata* (%26, n=13) izlemiştir. *C. parapsilosis*’in YBÜ ve diğer servisler arasındaki sıklığı istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,016$) farklılık gösterirken diğer türlerin dağılımında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 6.2). İzolatların YBÜ ve diğer servislere göre dağılım grafiği Şekil 6.2’de gösterilmiştir.



Şekil 6.2. İzolatların yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislere göre tür düzeyinde dağılımı

*Verilen değerler izolat sayısıdır.

6.2. İzolatların Antifungal İlaçlara İn Vitro Duyarlılık Sonuçları

134 izolatın tamamına EUCAST'ın belirlediği referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon testi ile flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, anidulafungin, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B için ve VITEK 2 otomatize sistemi ile flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin, amfoterisin B ve flusitozin için AFDT çalışılmıştır.

6.2.1. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Sonuçları

Sonuçlar EUCAST'ın mayalar için belirlediği sınır değer tablosuna göre değerlendirilmiştir (135). Klinik sınır değeri olan türler duyarlı (S), artmış temasta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak, ECOFF değeri olan türler sokak tipi (WT) ve sokak tipi olmayan (non-WT) olarak sınıflandırılmıştır. Klinik sınır değerler tablosuna göre EUCAST sıvı mikrodilüsyon AFDT sonuçları Tablo 6.3'te, ECOFF'a göre değerlendirilen türler için veriler ise Tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.3. EUCAST sıvı mikrodilüsyon antifungal duyarlılık testi sonuçları

Candida Türü	Duyarlılık Durumu	Flukonazol			Vorikonazol			İtrakonazol			Mikafungin			Anidulofungin			Anfoterisin B		
		Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	Diğer Servisler [n (%)]
Toplam	n	134	84	50	106	69	37	106	69	37	134	84	50	134	84	50	134	84	50
	R	45 (33,6)	33 (39,3)	12 (24)	37 (34,9)	29 (42)	8 (21,6)	26 (24,5)	21 (30,4)	5 (13,5)	1 (0,7)	1 (1,2)	0	8 (6)	4 (4,8)	4 (8)	4 (3)	1 (1,2)	3 (6)
	I	27 (20,1)	16 (19)	11 (22)	5 (4,7)	4 (5,8)	1 (2,7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	62 (46,3)	35 (41,7)	27 (54)	64 (60,4)	36 (52,2)	28 (75,7)	80 (75,5)	48 (69,6)	32 (86,5)	133 (99,3)	83 (98,8)	50 (100)	126 (94)	80 (95,2)	46 (92)	130 (97)	83 (98,8)	47 (94)
<i>C. parapsilosis</i>	n	57	42	15	57	42	15	57	42	15	57	42	15	57	42	15	57	42	15
	R	39 (68,4)	30 (71,4)	9 (60)	37 (64,9)	29 (69,1)	8 (53,3)	20 (35,1)	16 (38,1)	4 (26,7)	0	0	0	0	0	0	1 (2,8)	1 (2,4)	0
	I	2 (3,5)	2 (4,8)	0	3 (5,3)	3 (7,1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	16 (28,1)	10 (23,8)	6 (40)	17 (29,8)	10 (23,8)	7 (46,7)	37 (64,9)	26 (61,9)	11 (73,3)	57 (100)	42 (100)	15 (100)	57 (100)	42 (100)	15 (100)	56 (97,2)	41 (97,6)	15 (100)
<i>C. albicans</i>	n	49	27	22	49	27	22	49	27	22	49	27	22	49	27	22	49	27	22
	R	3 (6,1)	2 (7,4)	1 (4,6)	0	0	0	6 (12,2)	5 (18,6)	1 (4,6)	2 (1)	1 (3,7)	0	0	0	0	3 (6,1)	0	3 (13,6)
	I	0	0	0	2 (4,1)	1 (3,8)	1 (4,5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	46 (93,9)	25 (92,6)	21 (95,4)	47 (95,9)	26 (96,2)	21 (95,5)	43 (87,8)	22 (81,4)	21 (95,4)	98 (48)	26 (96,7)	22 (100)	49 (100)	27 (100)	22 (100)	46 (93,9)	27 (100)	19 (86,4)
<i>C. glabrata</i>	n	28	15	13	-	-	-	-	-	-	28	15	13	28	15	13	28	15	13
	R	3 (10,7)	1 (6,7)	2 (15,3)	-	-	-	-	-	-	0	0	0	8 (28,6)	4 (26,7)	4 (30,8)	0	0	0
	I	25 (89,3)	14 (93,3)	11 (84,7)	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	-	-	-	-	-	-	28 (100)	15 (100)	13 (100)	20 (71,4)	11 (73,3)	9 (69,2)	28 (100)	15 (100)	13 (100)

Tablo 6.4. Vorikonazol ve itraconazol için ECOFF değerlerine göre sokak tipi (WT) ve mutant (non-WT) olarak değerlendirilen *C. glabrata* izolatlarının EUCAST sıvı mikrodilüsyon ve VITEK 2 yöntemine göre antifungal duyarlılık testi sonuçları

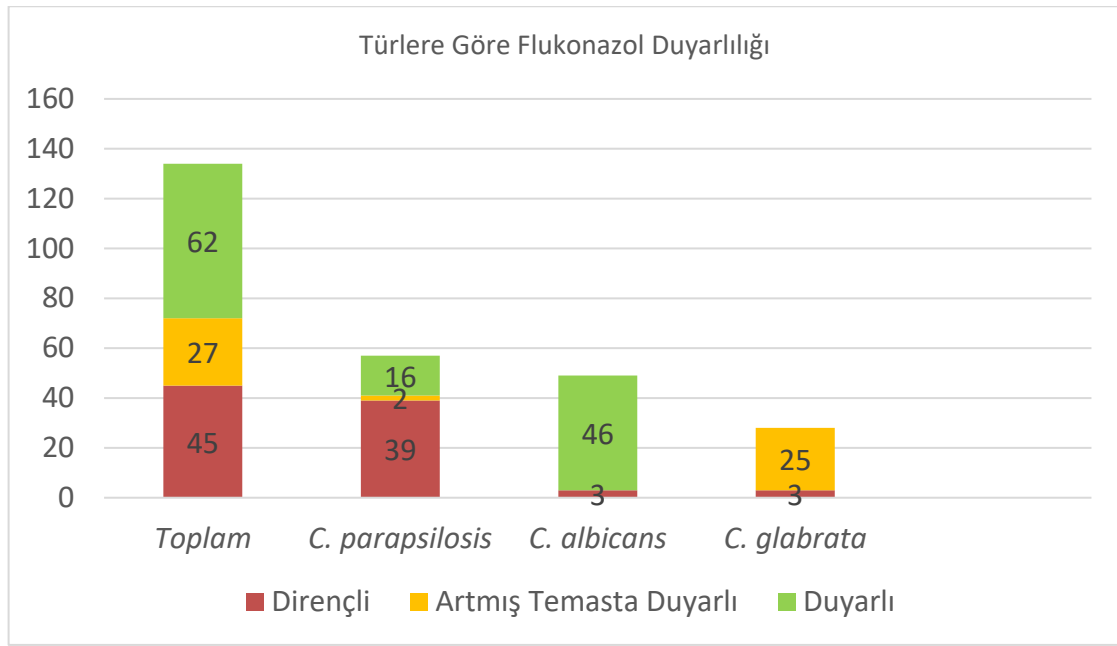
<i>Candida</i> Türü	Test Yöntemi	Duyarlılık Kategorisi	Vorikonazol			İtraconazol		
			Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	YBÜ Dışı [n (%)]	Genel [n (%)]	YBÜ [n (%)]	YBÜ Dışı [n (%)]
<i>C. glabrata</i> * n=28	EUCAST	WT	27 (96, 4)	15 (100)	12 (92,3)	28 (100)	15 (100)	13 (100)
		non-WT	1 (3,6)	-	1 (7,7)	-	-	-
	VITEK 2	WT	27 (96,4)	15 (100)	12 (92,3)			
		non-WT	1 (3,6)	-	1 (7,7)			

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, WT: Sokak tipi (wild type), non-WT: Sokak tipi olmayan

* *C. glabrata* vorikonazol ECOFF ≤ 1 µg/ml, itraconazol ECOFF ≤ 2 µg/ml

6.2.1.1. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Flukonazol Sonuçları

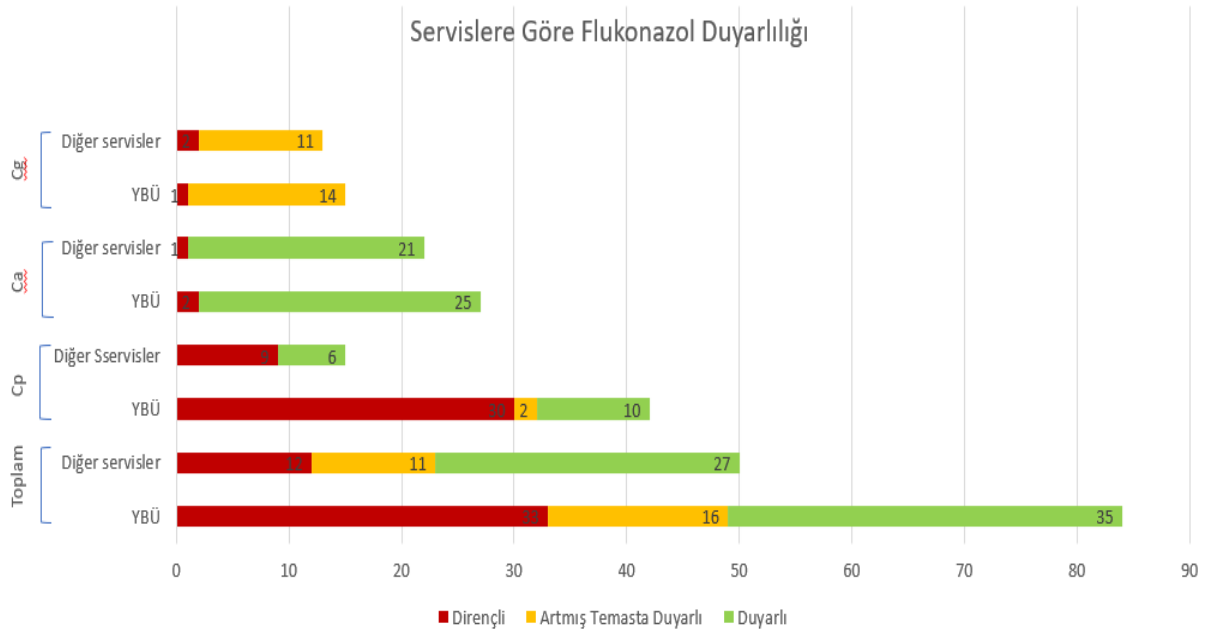
134 *Candida* KAE izolatının flukonazole karşı duyarlılığı EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 0,125-64 µg/ml aralığında çalışılmıştır. Buna göre flukonazole karşı izolatların tamamı değerlendirildiğinde 45'inin (%33,6) dirençli, 27'sinin (%20,1) artmış temasta duyarlı ve 62'sinin %46,3'ünün duyarlı (n=62) olduğu saptanmıştır (Tablo 6.3 ve Tablo 6.5). Flukonazol için 57 *C. parapsilosis* izolatının 39'u (%68,4) dirençli, ikisi (%3,5) artmış temasta duyarlı ve 16'sı (%28,1) duyarlı olarak sonuçlanmıştır. 49 *C. albicans* izolatının üçü (%6,1) dirençli, 46'sı (%93,9) duyarlı olarak saptanmıştır. 28 *C. glabrata* izolatının üçü (%10,7) dirençli, 25'i (89,3) artmış temasta duyarlı olarak sonuçlanmıştır. İzolatların türlere göre flukonazol duyarlılığı Şekil 6.3'te gösterilmektedir.



Şekil 6.3. İzolatların türlere göre flukonazol duyarlılık sonuçları

Çalışmamızda değerlendirilen izolatların 84'ü (%62,7) YBÜ'de yatan hastalardan izole edilmiştir. Bu izolatların flukonazole duyarlılığı test edildiğinde 33'ünün (%39,3) dirençli, 16'sının (%19) artmış temasta duyarlı ve 35'inin (%41,7) duyarlı olduğu saptanmıştır. YBÜ hastalarında kandideminin en sık etkeni olan *C. parapsilosis* (n=42) izolatlarının 30'u (%71,4) dirençli, ikisi (%4,8) artmış temasta duyarlı ve 10'u (%23,8) duyarlı bulunmuştur. YBÜ hastalarından izole edilen 27 *C. albicans*'ın ikisi (%7,4) dirençli ve 25'i (%92,6) duyarlı olarak saptanmıştır. 15 *C. glabrata* izolatından biri (%6,7) dirençli, 14'ü (%93,3) artmış temasta duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.3, Şekil 6.4).

Diğer servislerde yatan hastalardan gelen 50 izolatın flukonazole duyarlılığı değerlendirildiğinde 12'si (%24) dirençli, 11'i (%22) artmış temasta duyarlı ve 27'si (%54) duyarlı olduğu görülmüştür. İzolatlar tür düzeyinde incelendiğinde 15 *C. parapsilosis* izolatının dokuzu (%60) dirençli, altısı (%40) duyarlı; 22 *C. albicans*'ın biri (%4,6) dirençli, 21'i (%95,4) duyarlı; 13 *C. glabrata*'nın ise ikisi (%15,3) dirençli, 11'i (%84,7) artmış temasta duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.3). Türlere göre YBÜ ve diğer servislerden kaynaklanan izolatların duyarlılığı Şekil 6.5'te gösterilmiştir.



Şekil 6.4. Türler gere yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların flukonazol duyarlılık sonuçları

Tüm: Çalışmadaki toplam *Candida* izolatları, Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata* * Satırlarda izolat sayısı verilmiştir.

YBÜ kaynaklı izolatlarda genel olarak flukonazol direnci sık olarak belirlenmesine rağmen diğer servislerden izole edilen kökenlerde flukonazol direnç sıklığı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,070$) (Tablo 6.5).

Tablo 6.5. Hastane bölümlerine göre direnç durumu

Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam [n (%)]	p
	R [n (%)]	S, I [n (%)]		
YBÜ	33 (73,3)	51 (57,3)	84 (62,7)	0,070
Diğer servisler	12 (26,7)	38 (42,7)	50 (37,3)	
Toplam	45 (100)	89 (100)	134 (100)	

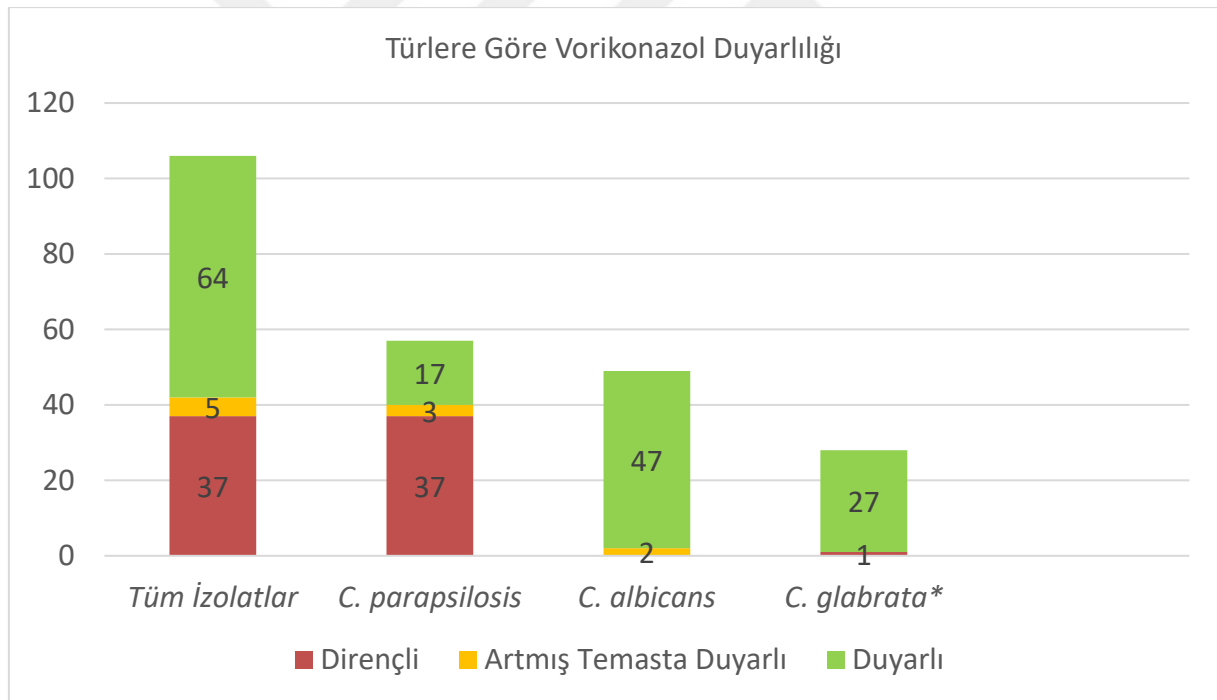
%: Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli, I: Artmış temasta duyarlı

6.2.1.2. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Vorikonazol Sonuçları

134 *Candida* KAE izolatının vorikonazole duyarlılığı EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 0,015-8 µg/ml aralığında çalışılmıştır. Vorikonazole dirençli saptanan izolatların tamamı (n=37) *C. parapsilosis* türüne aittir ve bu izolatların bir tanesi hariç tamamının flukonazole de direnci mevcut olup çapraz azol direnci gözlenmiştir. Flukonazole dirençli

olmayan tek izolatin ise flukonazol MİK değeri 4 µg/ml olup flukonazole artmış temasta duyarlı olduğu görülmüştür.

Klinik sınır değeri dikkate alınarak değerlendirilen 106 izolatin 37'si (%34,9) dirençli, beşi (%4,7) artmış temasta duyarlı ve 64'ü (%60,4) duyarlı olarak saptanmıştır. Türler göre vorikonazol duyarlılığı incelendiğinde *C. parapsilosis*'in 37'si (%64,9) dirençli, üçü (%5,3) artmış temasta duyarlı ve 17'si (%29,8) duyarlı; *C. albicans*'ın ikisi (%4,1) artmış temasta duyarlı ve 47'si (%95,9) duyarlı olup dirençli izolat saptanmamıştır. *C. glabrata*'nın vorikonazol için EUCAST 2023 rehberinde klinik sınır değeri bulunmadığından klinik duyarlılık kategorisi değerlendirilememektedir. *C. glabrata*'nın flukonazol için direnç fenotipi izlenmeyen WT kökenleri direnç fenotipine sahip non-WT kökenlerden ayıran ECOFF değeri ≤ 1 µg/ml'dir. ECOFF'a göre 28 *C. glabrata* izolatinin 27'sinin (%96,4) WT, birinin (%3,6) non-WT olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.3, Tablo 6.4). Türler göre izolatların vorikonazole duyarlılık kategorisi Şekil 6.5'de verilmiştir.



Şekil 6.5. Türler göre vorikonazol duyarlılık sonuçları

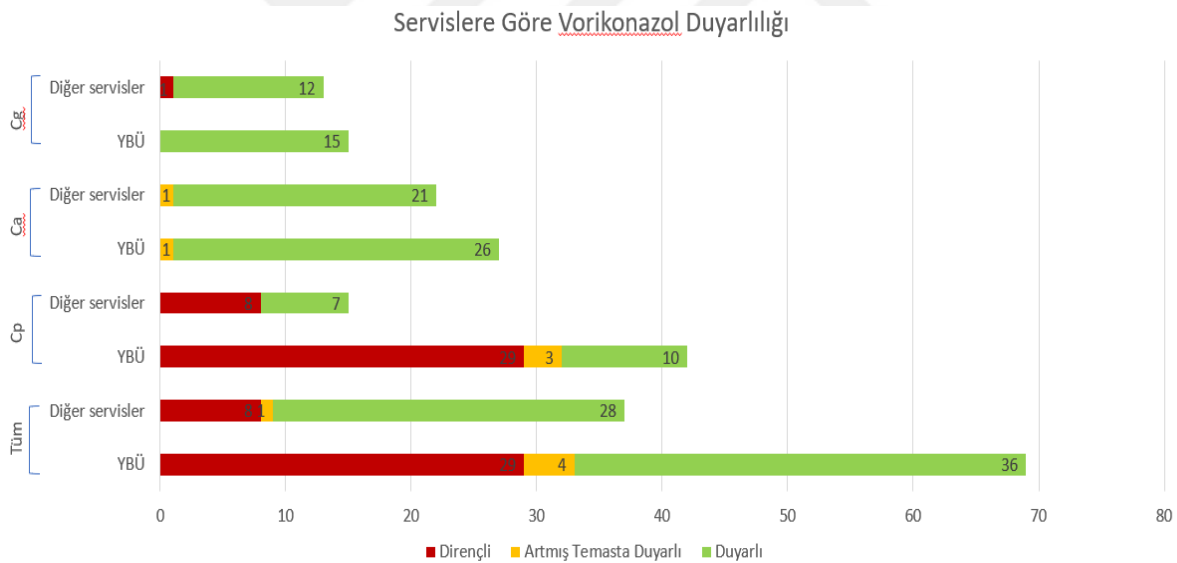
*WT/non-WT ayrımı *C. glabrata* için ECOFF değerlerine göre belirlenmiştir. *C. glabrata* dışındaki türler klinik sınır değerine göre duyarlı, dirençli ve artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Tüm izolatlara *C. glabrata* dahil edilmemiştir. Sütunlarda izolat sayıları verilmiştir.

YBÜ'de yatan hastalardan izole edilen 69 izolat vorikonazol için klinik sınır değere göre değerlendirilmiş ve 29'u (%42) dirençli, dördü (%5,8) artmış temasta duyarlı ve 36'sı (%52,1) duyarlı olarak bulunmuştur. YBÜ'de yatan kandidemili hastalardan izole edilen 42 *C. parapsilosis*'in 29'u vorikonazole dirençli, üçü (%7,1) artmış temasta duyarlı ve 10'u (%23,8)

duyarlı; 27 *C. albicans*'ın biri (%3,8) artmış temasta duyarlı, 26'sı (%96,2) duyarlı olarak saptanmıştır. 15 *C. glabrata*'nın vorikonazol için ECOFF değerine göre tamamı WT olarak belirlenmiştir (Tablo 6.4).

Diğer servislerden kaynaklanan 37 izolat vorikonazol için klinik sınır değerine göre değerlendirildiğinde izolatların sekizinin (%21,6) dirençli, birinin (%2,7) artmış temasta duyarlı ve 28'inin (%75,7) duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer servislerdeki KAE olan *Candida*'ların türlere göre vorikonazol duyarlılığı ise şu şekildedir; *C. parapsilosis*'in sekizi (%53,3) dirençli, yedisi (%46,7) duyarlı; *C. albicans*'ın biri (%4,5) artmış temasta duyarlı ve 21'i (%95,5) duyarlı olarak belirlenmiştir (Tablo 6.3). ECOFF değerine göre (≤ 1 µg/ml) değerlendirilen *C. glabrata*'nın 12'si (%92,3) WT, biri (%7,7) non-WT (n=1) olarak belirlenmiştir (Tablo 6.4).

Türlere göre YBÜ ve diğer servislerden kaynaklanan izolatların vorikonazole duyarlılığı Şekil 6.6'da gösterilmiştir.



Şekil 6.6. Türlere göre yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların vorikonazol duyarlılık sonuçları

Tüm: Tüm izolatlara *C. glabrata* dahil edilmemiştir, klinik sınır değeri olan türler hesaplanmıştır. Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata* *WT ve mutant tip ayrımı *C. glabrata* için ECOFF değerlerine göre belirlenmiştir. *C. glabrata* dışındaki türler klinik sınır değerine göre duyarlı, dirençli ve artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Satırlarda izolat sayısı verilmiştir.

YBÜ kaynaklı izolatlarda diğer servislerden gelen izolatlara göre vorikonazol direncinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,036$) (Tablo 6.6).

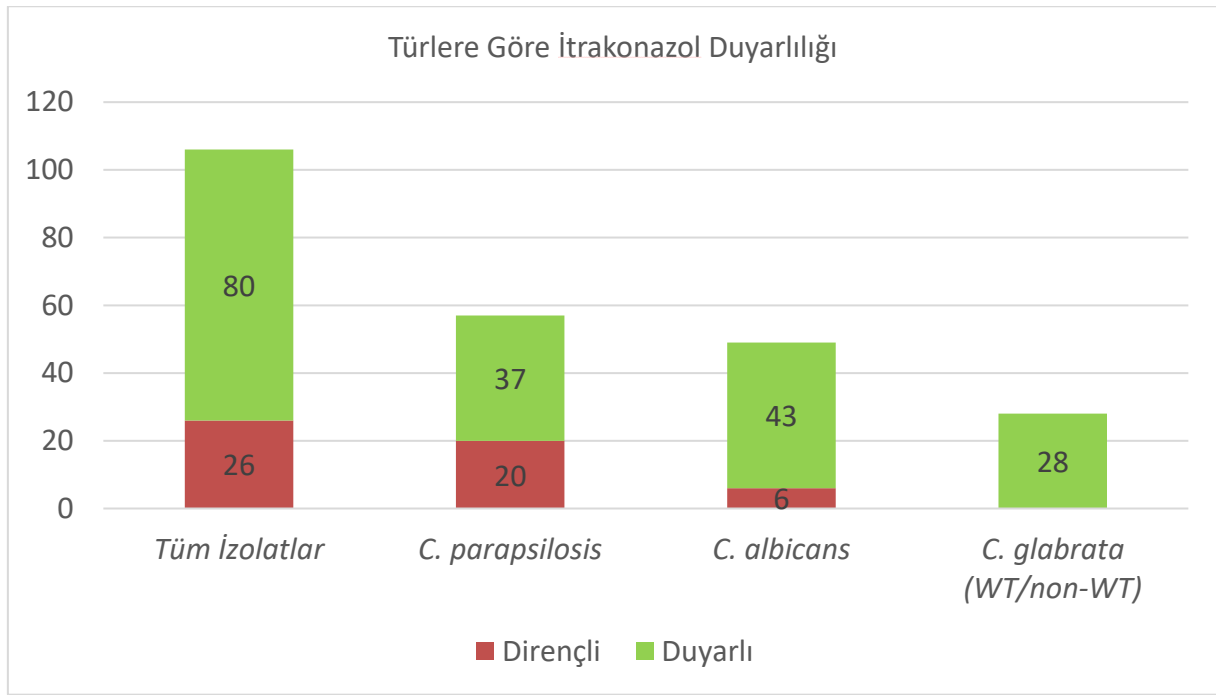
Tablo 6.6. Hastane bölümlerine göre vorikonazol duyarlılık sonuçları

Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam	p
	R [n (%)]	S, I [n (%)]		
YBÜ	29 (78,4)	40 (58)	69 (65,1)	0,036
Diğer Servisler	8 (21,6)	29 (42)	37 (34,9)	
Toplam	37 (100)	69 (100)	106 (100)	

%; Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli, I: Artmış temasta duyarlı

6.2.1.3. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre İtrakonazol Sonuçları

134 *Candida* kan akımı izolatının itrakonazole karşı duyarlılığı EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 0,015-8 µg/ml aralığında çalışılmıştır. Klinik sınır değere göre 106 izolatın itrakonazole duyarlılığı değerlendirildiğinde izolatların 26'sı (%24,5) dirençli ve 80'i (%75,5) duyarlı olarak saptanmıştır. İtrakonazole dirençli 26 izolatın altısı (%23) *C. albicans*, 20'si (%77) *C. parapsilosis* türüne aittir. Türler gere göre itrakonazol duyarlılığı incelendiğinde *C. parapsilosis*'in 20'sinin (%35,1) dirençli, 37'sinin (%64,9) duyarlı; *C. albicans*'ın altısının (%12,2) dirençli, 43'ünün (%87,8) duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.3). *C. glabrata*'nın itrakonazol için EUCAST 2023 rehberinde klinik sınır değeri bulunmadığından klinik duyarlılık kategorisi değerlendirilememektedir. *C. glabrata*'nın itrakonazol için direnç fenotipi izlenmeyen WT kökenleri direnç fenotipine sahip non-WT kökenlerden ayıran ECOFF değeri ≤2 µg/ml'dir. ECOFF'a göre 28 *C. glabrata* izolatının tamamı WT olarak belirlenmiştir (Tablo 6.4). Türler gere göre izolatların itrakonazole duyarlılığı Şekil 6.7'de verilmiştir.

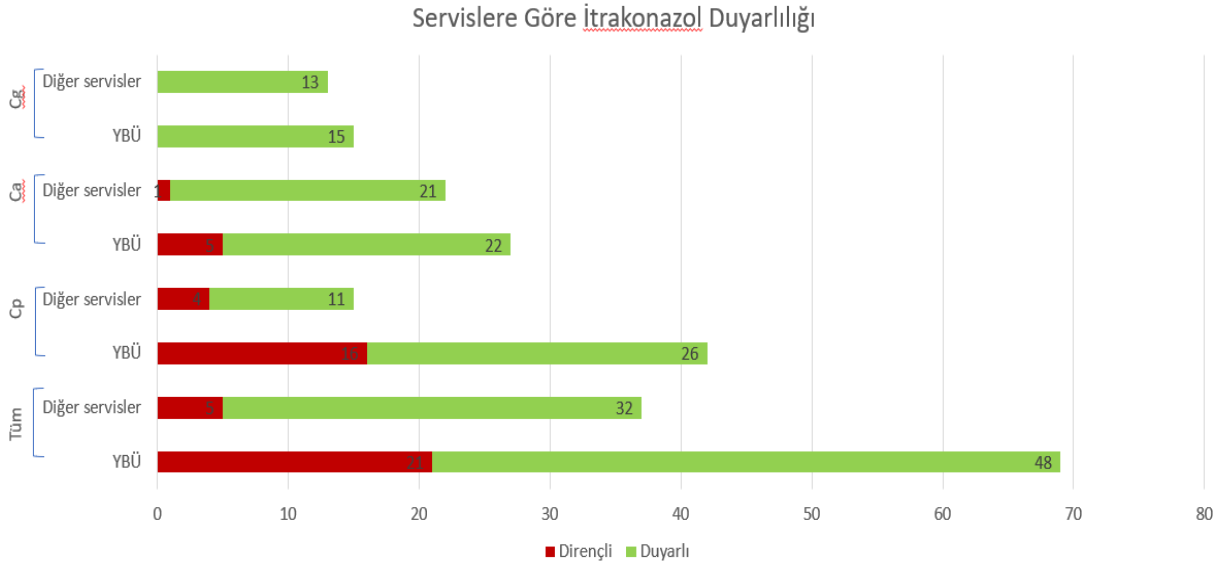


Şekil 6.7. Türlere göre itrakonazol duyarlılık sonuçları

*WT/non-WT ayrımı *C. glabrata* için ECOFF değerlerine göre belirlenmiştir. *C. glabrata* dışındaki türler klinik sınır değerine göre duyarlı, dirençli ve artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Tüm izolatlara *C. glabrata* dahil edilmemiştir. Sütunlarda izolat sayıları verilmiştir.

YBÜ’de yatan hastalardan izole edilen 69 izolat itrakonazol için klinik sınır değere göre değerlendirildiğinde izolatların 21’i (%30,4) dirençli ve 48’i (%69,6)’u duyarlı olarak bulunmuştur. Dirençli izolatların beşi (%23,8) *C. albicans* 16’sı (%76,2) *C. parapsilosis* türlerine aittir. Türlere göre YBÜ kaynaklı izolatların duyarlılık profilleri incelendiğinde *C. parapsilosis*’in 16’sı (%38,1) dirençli, 26’sı (%61,9) duyarlı; *C. albicans*’ın beşi (%18,6) dirençli, 22’si (%81,4) duyarlı olduğu saptanmıştır (Tablo 6.3). YBÜ kaynaklı 15 *C. glabrata*’nın ECOFF değerine göre tamamının WT olduğu saptanmıştır (Tablo 6.4).

İzolatların diğer servislerde beşi (13,5) itrakonazole dirençli, 32’si (86,5) duyarlıdır. Türlere göre incelendiğinde 15 *C. parapsilosis*’in dördü (%26,7) dirençli, 11’i (%73,3) duyarlı; 22 *C. albicans*’ın biri (%4,6) dirençli, 21’i (%95,4) duyarlı olarak saptanmıştır. 13 *C. glabrata*’nın tamamı ECOFF’a göre WT olarak belirlenmiştir. Türlere göre YBÜ ve diğer servislerde izolatların itrakonazole duyarlılığı Şekil 6.8’de gösterilmiştir.



Şekil 6.8. Türler gere yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların itrakonazole duyarlılık sonuçları

Tüm: Tüm izolatlara *C. glabrata* dahil edilmeyip klinik sınır değeri olan türler değerlendirilmiştir. Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata* *WT ve non-WT tip ayrımı *C. glabrata* için ECOFF değerlerine göre belirlenmiştir. *C. glabrata* dışındaki türler klinik sınır değerine göre duyarlı, dirençli ve artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Satırlarda izolat sayısı verilmiştir.

İzolatların tümü değerlendirildiğinde YBÜ kaynaklı izolatlarda diğer servislerden gelen izolatlara göre itrakonazol direncinin daha fazla olduğu istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık içermemektedir ($p=0,054$) (Tablo 6.7).

Tablo 6.7. Hastane bölümlerine göre itrakonazol duyarlılık sonuçları

Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam [n (%)]	p
	R [n (%)]	S, I [n (%)]		
YBÜ	21 (80,8)	48 (57,9)	69 (60)	0,054
Diğer servisler	5 (19,2)	32 (42,1)	37 (50)	
Toplam	26 (100)	80 (100)	106 (100)	

%; Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli, I: Artmış temasta duyarlı, WT: Sokak tipi (Wild type), Non-WT: Sokak tipi olmayan (non-wild type)

6.2.1.4. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Saptanan Çapraz Azol Direnci

Azollere çapraz direnç varlığı açısından incelendiğinde; test edilen tüm azollere direnç gösteren (FVI) 17 izolat ve sadece flukonazol ve vorikonazole dirençli (FV) 19 izolatın tamamı *C. parapsilosis*'tir. Sadece flukonazol ve itrakonazole dirençli (FI) saptanan dört izolatın ikisi *C. parapsilosis* ikisi *C. albicans*'tır. Sadece vorikonazol ve itrakonazole dirençli (VI) tek bir *C. parapsilosis* izolatı saptanmıştır. Çalışılan izolatların 41 tanesinde (%30,6) azollere çapraz direnç mevcut olduğu saptanmıştır. Birden fazla azole direnç gösteren izolatların 39'u (%95,1)

C. parapsilosis türüne aittir. Çalışmada değerlendirilen 57 *C. parapsilosis* izolatının %68,4'ü birden fazla azol türüne dirençlidir. *C. albicans* ise çoklu azol direncine sahip izolatların %4,9'unu (n=2) oluşturmaktadır ve değerlendirilen 49 *C. albicans* izolatının %4'ünde saptanmıştır. Çapraz direnç gözlenen *Candida* türleri ve MİK değerleri Tablo 6.8'de gösterilmiştir.

Tablo 6.8. Birden fazla azole direnç saptanan izolatların azol MİK değerleri

İzolat Numarası	<i>Candida</i> Türü	Çoklu İlaç Direnci Durumu*	Flukonazol MİK (µg/ml)	Vorikonazol MİK (µg/ml)	İtrakonazol MİK (µg/ml)
9	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	32	2	0,25
16	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	1	0,25
20	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	32	1	0,25
22	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
29	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	0,5	0,5
32	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	1	0,25
33	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	1	0,25
45	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	1	0,25
62	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
65	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	32	0,5	0,25
66	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	4	0,25
76	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
87	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	0,5	0,5
89	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
119	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
134	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	8	0,5	0,25
141	<i>C. parapsilosis</i>	FVI	16	2	0,25
7	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	0,5	0,125
8	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	2	0,125
11	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	2	0,006
12	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	2	0,125
18	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	1	0,125
24	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	0,003
40	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	1	0,125
42	<i>C. parapsilosis</i>	FV	32	2	0,125
46	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	0,006
55	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	1	0,125
56	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	2	0,125
58	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	≤0,015
67	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	2	0,125
68	<i>C. parapsilosis</i>	FV	16	2	0,125
69	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	0,125
104	<i>C. parapsilosis</i>	FV	32	2	0,125
108	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	0,125
113	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	0,5	0,125
128	<i>C. parapsilosis</i>	FV	8	1	0,125
2	<i>C. parapsilosis</i>	FI	32	0,25	0,25
4	<i>C. albicans</i>	FI	8	0,25	0,5
43	<i>C. albicans</i>	FI	8	0,25	0,5
116	<i>C. parapsilosis</i>	FI	8	0,125	0,25
30	<i>C. parapsilosis</i>	VI	4 (I)**	0,5	0,5

* FVI: Flukonazol, vorikonazol ve itrakonazol direnci gözlenen izolatlar

* FV: Sadece flukonazol ve vorikonazol direnci gözlenen izolatlar

* FI: Sadece flukonazol ve itrakonazol direnci gözlenen izolatlar

* VI: Sadece vorikonazol ve itrakonazol direnci gözlenen izolatlar

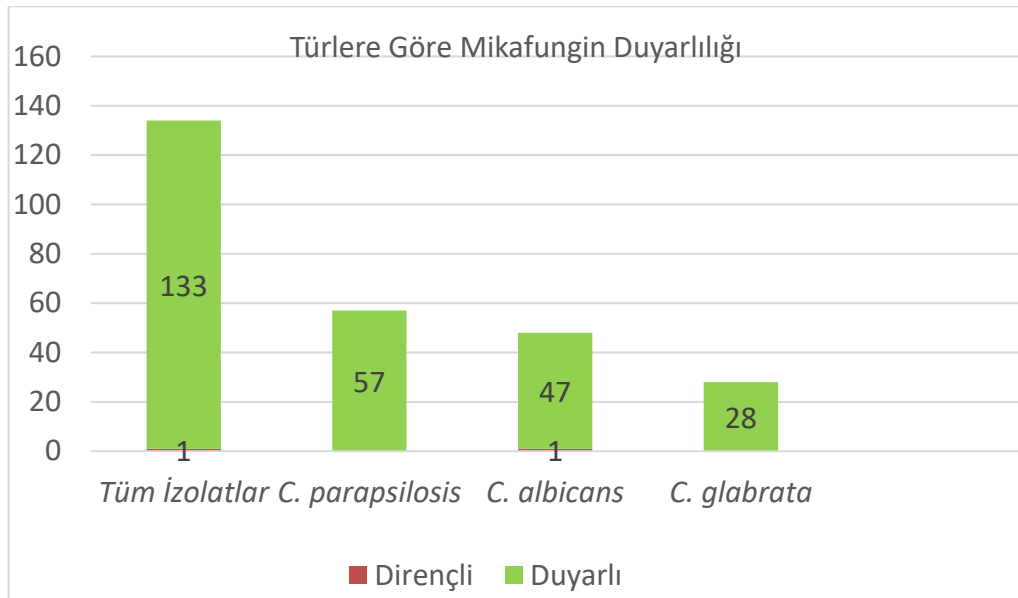
**I: Artmış temasta duyarlı

6.2.1.5. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Kaspofungin Sonuçları

Kaspofungin sıvı mikrodilüsyon çalışma aralığı 0,015-8 µg/ml'dir. Kaspofungin için EUCAST tarafından klinik sınır değer veya ECOFF değeri belirlenmediğinden izolatların klinik duyarlılık kategorisi veya WT olup olmadığı saptanamamıştır. Kaspofungine karşı izolatların en düşük MİK değeri ≤0,015 µg/ml, en yüksek MİK değeri ise 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Genel olarak *C. parapsilosis* için ortalama MİK değeri diğer türlere göre daha yüksek saptanmıştır (*C. parapsilosis* için 0,99 µg/ml, *C. albicans* için 0,03 µg/ml ve *C. glabrata* için 0,1 µg/ml). MİK50 ve MİK90 değerleri sırasıyla; izolatların tümü için 0,125 µg/ml ve 1 µg/ml, *C. parapsilosis* için 1 µg/ml ve 2 µg/ml, *C. albicans* için 0,03 µg/ml ve 0,06 µg/ml, *C. glabrata* için 0,06 µg/ml ve 0,125 µg/ml şeklinde belirlenmiştir.

6.2.1.6. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Mikafungin Sonuçları

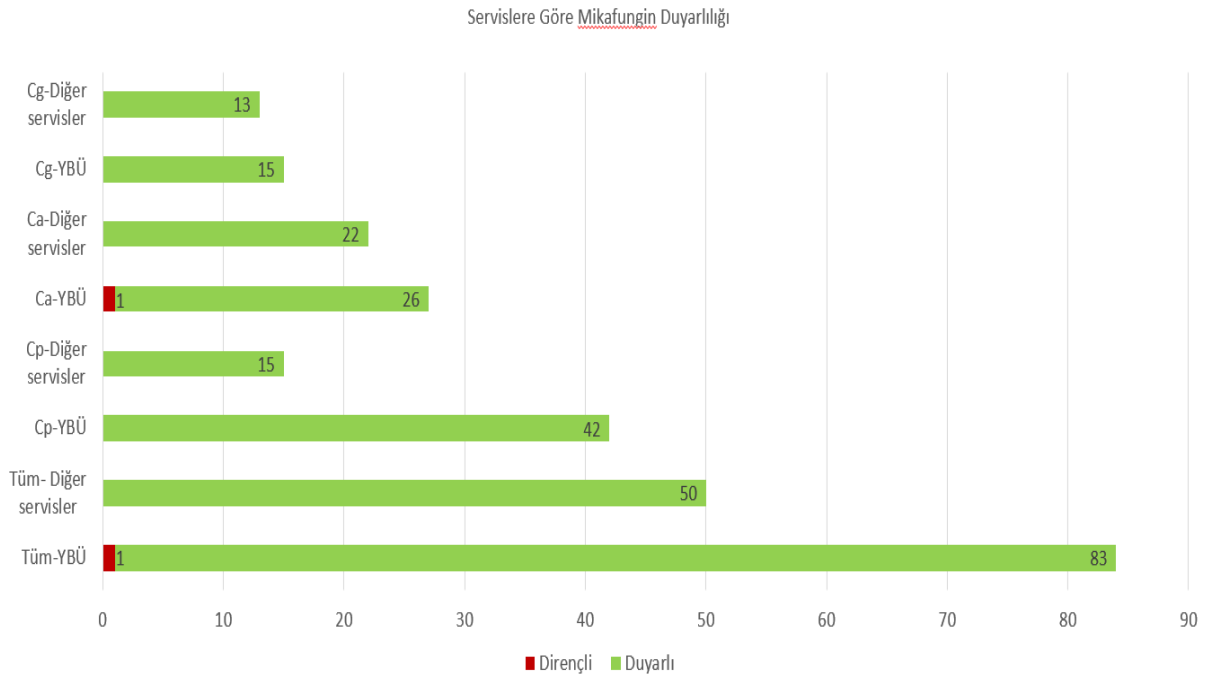
134 *Candida* KAE izolatının mikafungine duyarlılığı EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 0,015-8 µg/ml aralığında çalışılmıştır. 13 *C. albicans* izolatının MİK değeri 0,03 µg/ml olarak belirlenmiş olup EUCAST'a göre bu izolatlar teknik belirsizlik alanında (ATU, *Area of technical uncertainty*) yer almaktadır. Bu izolatların tamamı, rehberde yer alan "mikafungin MİK değeri 0,03 µg/ml olan ve anidulafungine duyarlı izolatlar ekinokandinlere direnç kazandıran bir *fkS* mutasyonu taşımadığından dolayı duyarlı olarak raporlanmalıdır" açıklaması uyarınca duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Mikafungin için klinik sınır değere göre değerlendirildiğinde izolatların biri (%0,7) dirençli, 133'ü (%99,3) duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.3). Dirençli olan izolat *C. albicans* türüne aittir (92 numaralı izolat). Bu izolat YBÜ'nde yatan bir hastadan izole edilen MİK değeri 0,06 µg/ml olarak saptanan, anidulafungine duyarlı bir *C. albicans* izolatıdır (Şekil 6.9).



Şekil 6.9. Türlere göre mikafungin duyarlılık sonuçları

İzolatlar, klinik sınır değerine göre duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Sütunlarda izolatların sayısı verilmiştir.

Mikafungin direnci YBÜ kaynaklı izolatların birinde (%1,2) görülürken, diğer servislerden kaynaklanan izolatlarda dirençli izolat saptanmamıştır. YBÜ kaynaklı izolatlarda gözlenen bu mikafungin direnç yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,439$) (Şekil 6.10, Tablo 6.9).



Şekil 6.10. Türlere göre yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların mikafungin duyarlılık sonuçları

Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata* *İzolatlar klinik sınır değerine göre duyarlı, dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Satırlarda izolat sayısı verilmiştir.

Tablo 6.9. Hastane bölümlerine göre mikafungin duyarlılık sonuçları

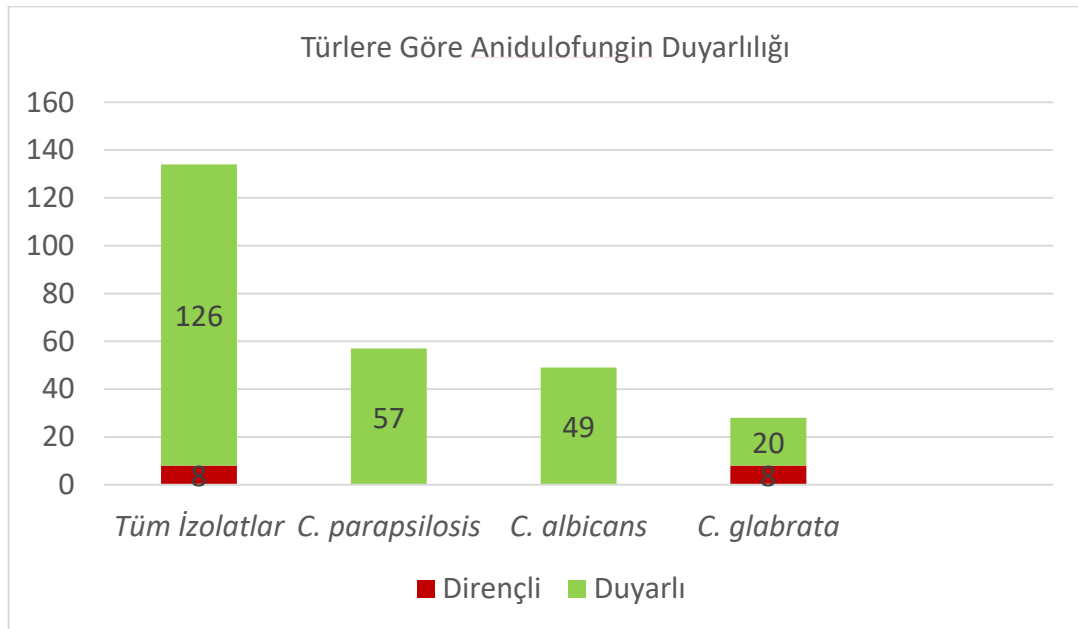
Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam [n (%)]	p
	R [n (%)]	S [n (%)]		
YBÜ	1 (100)	83 (62,4)	84 (62,7)	0,439
Diğer servisler	0 (0)	50 (37,6)	50 (37,3)	
Toplam	1 (100)	133 (100)	134 (100)	

%; Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli

6.2.1.7. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Anidulafungin Sonuçları

Test edilen diğer ekinokandin sınıfı ilaç olan anidulafungin sıvı mikrodilüsyon ile değerlendirildiğinde izolatların sekizinin (%6) dirençli ve dirençli izolatların tamamının *C. glabrata* olduğu saptanmıştır (Tablo 6.5). Anidulafungine dirençli *C. glabrata* izolatlarının tamamının mikafungine duyarlı olduğu belirlenmiştir.

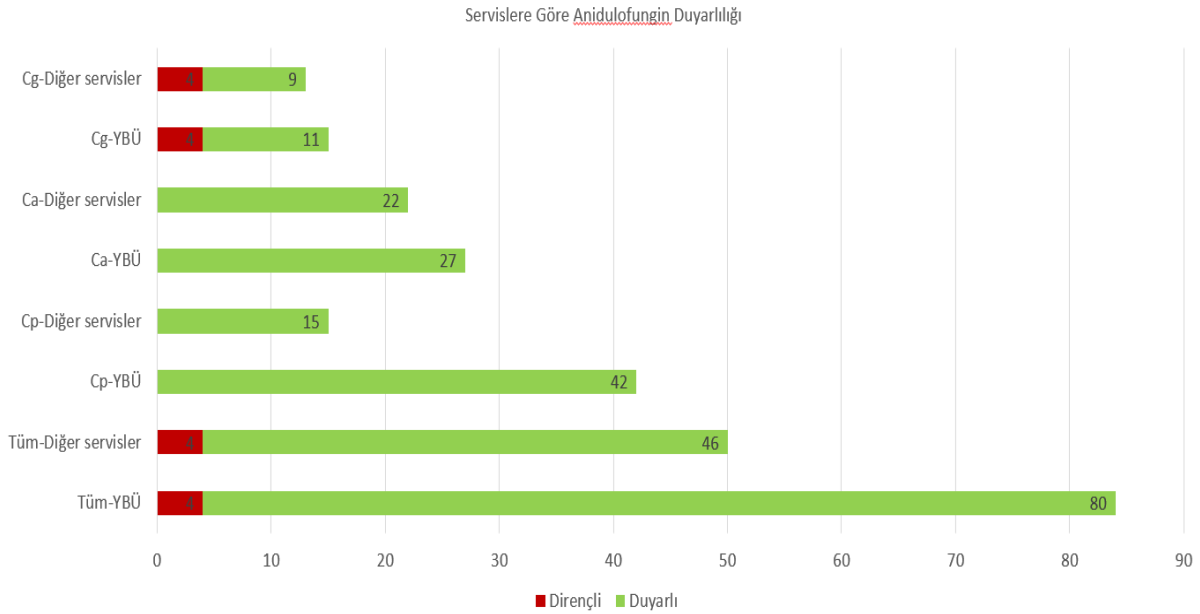
YBÜ kaynaklı 15 *C. glabrata*'nın dördü (%26,7) anidulafungine dirençli; diğer servislerden kaynaklanan 13 *C. glabrata* izolatının da dördü (%30,8) dirençli olduğu saptanmıştır. Türle göre anidulafungin duyarlılığı Şekil 6.11'de verilmiştir.



Şekil 6.11. Türle göre anidulafungin duyarlılık sonuçları

YBÜ kaynaklı izolatların dördünde (4,8) anidulafungin direnci gözlenirken diğer servislerden kaynaklanan izolatlarda da bu sayı dörttür (%8). Diğer servislerden kaynaklanan

izolatlardaki bu anidulafungin direnç oranının yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermemektedir ($p=0,444$) (Şekil 6.12, Tablo 6.10).



Şekil 6.12. Türler gere yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların anidulafungin duyarlılık sonuçları

Tüm: Çalışmadaki tüm *Candida* izolatları, Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata*, Satırlarda izolat sayıları gösterilmiştir.

Tablo 6.10. Hastane bölümlerine göre anidulafungin duyarlılık sonuçları

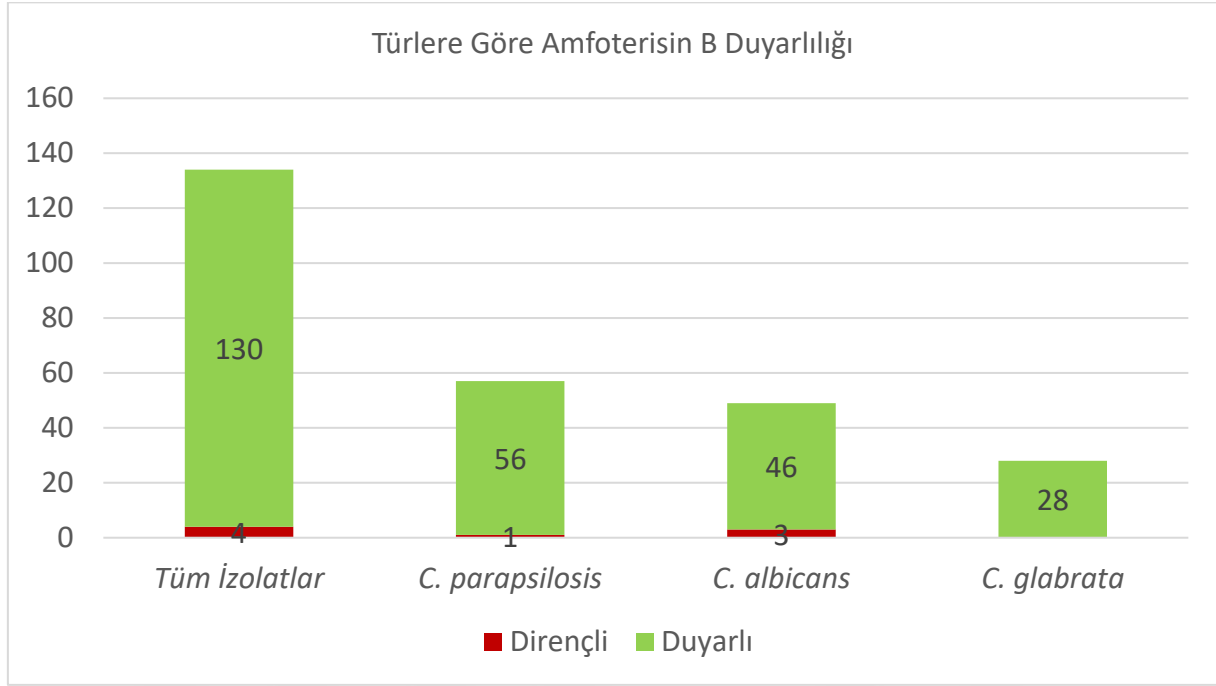
Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam [n (%)]	p
	R [n (%)]	S [n (%)]		
YBÜ	4 (50)	80 (63,5)	84 (62,7)	0,444
Diğer servisler	4 (50)	46 (33,5)	50 (37,3)	
Toplam	8 (100)	126 (100)	134 (100)	

%: Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli

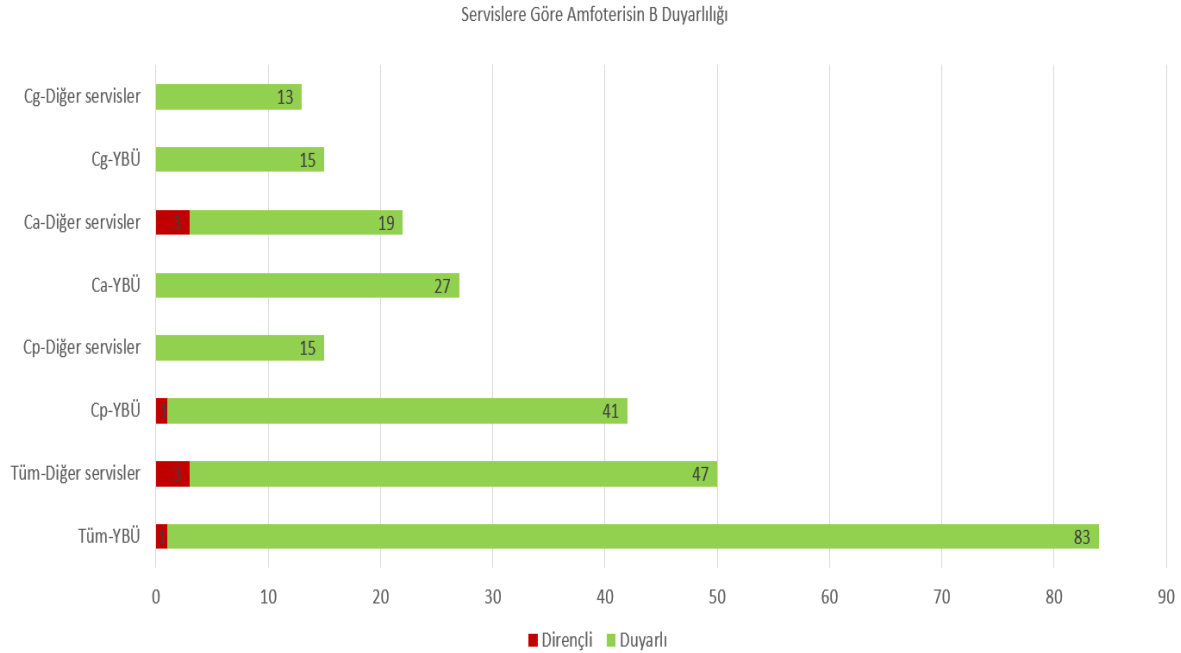
6.2.1.8. EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine Göre Amfoterisin B Sonuçları

Amfoterisin B sıvı mikrodilüsyon sonuçları değerlendirildiğinde izolatların dördü (%2,9) dirençlidir ve bu dirençli izolatların üçü (%75) *C. albicans*, biri (%25) ise *C. parapsilosis* türüne aittir. *C. parapsilosis* izolatlarının biri (%2,8), *C. albicans*'ın ise üçü (%6,1) dirençli; *C. glabrata* izolatlarının ise tamamı duyarlı olarak saptanmıştır (Şekil 6.13). Genel olarak amfoterisine karşı direnç düşük düzeyde gözlenmiş olup YBÜ kaynaklı izolatlardan sadece bir tanesinde (*C. parapsilosis*) direnç gözlenirken, diğer üç dirençli izolat (*C. albicans*) diğer

servislerden kaynaklanmaktadır. Amfoterisin B direnci YBÜ kaynaklı izolatların %1,2'sinde, diğer servislerden kaynaklanan izolatların ise %6'sında görülmektedir. Türlerine göre amfoterisin B duyarlılığı Şekil 6.13'te, servislere göre amfoterisin B duyarlılığı ise Şekil 6.14'te verilmiştir. Diğer servislerdeki amfoterisin B direncinin yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermemektedir ($p=0,114$) (Tablo 6.11).



Şekil 6.13. Türlerine göre amfoterisin B duyarlılık sonuçları



Şekil 6.14. Türlerine göre yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde izolatların amfoterisin B duyarlılık sonuçları

Tüm: Çalışmadaki tüm *Candida* izolatları, Cp: *C. parapsilosis*, Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata*. Satırlarda izolat sayıları gösterilmiştir.

Tablo 6.11. Hastane bölümlerine göre amfoterisin B duyarlılık sonuçları

Hastane Bölümü	Direnç Durumu		Toplam [n (%)]	p
	R [n (%)]	S[n (%)]		
YBÜ	1 (25)	83 (63,8)	84 (62,7)	0,114
Diğer servisler	3 (75)	47 (36,2)	50 (37,3)	
Toplam	4 (100)	130 (100)	134 (100)	

%: Direnç durumu içindeki yüzdesini ifade etmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli

6.2.2. VITEK 2 Antifungal Duyarlılık Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı kullanılarak 134 izolata flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin, amfoterisin B ve flusitozin için AFDT uygulanmıştır. VITEK 2 AFDT sonuçları Tablo 6.12’de ve VITEK 2 ile EUCAST referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki karşılaştırma ise Tablo 6.13’te verilmiştir.

Tablo 6.12. İzolatların VITEK 2 yönteminin EUCAST klinik sınır değerlere göre MİK sonuçları

Antifungal İlaç		Flukonazol [n (%)]	Vorikonazol [n (%)]	Mikafungin [n (%)]	Flusitozin [n (%)]	Amfoterisin B [n (%)]
İzolatlar	Sayı	134	106	60	134	134
	R	32 (23,9)	34 (32,1)	4 (6,7)	1 (0,7)	14 (10,4)
	I	38 (28,4)	4 (3,8)	-	-	-
	S	64 (47,7)	68 (64,2)	56 (93,3)	133 (99,3)	120 (89,6)
<i>C. parapsilosis</i> (n=57)	Sayı	57	57	57	57	57
	R	28 (49,1)	32 (56,2)	1 (1,8)	-	6 (10,5)
	I	12 (21,1)	4 (7)	-	-	-
	S	17 (29,8)	21 (36,8)	56 (98,2)	57 (100)	51 (89,5)
<i>C. albicans</i> (n=49)	Sayı	49	49	3	49	49
	R	1 (2)	2 (4,1)	3 (100)	1 (2)	7 (14,3)
	I	1 (2)	-	-	-	-
	S	47 (96)	47 (95,9)	-	48 (98)	42 (85,7)
<i>C. glabrata</i> (n=28)	Sayı	28	-	-	28	28
	R	3 (10,7)	-	-	-	1 (3,6)
	I	25 (89,3)	-	-	-	-
	S	-	-	-	28 (100)	27 (96,4)

Tablo 6.13. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 yöntemlerinin karşılaştırması

Candida Türü	Antifungal ilaç	Test Metodu	MİK Aralığı $\mu\text{g/ml}$	Duyarlılık [n (%)]*			% EU	% KU	Hata % (n)		
				S	I	R			ÇBH	BH	kH
Tüm izolatlar n=140	Flukonazol	EUCAST	0,125-64	62 (46,3)	27 (20,1)	45 (33,6)					
		VITEK 2	0,5-64	64 (47,7)	38 (28,4)	32 (23,9)	88,5	91,8	4,35 (2)	0	6,7 (9)
	Vorikonazol	EUCAST	0,015-8	64 (60,4)	5 (4,7)	37 (34,9)					
		VITEK 2	0,125-8	68 (64,2)	4 (3,8)	34 (32,1)	75	92,5	7,89 (3)	2,1 (2)	3,7 (5)
	Mikafungin	EUCAST	0,015-8	133 (99,3)	0	1 (0,7)					
		VITEK 2	0,06-8	56 (93,3)	0	4 (6,7)	83,3	95	0	4,6 (3)	0
	Amfoterisin B	EUCAST	0,03-16	130 (97,1)	0	4 (2,9)					
		VITEK 2	0,25-16	120 (89,6)	0	14 (10,4)	91,7	92,5	0	7,7 (10)	0
<i>C. parapsilosis</i> n=57	Flukonazol	EUCAST	0,125-64	16 (28,1)	2 (3,5)	39 (68,4)					
		VITEK 2	0,5-64	17 (29,8)	12 (21,1)	28 (49,1)	84,4	84,2	2,5 (1)	0	14 (8)
	Vorikonazol	EUCAST	0,015-8	17 (29,8)	3 (5,3)	37 (64,9)					
		VITEK 2	0,125-8	21 (36,8)	4 (7)	32 (56,2)	73,7	89,4	8,1 (3)	0	5,2 (3)
	Mikafungin	EUCAST	0,015-8	57 (100)	0	0					
		VITEK 2	0,06-8	56 (98,2)	0	1 (1,8)	92,6	95	0	5 (1)	0
	Amfoterisin B	EUCAST	0,03-16	56 (97,2)	0	1 (2,8)					
		VITEK 2	0,25-16	51 (89,5)	0	6 (10,5)	91,1	91,2	0	8,9 (5)	0
<i>C. albicans</i> n=49	Flukonazol	EUCAST	0,125-64	46 (93,9)	0	3 (6,1)					
		VITEK 2	0,5-64	47 (96)	1 (2)	1 (2)	97,9	95,9	33,3 (1)	0	2 (1)
	Vorikonazol	EUCAST	0,015-8	47 (95,9)	2 (4,1)	0					
		VITEK 2	0,125-8	47 (95,9)	0	2 (4,1)	-	91,8	0	4,2 (2)	4 (2)
	Mikafungin	EUCAST	0,015-8	48 (98)	-	1 (2)					
		VITEK 2	0,06-8	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amfoterisin B	EUCAST	0,03-16	46 (93,9)	0	3 (6,1)					
		VITEK 2	0,25-16	42 (85,7)	0	7 (14,3)	90,8	91,8	0	8,7 (3)	0
<i>C. glabrata</i> n=28	Flukonazol	EUCAST	0,125-64	0	25 (89,3)	3 (10,7)					
		VITEK 2	0,5-64	0	25 (89,3)	3 (10,7)	96,4	100	0	0	0
	Vorikonazol	EUCAST **	0,015-8	27 (96,4) (WT)	0	1 (3,6) (non-WT)		100			
		VITEK 2**	0,125-8	27 (96,4) (WT)	0	1 (3,6) (non-WT)	100	100	0	0	0
	Mikafungin	EUCAST	0,015-8	28 (100)	-	0					
		VITEK 2	0,06-8	-	-	-	-	-	-	-	-
	Amfoterisin B	EUCAST	0,03-16	28 (100)	-	0					
		VITEK 2	0,25-16	27 (96,4)	-	1 (3,6)	95,4	96,4	0	3,6 (1)	0

*EUCAST klinik sınır değerlerine göre, S: Duyarlı, I: Artmış temasta duyarlı, R: Dirençli olarak değerlendirilmiştir.

** *C. glabrata* izolatlarında vorikonazol için ECOFF değeri dikkate alınarak WT, non-WT olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatlar tüm izolatların duyarlılık kategorilemesinde dikkate alınmamıştır.

EU: Esansiyel Uyum, KU: Kategorik uyum, ÇBH: Çok büyük hata, BH: Büyük Hata, kH: Küçük hata

6.2.2.1. VITEK 2 Flukonazol Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı, flukonazol için 0,5-64 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralıklarında sonuç vermektedir. 134 izolatın flukonazol için sonuçları değerlendirildiğinde 32'si (%23,9) dirençli, 38'i (%28,4) artmış temasta duyarlı ve 64'ü (%47,7) duyarlı olarak saptanmıştır. Dirençli olarak saptanan 32 izolatın tamamı EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile de dirençli saptanmıştır. 57 *C. parapsilosis*'in VITEK 2 ile flukonazol duyarlılık sonuçları incelendiğinde; izolatların 28'i (%49,1) dirençli, 12'si (%21,1) artmış temasta duyarlı, 17'si (%29,8) duyarlı olarak saptanmıştır. 49 *C. albicans* izolatının biri (%2) dirençli, biri (%2) artmış temasta duyarlı ve 47'si (%96) duyarlı olarak sonuçlanmıştır. 28 *C. glabrata* izolatının

üçü (%10,7) dirençli, 25'i (%89,3) artmış temasta duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.12, Tablo 6.13).

Genel olarak değerlendirildiğinde izolatların 23'ünde (%17,2) her iki yöntemle de aynı MİK sonucu elde edilirken, 45'inde (%33,6) EUCAST yöntemi ile yüksek, 14'ünde (%10,4) VITEK 2 yöntemi ile en az bir dilüsyon daha yüksek MİK değeri elde edilmiştir. İzolatların 52'sinde (%38,8) ise VITEK 2 yöntemi ile belirlenen MİK değeri $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ şeklinde olup bu izolatların EUCAST yöntemi ile de MİK sonucu $\leq 0,125-0,5$ $\mu\text{g/ml}$ arasında sonuçlanmıştır, ancak bu izolatlar EU değerlendirilirken dikkate alınmamıştır. Ayrıca EUCAST yöntemi ile MİK sonucu 1 $\mu\text{g/ml}$ olup VITEK ile $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ şeklinde belirlenen dört izolat da EU için değerlendirilmemiştir. Değerlendirmeye alınan kalan 78 izolatın flukonazol için referans yöntemle esansiyel uyumu %88,5 olarak belirlenmiştir. Dokuz izolatta esansiyel uyum izlenmemiştir ve bu izolatların MİK değeri sekizinde EUCAST ile, birinde VITEK 2 ile daha yüksek saptanmıştır. Esansiyel uyum izlenmeyen dokuz izolatın dördünde kategorik uyumun da olmadığı (iki ÇBH, iki kH), beşinde ise izolatların duyarlılık kategorisini etkilemediği gözlenmiştir (Tablo 6.13).

İki tane ÇBH tespit edilmiş ve ÇBH oranı %4,35 olarak hesaplanmıştır (2/46) (Tablo 6.13). %95 güven aralığına göre ÇBH oranı %0-%10,29 arasında değişmektedir. Bu oran FDA tarafından belirtilen kriterlere (ÇBH oranının %95 güven aralığında üst sınırın %7,5'in altında olması) uymamaktadır. Tüm izolatlarda KU %91,8'dir. 11 izolatta kategorik uyumsuzluk görülmüş olup dördünde EU'un da uyumsuzluğu saptanmıştır. KU'nın saptanmadığı izolatların tamamında EUCAST MİK değeri VITEK 2 yöntemine göre yüksek olarak bulunmuştur. KU'nun olmadığı saptanan 11 izolatın referans yöntemine göre ikisinde ÇBH dokuzunda ise kH olduğu bulunmuştur (Tablo 6.13, Tablo 6.14).

VITEK 2 ile duyarlı olarak sonuçlanan 64 izolatın EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile iki tanesi dirençli olarak sonuçlanmıştır. Bu iki izolattan biri *C. albicans* (4 numaralı izolat) diğeri ise *C. parapsilosis*'tir (11 numaralı izolat). 4 ve 11 numaralı izolatların her ikisinin de flukonazol için AFDT sonuçları VITEK 2 ile 2 $\mu\text{g/ml}$, EUCAST ile 8 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde sonuçlanmış ve ÇBH olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmamızda flukonazol için ÇBH oranı %4,35 (n=2) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda BH saptanmamış olup oranı tüm izolatlar için %0'dır. kH ise %6,7 (n=9) olarak saptanmıştır. kH saptanan izolatların sekizi *C. parapsilosis* iken bir tanesi *C. albicans*'tir. kH saptanan izolatlardan iki *C. parapsilosis*'te EUCAST MİK değeri 16 $\mu\text{g/ml}$ iken diğer kH saptanan izolatlarda 8 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde dirençli saptanmıştır. kH

olan izolatların tamamının VITEK 2 ile MİK sonucu 4 µg/ml olup artmış temasta duyarlı olarak belirlenmiştir (Tablo 6.14).

Tablo 6.14. Flukonazol duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar

İzolat Numarası	<i>Candida</i> Türü	EUCAST MİK µg/ml	EUCAST Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 MİK µg/ml
4	<i>C. albicans</i>	8	R	S	2
7	<i>C. parapsilosis</i>	16	R	I	4
10	<i>C. glabrata</i>	2	I	I	8
11	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	S	2
12	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4
14	<i>C. parapsilosis</i>	4	S	S	≤0,5
24	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4
33	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4
42	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	R	8
43	<i>C. albicans</i>	8	R	I	4
47	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	S	≤0,5
55	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4
69	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4
81	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	S	≤0,5
119	<i>C. parapsilosis</i>	16	R	I	4
128	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	I	4

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Artmış temasta duyarlı

C. parapsilosis izolatlarının 34'ünde (%59,6) EUCAST MİK değeri VITEK 2 yöntemine göre daha yüksekken, 12'sinde (%21) her iki yöntemle eşit MİK'ler saptanmış, üçünde (%5,3) ise VITEK 2 ile yüksek MİK sonucu elde edilmiştir. Sekiz izolatın ise VITEK 2 yöntemi ile belirlenen MİK değeri ≤0,5 µg/ml şeklinde olup bu izolatların EUCAST yöntemi ile de MİK sonucu ≤0,125 - 0,5 µg/ml arasında sonuçlanarak EU için değerlendirilmemiştir. VITEK 2 ile MİK değeri ≤0,5 µg/ml olan dört izolatın ise EUCAST MİK sonucu 1 µg/ml'dir ve bu izolatlar da EU için değerlendirilmemiştir. 45 *C. parapsilosis* izolatı için EU %84,4'tür. EU'un olmadığı belirlenen yedi izolatın tamamında EUCAST MİK değeri daha yüksek olarak bulunmuş ve bu izolatların üçünün kategorik uyumsuzluğu da mevcuttur (birisinde ÇBH, ikisinde kH). *C. parapsilosis* için VITEK 2'nin EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile KU değeri ise %84,2 olarak saptanmıştır. KU olmayan dokuz izolatın birisinde ÇBH, sekizinde kH belirlenmiştir ve izolatların tamamında EUCAST ile daha yüksek MİK'ler elde edilmiştir. Kategorik uyumsuzluk saptanan dokuz izolatın üçünde EU yokken, altısında EU olmakla birlikte bu tek bir dilüsyon farkı izolatın duyarlılık kategorisini değiştirmiştir. VITEK 2 ile duyarlı olarak saptanan bir izolat EUCAST yöntemi ile dirençli olarak (ÇBH) sınıflandırılmıştır (11 numaralı izolat). *C. parapsilosis* için ÇBH oranı %2,5 (1/41) (%95 güven aralığı %0,06-%12,86) olarak

belirlenmiştir kH oranı %14 (n=8) olarak tespit edilmiştir. kH saptanan bu sekiz izolatın tamamının VITEK 2 ile MİK değeri 4 µg/ml olarak saptanmış ve artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Bu sekiz izolatın ikisinin MİK değeri 16 µg/ml iken kalan altı tanesinin MİK'i 8 µg/ml olarak saptanmış ve tamamı EUCAST ile dirençli olarak kategorilendirilmiştir (kH). Bu hali ile kH saptanan izolatların EUCAST MİK'i, VITEK 2 MİK değerinden yüksek olarak bulunmuştur. *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol için BH ise saptanmamıştır (%0) (Tablo 6.13 ve Tablo 6.14).

49 *C. albicans* izolatının 44'ünde VITEK 2 yöntemi ile belirlenen MİK değeri $\leq 0,5$ µg/ml şeklinde olup bu izolatların EUCAST yöntemi ile de MİK sonucu $\leq 0,125-0,25$ µg/ml arasında sonuçlanarak EA için değerlendirilmemiştir. Üç izolatta EUCAST yöntemi ile, iki izolatta ise VITEK 2 ile daha yüksek MİK elde edilmiştir. Bu sonuçlar EUCAST sıvı mikrodilüsyon sonuçları karşılaştırıldığında beş *C. albicans* için EU % 97,9 olarak belirlenmiştir. Tüm *C. albicans* izolatının ise (n=49) KU'u %95,9'dur. Kategorik olarak uyumsuz olan iki izolat bulunmuştur. ÇBH sadece bir izolatta (4 numaralı izolat) saptanmış olup oran %33,3 olarak belirlenmiştir ve MİK değeri VITEK 2 ile 2 µg/ml, EUCAST ile 8 µg/ml olarak bulunmakla birlikte bu izolatın esansiyel uyumsuzluğu da mevcuttur. Bu yüksek orana rağmen dirençli izolat sayısı FDA tarafından belirlenen 30'u bulmadığından sonuçlar yanıltıcı olabilir. kH ise %2'dir (n=1, 43 numaralı izolat). BH saptanmamıştır (Tablo 6.13).

28 *C. glabrata* izolatının 11'inde EUCAST ile eşit MİK sonucu elde edilirken, dokuzunda VITEK 2 ile, sekizinde ise EUCAST ile yüksek sonuç elde edilmiştir. EUCAST ile kıyaslandığında VITEK 2'nin *C. glabrata*'da flukonazol için EU değeri %96,4, KU değeri %100, ÇBH, BH ve kH oranı %0 olarak gözlenmiştir. Sadece tek bir izolatta esansiyel uyumsuzluk saptanmış olup bu uyumsuzluk duyarlılık kategorisini etkilememiştir (10 numaralı izolat) (Tablo 6.13).

6.2.2.2. VITEK 2 Vorikonazol Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı, vorikonazol için 0,125-8 µg/ml konsantrasyon aralıklarında sonuç vermektedir. *C. glabrata*'nın EUCAST klinik sınır değeri olmadığından ECOFF değerine göre değerlendirilmiştir. Klinik sınır değere göre değerlendirilen 106 izolatın VITEK 2 yöntemi ile vorikonazole 34'ü dirençli (%32,1), dördü (%3,8) artmış temasta duyarlı ve 68'i

(%64,2) duyarlı olarak belirlenmiştir (Tablo 6.12). *C. parapsilosis* izolatlarının 32'si (%56,2) dirençli, dördü (%7) artmış temasta duyarlı ve 21'i (%36,8) duyarlı olarak saptanmıştır. *C. albicans* izolatlarının VITEK 2 vorikonazol MİK değerleri değerlendirildiğinde ise izolatların ikisi (%4,1) dirençli, 47'si (%95,9) duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.12). VITEK 2 sonuçları vorikonazol için ECOFF dikkate alınarak değerlendirildiğinde EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemine benzer şekilde 28 *C. glabrata* izolatların 27'sinin (%96,4) WT, birinin (%3,6) non-WT olduğu belirlenmiştir (Tablo 6.4 ve Tablo 6.13).

Referans yöntemle klinik sınır değere göre aynı klinik duyarlılık kategorisinde olanlar ve *C. glabrata* için ECOFF'a göre WT olup olmama yönünden aynı özellikte saptananlar kategorik olarak uyumlu sayılmıştır. Buna göre, vorikonazol VITEK 2 sonuçları için referans yöntemle KU %92,5, ÇBH üç izolatta tespit edilmiş olup oranı %7,8, BH iki izolatta saptanmış olup oranı %2,2 ve kH beş izolatta belirlenmiş olup oranı %3,7 şeklinde belirlenmiştir (Tablo 6.13). KU yüzdesi, BH oranı FDA kriterlerine uygun olarak saptanmış ancak ÇBH %7,8 şeklinde (%95 güven aralığı; %1,66-%21,38) olup FDA kriterlerine uygun değildir.

KU'un olmadığı 11 izolat tespit edilmiş olup bu izolatların üçünde ÇBH (7, 33, 119 numaralı izolatlar), ikisinde BH (50 ve 140 numaralı izolatlar) ve altısında ise kH (2, 4, 43, 58 ve 108 numaralı izolatlar) saptanmıştır. VITEK 2 vorikonazol MİK sonucu $\leq 0,125$ µg/ml olan 86 izolat EU değerlendirilirken hariç tutulmuştur. Kalan 48 izolat incelendiğinde EU %75 olarak belirlenmiştir. Esansiyel olarak uyumsuz olan 12 izolat (18, 30, 33, 50, 55, 62, 67, 68, 104, 119, 128 ve 140 numaralı izolatlar) saptanmış olup bu durum izolatların dördünde kategorik uyumsuzlukla sonuçlanmış ve ikisinde BH (50 ve 140 numaralı izolatlar), ikisinde ÇBH (33 ve 119 numaralı izolatlar) sebep olmuştur (Tablo 6.15).

Tablo 6.15. Vorikonazol duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar

İzolat Numarası	<i>Candida</i> Türü	EUCAST MİK $\mu\text{g/ml}$	EUCAST Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 MİK $\mu\text{g/ml}$
2	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	I	S	$\leq 0,125$
4	<i>C. albicans</i>	0,25	I	S	$\leq 0,125$
7	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	R	S	$\leq 0,125$
18	<i>C. parapsilosis</i>	1	R	R	4
30	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	R	R	2
33	<i>C. parapsilosis</i>	1	R	S	$\leq 0,125$
43	<i>C. albicans</i>	0,25	I	S	$\leq 0,125$
50	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,015$	S	R	≥ 8
55	<i>C. parapsilosis</i>	1	R	R	≥ 8
58	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	R	I	0,25
62	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	R	≥ 8
67	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	R	≥ 8
68	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	R	≥ 8
104	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	R	≥ 8
108	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	R	I	0,25
119	<i>C. parapsilosis</i>	2	R	S	$\leq 0,125$
128	<i>C. parapsilosis</i>	1	R	R	≥ 8
140	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,015$	S	R	1

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Artmış temasta duyarlı

Duyarlı olarak saptanan üç *C. parapsilosis* izolatı (7, 33, 119 numaralı izolatlar) EUCAST yöntemi ile dirençli saptandığından ÇBH olarak değerlendirilmiş ve ÇBH oranı %8,1 (%95 güven aralığı %0-%16,9) olarak belirlenmiştir. kH %5,2 (2, 58 ve 108 numaralı izolatlar, n=3) olarak belirlenmiş olup BH saptanmamıştır. KU ise %89,4'tür. VITEK 2 sonucu $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ olup EUCAST sonucu da bu değerin altında saptanan izolatlar (n=19) dahil edilmediğinde 38 izolat değerlendirmeye alındığında EU oranı %73,7 olarak bulunmuştur (Tablo 6.13).

C. albicans izolatlarından dirençli bulunan iki izolatın EUCAST yöntemi ile duyarlı olduğu gözlenmiştir (BH). KU %91,8, BH %4,2, kH %4 olarak belirlenmiştir. Kategorik olarak uyumsuz dört izolat belirlenmiş ve bu izolatların ikisinde BH (50 ve 140 numaralı izolatlar), ikisinde kH (4 ve 43 numaralı izolatlar) saptanmıştır. ÇBH ise saptanmamıştır. EU ise vorikonazol sonuçlarının *C. albicans* izolatlarının yaklaşık %96'sında MİK sonuçlarının VITEK 2 ile $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile $\leq 0,015$ $\mu\text{g/ml}$ şeklinde sonuçlanması nedeniyle hesaplanamamıştır (Tablo 6.13).

C. glabrata için duyarlılık sınır değeri mevcut olmadığından ECOFF değerine göre WT ve non-WT olarak kategorilendirme yapıldığında KU %100, ÇBH %0, BH %0 ve kH %0 olarak saptanmaktadır. EU için ise VITEK 2 vorikonazol sonucu $\leq 0,125$ µg/ml olarak belirlenen 20 izolat hesaplamaya dahil edilmemiştir. Kalan sekiz *C. glabrata* için EU değeri %100 olarak saptanmıştır (Tablo 6.13).

6.2.2.3. VITEK 2 Kaspofungin Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı, kaspofungin için 0,125- 8 µg/ml, konsantrasyon aralıklarında sonuç vermektedir. Kaspofungin için EUCAST tarafından klinik sınır değer veya ECOFF değeri belirlenmediğinden izolatların klinik duyarlılık kategorisi veya WT olup olmadığı belirlenememiştir. Kaspofungine karşı izolatların en düşük MİK değeri $\leq 0,125$ µg/ml, en yüksek MİK değeri ise 4 µg/ml'dir. Genel olarak *C. parapsilosis* için ortalama MİK değeri diğer türlere göre daha yüksek saptanmıştır. (*C. parapsilosis* için 1,08 µg/ml, *C. albicans* için $\leq 0,125$ µg/ml, *C. glabrata* için 0,2 µg/ml ve *C. tropicalis* için 0,12 µg/ml). MİK50 ve MİK90 değerleri sırasıyla tüm izolatlar için 0,25 µg/ml ve 2 µg/ml, *C. parapsilosis* için 1 µg/ml ve 2 µg/ml, *C. albicans* için $\leq 0,125$ µg/ml ve 0,25 µg/ml, *C. glabrata* için $\leq 0,125$ µg/ml ve 0,25 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Sınır değerinin olmaması nedeniyle referans yöntemle KU, ÇBH, BH ve kH açısından bir değerlendirme yapılamamıştır. VITEK sonucu $\leq 0,125$ µg/ml olmayan 73 izolat değerlendirildiğinde EU %90,4 olarak bulunmuştur. Yedi izolatta referans yöntem ile esansiyel uyumsuzluk vardır ve bu izolatların biri hariç (119 numaralı izolat) tamamında VITEK 2 ile daha yüksek MİK'ler elde edilmiştir (Tablo 6.16). *C. parapsilosis*'in üçünde, dört *C. albicans*'ın ikisinde ve 12 *C. glabrata*'nın ikisinde EU saptanmayarak sırasıyla EU oranları %94,7, %50 ve %83,3 şeklinde bulunmuştur.

Tablo 6.16. Kaspofungin duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar

İzolat Numarası	<i>Candida</i> Türü	EUCAST MİK $\mu\text{g/ml}$	VITEK 2 MİK $\mu\text{g/ml}$
6	<i>C. albicans</i>	0,03	0,25
11	<i>C. parapsilosis</i>	1	4
44	<i>C. glabrata</i>	0,06	0,5
84	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,5
109	<i>C. albicans</i>	0,03	0,25
110	<i>C. glabrata</i>	0,06	0,5
119	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,12

6.2.2.4. VITEK 2 Mikafungin Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı, mikafungin için 0,125-8 $\mu\text{g/ml}$, konsantrasyon aralıklarında sonuç vermektedir. Klinik duyarlılık kategorisi *C. parapsilosis* izolatlarının tamamında (n=57), üç *C. albicans* izolatında değerlendirilmiştir. Diğer izolatlarda ise izolatların klinik sınır değeri (*C. albicans* için 0,016 $\mu\text{g/ml}$, *C. glabrata* için 0,03 $\mu\text{g/ml}$) VITEK 2 MİK değerinin ($\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$) altında kaldığı için belirlenememiştir. 60 izolatın dördü (%6,7) dirençli, 56'sı (%93,3) duyarlı saptanmıştır. Dirençli saptanan 4 izolatın %75'i *C. albicans* (n=3) %25'i *C. parapsilosis* (n=1) olmuştur. *C. parapsilosis* izolatlarının %1,8'i dirençli (n=1), %98,2'si duyarlıdır (n=56) (Tablo 6.12).

60 izolat dikkate alındığında KU %95, BH %4,6 olarak belirlenmiştir. Üç izolatta kategorik uyumsuzluk mevcut olup BH olarak sınıflandırılmıştır (6, 11 ve 109 numaralı izolatlar). VME ve miE saptanmamıştır. 60 izolat için EU %83,3 olarak belirlenmiştir. VITEK 2 mikafungin sonucu *C. parapsilosis* için şu şekildedir; KU %95, BH %5'dir. ÇBH ve kH saptanmamıştır. EU ise $\leq 0,06$ olan üç izolat dahil edilmediğinde %92,6 olarak belirlenmiştir (Tablo 6.13). Tablo 6.17'de mikafungin için VITEK 2 yöntemi ile referans yöntem arasındaki uyumsuzluklar verilmiştir.

Tablo 6.17. Mikafungin duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar

İzolat Numarası	<i>Candida</i> türü	EUCAST MİK $\mu\text{g/ml}$	EUCAST Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 MİK $\mu\text{g/ml}$
2	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	S	$\leq 0,06$
6	<i>C. albicans</i>	0,03	S	R	0,25
11	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	R	4
33	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	S	$\leq 0,06$
45	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	S	0,5
54	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	S	0,5
68	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	S	0,5
84	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	S	S	0,5
92	<i>C. albicans</i>	0,06	R	R	≥ 8
109	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,015$	S	R	0,125
119	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	S	$\leq 0,06$

6.2.2.5. VITEK 2 Amfoterisin B Sonuçları ve Referans EUCAST Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Karşılaştırması

VITEK 2 AST-YS08 kartı, amfoterisin B için 0,25-16 $\mu\text{g/ml}$, konsantrasyon aralıklarında sonuç vermektedir. İzolatların 14'ü (%10,4) dirençli, 120'si (%89,6) saptanmıştır. *C. parapsilosis* izolatlarının altısı (%10,5) amfoterisin B'ye dirençli, 51'i (%89,5) duyarlı; *C. albicans* izolatlarının yedisi (%14,3) dirençli, 42'si (%85,7) duyarlı; *C. glabrata*'nın biri (%3,6) dirençli, 27'si (%96,4) duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.12)

Referans yöntemine göre KU %92,5'dir. 10 izolatın kategorik uyumunun olmadığı belirlenmiş ve bunlar BH olarak sınıflandırılmış ve BH oranı %7,7 (10/130) olarak belirlenmiştir. ÇBH ve kH saptanmamıştır. VITEK 2 sonucu $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ olan 25 izolat dahil edilmeyip 109 izolat üzerinden değerlendirme yapıldığında EU %91,7 olmaktadır. *C. parapsilosis* izolatlarının KU oranının %91,2 olduğu belirlenmiştir. Kategorik uyumsuzluk beş izolatta saptanmış ve tamamı BH olarak belirlenmiştir ve oranı %8,9'dur. ÇBH ve kH saptanmamıştır. VITEK 2 ile amfoterisin B sonucu $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanan 16 izolat dahil edilmeden hesaplanan *C. parapsilosis* için EU oranı %91,1'dir. *C. albicans* izolatlarının KU oranının %91,8 olduğu saptanmıştır. ÇBH ve kH görülmemiş olup kategorik uyumsuzluk sadece BH şeklindedir ve oranı %8,7 olarak belirlenmiştir. MİK değeri $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ şeklinde sonuçlanan 7 izolat dahil edilmediğinde EU *C. albicans* için %90,8'dir. *C. glabrata*'nın ise KU'u %96,4, BH'sı %3,6 (n=1) olarak saptanmıştır. ÇBH ve kH görülmemiştir. MİK sonucu

$\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ olarak sonuçlanan altı izolat dahil edilmediğinde EU *C. glabrata* için %95,4 olarak belirlenmiştir (Tablo 6.13). Amfoterisin B için uyumsuzluk saptanan izolatlar a ait veriler Tablo 6.18’de verilmiştir.

Tablo 6.18. Amfoterisin B duyarlılık sonuçlarında VITEK 2 ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyumsuz sonuçlar

İzolat Numarası	<i>Candida</i> Türü	EUCAST MİK $\mu\text{g/ml}$	EUCAST Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 Duyarlılık Kategorisi	VITEK 2 MİK $\mu\text{g/ml}$
3	<i>C. albicans</i>	0,5	S	R	2
11	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	R	4
39	<i>C. glabrata</i>	1	S	R	4
50	<i>C. albicans</i>	1	S	R	2
53	<i>C. albicans</i>	0,5	S	R	2
82	<i>C. albicans</i>	2	R	R	8
87	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	S	$\leq 0,25$
104	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	R	4
108	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	R	2
111	<i>C. albicans</i>	0,5	S	R	2
134	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	R	2
141	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	R	2

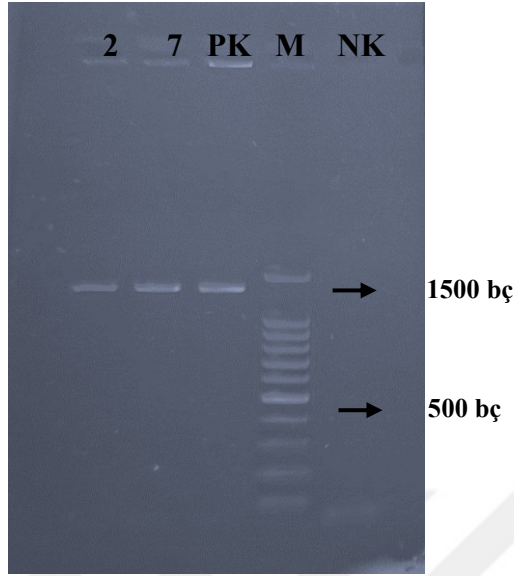
6.2.2.6. VITEK 2 Flusitozin Sonuçları

İzolatların 133’ü (%99,3) flusitozine duyarlı, biri (%0,7) ise dirençli olarak saptanmıştır. Direnç gözlenen tek izolat *C. albicans* türündedir ve MİK sonucu 16 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde sonuçlanmıştır (92 numaralı izolat). Anestezi ve Reanimasyon YBÜ’nde yatan bir hastanın katater kan kültüründen izole edilen bu izolatın flukonazol ve mikafungine de direnci mevcuttur. Duyarlı olarak saptanan izolatların tümünde MİK değeri ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile flusitozin duyarlılığı çalışılmadığı için KU, EU, ÇBH, BH ve KH değerlendirilmemiştir. VITEK 2 yöntemi ile elde edilen flusitozin MİK sonuçları Tablo 6.12’de verilmiştir.

6.3. *mrr1* Gen Bölgesinin PZR Sonuçları

mrr1 genine yönelik üç ayrı primer ile gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir. *mrr1* geni için *mrr1*-F1F ve *mrr1*-F3R

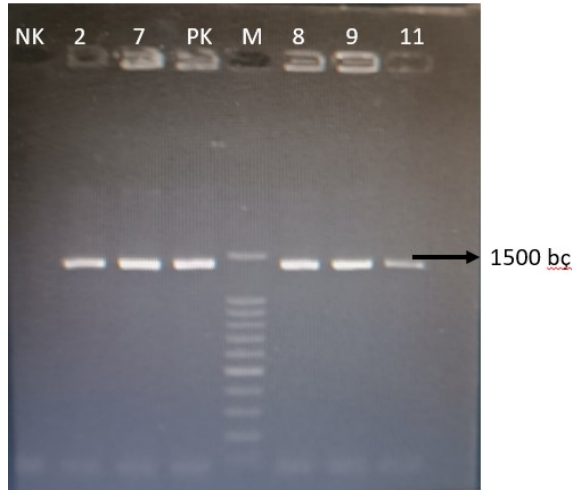
primerleri ile yapılan PZR sonucunda tüm *C. parapsilosis* izolatlarında ~1308 bç büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 6.15).



Şekil 6.15. *mrr1* (*mrr1*-F1F ve *mrr1*-F3R primerleri) agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: Moleküler büyüklük belirteci (GmbH DNA Ladder, 100 bp, Bioron, Germany), NK: Negatif kontrol, 2,7: Hasta izolatları, PK: Pozitif kontrol.

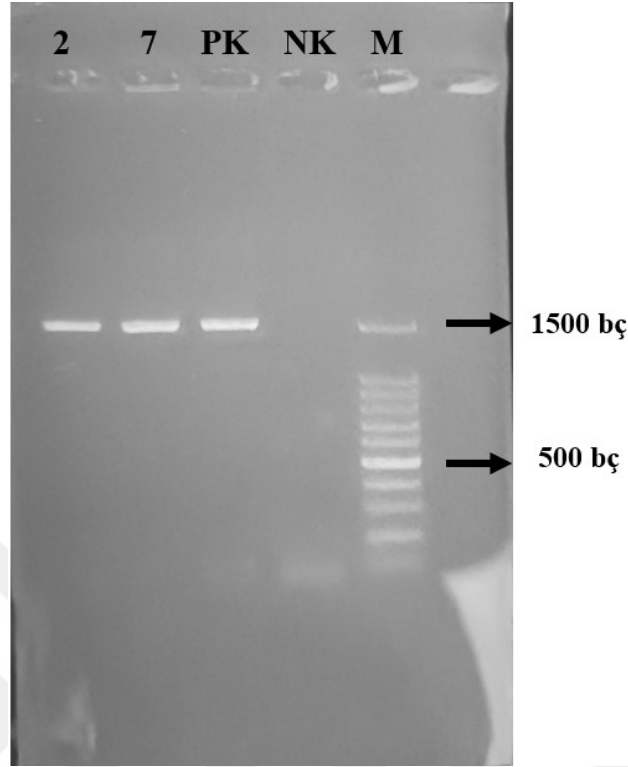
mrr1 geni için *mrr1*-F4F ve *mrr1*-F6R primerleri ile yapılan PZR sonucunda tüm *C. parapsilosis* izolatlarında ~1401 bç büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 6.16).



Şekil 6.16. *mrr1* (*mrr1*-F4F ve *mrr1*-F6R primerleri) agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: Moleküler büyüklük belirteci (GmbH DNA Ladder, 100 bp, Bioron, Germany), NK: Negatif kontrol, 2,7,8, 9,11: Hasta izolatları, PK: Pozitif kontrol, bç: baz çifti.

mrrl geni için *mrrl*-F7F ve *mrrl*-F9R primerleri ile yapılan PZR sonucunda tüm *C. parapsilosis* izolatlarında ~1468 bç büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 6.17).

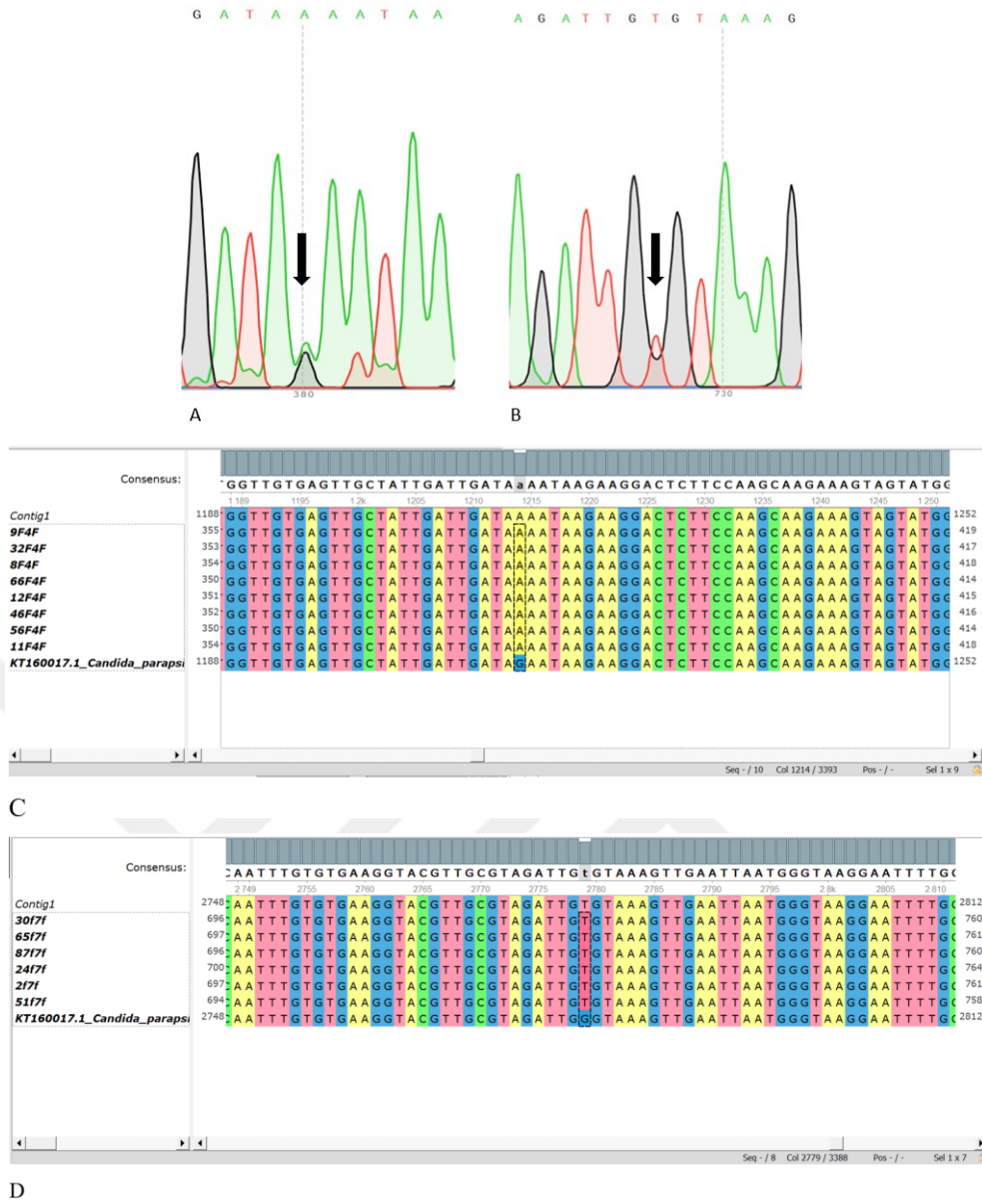


Şekil 6.17. *mrrl* (*mrrl*-F7F ve *mrrl*-F9R primerleri) agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: Moleküler büyüklük belirteci (GmbH DNA Ladder, 100 bp, Bioron, Germany), NK: Negatif kontrol, 2,7: Hasta izolatları, PK: Pozitif kontrol, bç: baz çifti.

6.3.1. *mrrl* Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi Sonuçları

mrrl genindeki mutasyonların araştırılması amacıyla uygulanan üç ayrı PZR amplifikasyonu sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin iki yönlü DNA dizi analizi değerlendirilerek izolatların *mrrl* geni dizisi belirlenmiştir. Azollere dirençli ve artmış temasta duyarlı olduğu belirlenen 41 *C. parapsilosis* izolatının %36,6'sında (n=15) *mrrl* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır. Bu izolatların dokuzunda G1214A (heterozigot), altısında G2779T mutasyonu (homozigot) olduğu belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde bu mutasyonlar birlikte saptanmamıştır (Tablo 6.20, Tablo 6.21). DNA dizi analizi sonucunda elde edilen dizilere ait veriler Genbank sistemine PQ037952 ve PQ037953 numaraları ile yüklenmiştir. Tespit edilen mutasyonlara ait elektroferogram örnekleri Şekil 6.18'de, mutasyon tespit edilen izolatlarda azollere ait MİK değerleri Tablo 6.19'da verilmiştir.



Şekil 6.18. *mrr1* geninde tespit edilen mutasyonlara ait örnek kromatogram görüntüsü

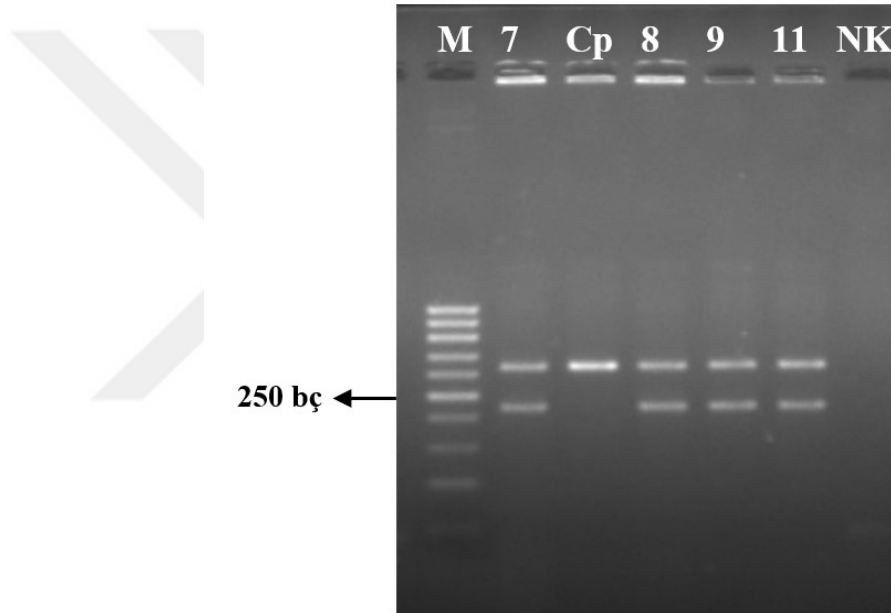
A. 8 numaralı örneğe ait heterozigot G1214A (R405K) mutasyonu B. 30 numaralı örneğe ait homozigot G2779T (G927C) mutasyonu. C. G1214A (R405K) mutasyonu saptanan izolatların nükleotid dizilimi. D. G2779T (G927C) mutasyonu saptanan izolatların nükleotid dizilimi. KT160017.1: Referans BC014 *C. parapsilosis* suşunun *mrr1* dizilimi

6.4. *erg11* Genine Yönelik MAS-PZR Sonuçları

6.4.1. MAS PZR-1 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroza Jel Elektrofrez ile Görüntüleme Sonuçları

erg11 geninde azol direncinden ana sorumlu A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin jel elektrofrez görüntüsü Şekil 6.19'da

verilmiştir. Elektroforez sonucunda A395T mutasyonu olmayan izolatlarda 323 bç uzunluğunda tek bir bant gözlenirken, A395T mutasyonu taşıyan izolatlarda 323 bç ve 231 bç uzunluğunda iki bant görülmüştür (Şekil 6.20). 57 *C. parapsilosis* izolatında araştırılan A395T mutasyonu izolatların 35'inde (%61,4) tespit edilmiştir. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre azollere duyarlı olmayan 41 *C. parapsilosis* izolatının 33'ünde (%80,5) ve azollere duyarlı olarak saptanan 16 *C. parapsilosis* izolatının ikisinde (%12,5) *erg11* geninde A395T mutasyonu MAS PZR-1 yöntemi ile tespit edilmiştir (Tablo 6.20, Tablo 6.21). Mutasyon saptanan 35 *C. parapsilosis* izolatının flukonazole 33'ü (%94,3) dirençli, ikisi (%5,7) duyarlı; vorikonazole 32'si (91,4) dirençli, biri (%2,9) artmış temasta duyarlı, ikisi (%5,7) duyarlı; itrakonazole 14'ü (%40) dirençli, 21'i (%60) duyarlı bulunmuştur.



Şekil 6.19. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-1 sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

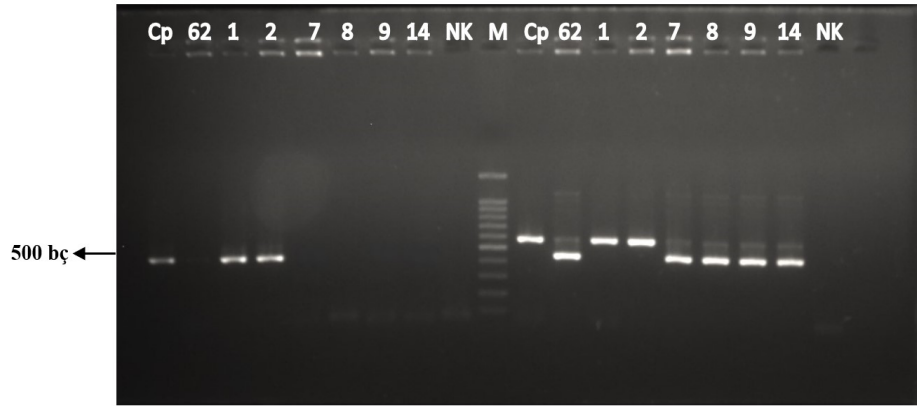
M: Moleküler büyüklük belirteci (Gene Ruler DNA Ladder, 50-500 bp, Thermo, Germany), NK: Negatif kontrol, 7, 8, 9, 11: Hasta izolatları, Cp: *C. parapsilosis* ATCC 22019, bç: baz çifti.

6.4.2. MAS PZR-2 Sonrası Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntüleme Sonuçları

erg11 geninde azol direncinden ana sorumlu A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü Şekil 6.20'de verilmiştir. Mutasyonu taşımayan izolatlarda, *erg11*-WT ve *erg11*-Rev primerleri ile yapılan PZR sonrası jel elektroforezde 450 bç uzunluğunda bant saptanırken, mutasyon taşıyan

izolatlarda *erg11*-Y132F ve *erg11*-Rev primerleri ile yapılan PZR sonucunda 450 bç uzunluğunda bant saptanmıştır. Mutasyon taşımayan referans suş ve izolatlarda mutasyon primeri *erg11*-Y132F ile gerçekleştirilen PZR sonucunda spesifik olmayan yaklaşık 600 bç uzunluğunda bir bant meydana gelmektedir (Şekil 6.20). Elektroforez görüntülemesi ile MAS PZR-2 sonucunda da MAS PZR-1 ile aynı sonuçlar elde edilmiştir. MAS PZR-2’de ilk yöntemden farklı olarak bir izolatın hem *erg11*-WT hem de *erg11*-Y132F primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında 450 bç uzunluğunda bant elde edilerek heterozigot A395T mutasyonu taşıdığı saptanmıştır (29 numaralı izolat).

57 *C. parapsilosis* izolatında araştırılan A395T mutasyonu izolatların 35’inde (%61,4) tespit edilmiştir. EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre azollere duyarlı olmayan 41 *C. parapsilosis* izolatının 33’ünde (%80,5) ve azollere duyarlı olarak saptanan 16 *C. parapsilosis* izolatının ikisinde (%12,5) *erg11* geninde A395T mutasyonu MAS PZR-2 yöntemi ile tespit edilmiştir (Tablo 6.19, Tablo 6.20). Mutasyon saptanan 35 *C. parapsilosis* izolatının flukonazole 33’ü (%94,3) dirençli, ikisi (%5,7) duyarlı; vorikonazole 32’si (91,4) dirençli, biri (%2,9) artmış temasta duyarlı, ikisi (%5,7) duyarlı; itrakonazole 14’ü (%40) dirençli, 21’i (%60) duyarlı bulunmuştur.



Şekil 6.20. *erg11* geninde A395T mutasyonu varlığını saptayan MAS PZR-2 sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: Moleküler büyüklük belirteci (100 bp plus DNA Ladder, (Bioron GmbH, Almanya)), NK: Negatif kontrol, 62, 1, 2, 7, 8, 9, 14: Hasta izolatları, Cp: *C. parapsilosis* ATCC 22019, bç: baz çifti.

Tablo 6.19. *C. parapsilosis* izolatlarının azol MİK değerleri ve *erg11* ile *mrr1* genlerindeki mutasyon varlığı

İzolat No	Flukonazol MİK µg/ml (Duyarlılık kategorisi)	Vorikonazol MİK µg/ml (Duyarlılık kategorisi)	İtrakonazol MİK µg/ml (Duyarlılık kategorisi)	erg11	mrr1	
				A395T (Y132F)	G1214A (R405K)	G2779T (G927C)
Azol Dirençli / Artmış Temasta Duyarlı						
2	32 (R)	0,25 (I)	0,25 (R)	-	-	+
7	16 (R)	0,5 (R)	0,125 (S)	+	-	-
8	16 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	+	-
9	32 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	+	-
11	8 (R)	2 (R)	0,06 (S)	+	+	-
12	8 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	+	-
16	8 (R)	1 (R)	0,25 (R)	+	-	-
18	16 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	+	-
20	32 (R)	1 (R)	0,25 (R)	+	-	-
22	16 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	-	-
24	8 (R)	0,5 (R)	0,03 (S)	-	-	+
29	8 (R)	0,5 (R)	0,5 (R)	+	-	-
30	4 (I)	0,5 (R)	0,5 (R)	-	-	+
32	8 (R)	1 (R)	0,25 (R)	+	+	-
33	8 (R)	1 (R)	0,25 (R)	+	-	-
40	16 (R)	1 (R)	0,125 (S)	+	-	-
42	32 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	-	-
45	8 (R)	1 (R)	0,25 (R)	+	-	-
46	8 (R)	0,5 (R)	0,06 (S)	+	+	-
51	16 (R)	0,25 (I)	0,125 (S)	-	-	+
54	8 (R)	0,25 (I)	0,06 (S)	+	-	-
55	8 (R)	1 (R)	0,125 (S)	+	-	-
56	8 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	+	-
58	8 (R)	0,5 (R)	≤0,015 (S)	+	-	-
62	16 (R)	2 (R)	0,5 (R)	+	-	-
65	32 (R)	0,5 (R)	0,25 (R)	-	-	+
66	16 (R)	4 (R)	0,25 (R)	+	+	-
67	16 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	-	-
68	16 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	-	-
69	8 (R)	0,5 (R)	0,125 (S)	+	-	-
76	16 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	-	-
87	16 (R)	0,5 (R)	0,5 (R)	-	-	+
89	16 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	-	-
104	32 (R)	2 (R)	0,125 (S)	+	-	-
108	8 (R)	0,5 (R)	0,125 (S)	+	-	-
113	8 (R)	0,5 (R)	0,125 (S)	+	-	-
116	8 (R)	0,125 S	0,25 (R)	-	-	-
119	16 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	-	-
128	8 (R)	1 (R)	0,125 (S)	+	-	-
134	8 (R)	0,5 (R)	0,25 (R)	-	-	-
141	16 (R)	2 (R)	0,25 (R)	+	-	-
Azol Duyarlı						
1	1 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	-		
14	4 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	+		
15	≤0,125 (S)	≤0,015 (S)	0,03 (S)	-		
19	1 (S)	≤0,015 (S)	0,125 (S)	+		
28	0,5 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	-		
35	1 (S)	0,06 (S)	0,125 (S)	-		
47	2 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	-		
48	0,5 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	-		
81	2 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	-		
83	0,5 (S)	≤0,015 (S)	0,06 (S)	-		
84	≤0,125 (S)	≤0,015 (S)	0,03 (S)	-		
99	2 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	-		
107	1 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	-		
123	0,5 (S)	≤0,015 (S)	0,125 (S)	-		
125	0,25 (S)	≤0,015 (S)	0,125 (S)	-		
137	0,5 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	-		

S: Duyarlı, R: Dirençli, I: Artmış temasta duyarlı, (+): Mutasyon var, (-): Mutasyon yok

Tablo 6.20. *erg11* geni MAS PZR 1-2 (n=57) ve *mrr1* gen dizilimi (n=41) gerçekleştirilen izolatlarda saptanan mutasyonlar

Gen Bölgesi	Baz Değişikliği	Aminoasit Değişikliği	n	%
<i>erg11</i>	A395T	Y132F	35/57	61,4
<i>mrr1</i>	G1214A	R405K	9/41	22
	G2779T	G927C	6/41	14,6

%%: Çalışılan izolat sayısına oranı, n: İzolat sayısı

Her iki MAS PZR yöntemi ile sonuçlar aynı şekilde sonuçlanmıştır ve tüm *C. parapsilosis* izolatlarının 35'inde (%61,4) A395T (Y132F) mutasyonu saptanmıştır. Azollere duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarının dizi analizinde izolatların %36,6'sında (15/41) *mrr1* geninde mutasyon saptanmıştır. En sık G1214A (R405K) ardından G2779T (G927C) mutasyonları saptanmıştır (Tablo 6.21). *mrr1* geninde G1214A (R405K) mutasyonu taşıyan izolatların tamamında *erg11* geninde de A395T mutasyonu bulunmaktadır. *mrr1* geninde G2779T (G927C) mutasyonu taşıyan altı izolatta ise *erg11* geninde A395T mutasyonu tespit edilmemiştir (Tablo 6.19).

C. parapsilosis izolatlarının *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu taşıma duruma göre antifungal duyarlılık oranları Tablo 6.21'de ve flukonazole duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarında *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonunu taşıma durumuna göre antifungal duyarlılık oranları Tablo 6.22'de verilmiştir.

Tablo 6.21. *C. parapsilosis* izolatlarının *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu taşıma durumuna göre antifungal duyarlılık oranları

Antifungal İlaç	% Duyarlı izolat oranı)*			
	Y132F <i>erg11</i> Pozitif İzolatlar (n = 35)	Y132F <i>erg11</i> Negatif İzolatlar (n = 22)	Tüm İzolatlar (n = 57)	p
Flukonazol	5,7 (2)	63,6 (14)	28,1 (16)	0,000
Vorikonazol	5,7 (2)	68,2 (15)	29,8 (17)	0,000
İtrakonazol	60 (21)	72,7 (16)	64,9 (37)	0,327
Anidulafungin	100 (35)	100 (22)	100 (57)	-
Mikafungin	100 (35)	100 (22)	100 (57)	-
Amfoterisin B	97,1 (34)	100 (22)	98,2 (56)	0,424

* Klinik sınır değerleri EUCAST 2023 değerlerine göre verilmiştir. Parantez içinde izolat sayısı verilmiştir.

Tablo 6.22. Flukonazole duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarında *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonunu taşıma durumuna göre antifungal duyarlılık oranları

Antifungal İlaç	% (Duyarlı izolat oranı) *				p
	Flukonazol Duyarlı Olmayan Y132F <i>erg11</i> Pozitif İzolatlar (n = 33)	Flukonazol Duyarlı Olmayan Y132F <i>erg11</i> Negatif İzolatlar (n = 8)	Flukonazol Duyarlı Olmayan İzolatlar (n =41)	Tüm İzolatlar (n = 57) %	
Flukonazol	0	0	0	28,1	-
Vorikonazol	0	12,5 (1)	2,5 (1)	29,8	0,195
İtrakonazol	57,6 (19)	25 (2)	51,2 (21)	63,1	0,130
Anidulafungin	100 (33)	100 (33)	100 (41)	100	-
Mikafungin	100 (33)	100 (33)	100 (41)	100	-
Amfoterisin B	97 (32)	100 (8)	100 (41)	97,2	1,000

* Klinik sınır değerleri EUCAST 2023 değerlerine göre verilmiştir. Parantez içinde izolat sayısı verilmiştir.

7. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan araştırmalar kandidemi vakalarının arttığını bildirmektedir (3-5, 140). Kandidemi insidansı dünya çapında son on yılda %50 oranında artmıştır ve ülkeye ve klinik ortama bağlı olarak sıklığı 2,4/100.000-15/100.000 arasında değişmektedir. Antifungal tedavi seçeneklerindeki önemli ilerlemeye rağmen, kandidemi hala %40-60 arasında değişen genel kaba ölüm oranıyla ilişkilidir. Mortalite, dikkate alınan kontrol grubuna ve altta yatan komorbiditelere bağlı olarak %5 ile %49 arasında değişmektedir (1). Günümüzde *Candida* türleri nozokomiyal (sağlık bakımı ile ilişkili) KAE'nin en sık dördüncü nedenidir ve hastanede edinilen tüm KAE'nin ise %8-10'unu oluşturmaktadır (2, 68, 141, 142).

Yapılan çalışmalar ile kandidemi gelişiminde etkisi olan çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar; ileri yaş, erkek cinsiyet, YBÜ'de uzun süre kalma, kronik hastalıklar, SVK varlığı, TPN uygulanması, cerrahi (özellikle abdominal cerrahi), immunsüpresif ilaç kullanımı, malignite, yüksek dozda geniş spektrumlu veya uzun süreli antibiyotik kullanımı, hemodiyaliz, invaziv tıbbi cihazların varlığı şeklindedir (1, 70, 143). İsviçre'de 2013-2017 yılları arasında beş üniversite hastanesinde YBÜ ve diğer hastane bölümleri arasındaki kandidemi risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada, YBÜ popülasyonunda kandidemi için risk faktörleri arasında TPN, akut böbrek hasarı, kalp hastalığı, daha önce septik şok geçirmiş olmak ve aminoglikozit kullanım öyküsü yer almışken, diğer servislerdeki popülasyonda kandidemi için bağımsız risk faktörleri arasında SVK, TPN, glikopeptit ve nitroimidazol kullanım öyküsü yer almıştır (1). Cerrahi YBÜ hastalarında kandidemi risklerini değerlendiren başka bir çalışmada ise antibiyotik kullanımı kandidemi gelişimi ile ilişkili bulunmamış, cerrahi (özellikle abdominal cerrahi) geçiren, SVK olan, TPN alan, akut böbrek yetmezliği, şok ve yaygın damar içi pıhtılaşması olan hastalarda ise riskin arttığı saptanmıştır (70). Çalışmamızda da bu risk faktörlerinin varlığı araştırılmış ve YBÜ ve diğer servislerde yatan hastalar arasında risk faktörlerinin varlığı açısından istatistiksel fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. Hastalarımız arasında cinsiyet ve yaş açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiş ve yaş ortalaması $65,6 \pm 2$ şeklinde belirlenmiştir. Çalışmalarda kandidemi daha çok erkeklerde (144-147) gözlenmesine rağmen bizim çalışmamızda kadın ve erkeklerde neredeyse eşit olarak görülmüştür (kadınlarda %50,7) (Tablo 6.1). Kandidemi tespit edilen hastaların %65,1'i 60 yaşın üzerindedir ve bu durum Tortorano ve ark. (148) tarafından yapılan büyük bir Avrupa çalışmasına, Resende ve ark. (149) tarafından yapılan bir Brezilya çalışmasına, Ahmad ve ark. (144) tarafından yapılan Hindistan çalışmasına ve Ghrenassia ve ark. (146) tarafından yapılan

Fransa çalışmasına benzerdir. Bu durum muhtemelen bu popülasyonun zayıf immün sistemine, yaşla birlikte artan kronik hastalıkların varlığına veya uzun süreli YBÜ kalışlarına bağlı olarak gelişebilmektedir (144). Çalışmamızda literatürle uyumlu şekilde kandidemi risk faktörlerinden en sık saptananı invaziv tıbbi cihaz varlığı (%63,6) olmuştur (periferik kateter, üriner kateter, dren vb.) (147). Daha sonra sırasıyla hastalarımızın %62,1'inde SVK, %61,4'ünde kronik hastalıklar, %51,5'inde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, %49,2'sinde mekanik ventilasyon, %31,1'inde yakın geçmişte cerrahi öyküsü, %27,3'ünde daha önceden flukonazol kullanım öyküsü, %27,3'ünde malignite, %25'inde TPN, %13,6'sında immünsüpresif tedavi, %10,6'sında abdominal cerrahi ve %5,3'ünde hemodiyaliz saptanmıştır. Tüm hastalar bu risk faktörlerinden en az birini taşımaktadır. Bu risk faktörlerinden invaziv tıbbi cihaz varlığı ve mekanik ventilasyon YBÜ hastalarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,000$) (Tablo 6.1). Hastanemizde özellikle YBÜ'de yatan hastalarda kandidemiye öngörme açısından bu risk faktörlerine sahip olanlara özellikle dikkat edilmesi tanının ve tedavinin gecikmesi nedeniyle artan mortaliteyi engelleyebilir. Yüksek riskli hastalardan hangilerinin antifungal profilaksiden fayda göreceğinin belirlenmesi, uygun ampirik tedavinin tespiti için klinik ve laboratuvar işbirliğini içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Candida türleri, dünya çapında özellikle YBÜ'de önemli oranda morbidite ve mortalite ile seyreden, artmış tıbbi maliyetlerle sonuçlanan nozokomiyal KAE'nin %8-10'unu oluşturarak dördüncü sırayı alan önemli enfeksiyon etkenlerindendir (68, 142). Son yıllarda yapılan çalışmalar kandidemi insidansının arttığını bildirmektedir (4, 150, 151). Kandidemi vakalarının %95'inden fazlasına sebep olan türler *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii*'dir (151, 152). *C. albicans*, kandideminin en sık görülen nedeni olmasına rağmen son yıllarda *C. albicans*'tan NAC türlerine progresif geçişler küresel olarak gözlemlenmektedir (151). Son yıllarda özellikle *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'te gözlenen artış bu türlerin ilaç direncinin de sık olabilmesi nedeniyle oldukça dikkat çekicidir. Bu durumun artan antifungal ilaç kullanımına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Ancak, flukonazolün profilaksi ve tedavi için nadiren kullanıldığı Brezilya'da altı farklı üçüncü basamak hastanede gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada, NAC insidansı yüksek bulunmuştur (tüm kandidemi ataklarının %63'ü). Nozokomiyal kandidemi paternindeki bu değişim, flukonazolün yaygın kullanımının yanı sıra immünsüpresif hastaların sayısındaki artışa, invaziv tıbbi prosedürlerin kullanımına, YBÜ'de uzun süreli kalışlara ve daha önce geniş spektrumlu antibiyotik uygulanmasına da bağlanmıştır (68, 153). Bizim verilerimiz de burada sıralanan risk faktörlerinin çoğunu hastaların taşıması, özellikle de hastaların %27,3'ünde kandidemi gelişmeden önce idrar, yara, doku gibi çeşitli

örneklerinde *Candida* üremesi nedeniyle flukonazol kullanım öyküsünü bulunduğunu gösterdiğinden, hastanemizde kandidemide NAC türlerinin hakimiyeti gözlenmiş olabilir (Tablo 6.1).

Uluslararası fungal sürveyans programları ve çok merkezli ulusal çalışmalar, *Candida* KAE izolatlarının tür dağılımındaki zamansal ve coğrafi varyasyona ilişkin oldukça fazla veri sağlamış ve antifungal direncin kapsamına ilişkin bilgi birikimine de katkıda bulunmuştur. 1997-2007 arasında *Candida* klinik izolatları için tür dağılımı ve antifungal duyarlılık profilinin belirlendiği ve 41 ülkeden verilerin analiz edildiği küresel ARTEMIS DISK Antifungal Sürveyans Programının sonuçlarına göre, kandidemi gibi invaziv *Candida* enfeksiyonlarında artan tür sayısına ek olarak, tür dağılımında zamansal değişiklikler görülmüştür. *C. albicans* dünya çapında kandidemiye neden olan en yaygın tür olmaya devam etmesine rağmen (genel olarak tüm *Candida* türlerinin %66'sı), zamanla *C. albicans* izolasyonunda azalma eğilimi görülmektedir (2, 154). 1997-2016 arasında 20 yıllık invaziv kandidiyaz etkeni olan *Candida* türlerinin değerlendirildiği uluslararası SENTRY antifungal sürveyans çalışmasında en yaygın 5 türün sıralaması zaman içinde biraz değişiklik gösterse de her yıl en baskın tür *C. albicans* olmuştur. Bu çalışmada değerlendirilen 20.788 *Candida* izolatının %46,9'u *C. albicans*, %18,7'si *C. glabrata*, %15,9'u *C. parapsilosis*, %9,3'ü *C. tropicalis*, %2,8'i *C. krusei* ve %6,5'i diğer *Candida* türleri olarak raporlanmıştır. *C. glabrata* genel olarak en yaygın NAC türü olarak saptanmıştır (155). *C. albicans*'ın dünya genelinde görülme sıklığı Latin Amerika'da %37 gibi düşük bir orandan Norveç'te %70 gibi yüksek bir orana kadar değişmektedir. *C. albicans* en yüksek oranda Kuzey ve Orta Avrupa'da ve ABD'de izole edilmekte olup, NAC türleri Güney Amerika, Asya ve Güney Avrupa'da daha yaygındır (2, 156). *Candida* türlerine bağlı KAE'leri değerlendirmek amacıyla Brezilya'da yapılan çok merkezli bir sürveyans çalışmasında NAC türleri, olguların %65,7'sini oluşturmuş; *C. albicans* (%34,3), *C. parapsilosis* (%24,1), *C. tropicalis* (%15,3) ve *C. glabrata* (%10,2) en yaygın türler olarak saptanmıştır. Bu çalışmada NAC türleri arasında en sık *C. parapsilosis* saptanmıştır (157).

Bizim çalışmamızda da NAC türleri kandideminin baskın etkenleri olarak saptanmış olup ilk sırada *C. parapsilosis* (%36,3), ardından *C. albicans* (%28,6) gelmektedir (Şekil 6.1). Çalışmaya dâhil edilen izolatların yaklaşık %62'sinin YBÜ kaynaklı olması, kandideminin merkezimizde YBÜ hastaları arasında kandideminin daha sık gözlemlendiğini desteklemektedir. YBÜ hastalarında *C. parapsilosis*'in daha sık etken olarak saptanması, bu türün antifungallere dirençli olması ve hızlı yayılması nedeniyle önemli bir risk oluşturmaktadır. Diğer servislerden gelen örneklerden izole edilen izolatlarda ise en sık *C. albicans* saptanmıştır (Tablo 6.2). Bu

farklılık YBÜ’de yatan hastaların invaziv tıbbi cihaz, mekanik ventilasyon gibi invaziv girişimlerinin daha sık olmasına bağlanmıştır.

C. glabrata, ABD, Kanada, Avustralya ve bazı İskandinav ülkelerinde kandideminin ikinci önde gelen nedenidir ve YBÜ’lerde, hematolojik maligniteleri ve solid tümörleri olan hastalarda kandideminin ilk nedeni olarak saptanmıştır. Çalışmamızda da *C. glabrata* (%18,1) kandideminin üçüncü en sık sebebi, NAC türleri arasında ise ikinci sıklıkta izole edilen türdür (Şekil 6.1).

C. parapsilosis, intravenöz kateterlere ve tıbbi cihazlara tutunma ve sağlık personelinin ellerini kolonize etme yeteneği nedeniyle kandidemi dâhil invaziv mantar enfeksiyonlarından izole edilen en yaygın türlerden biridir ve invaziv enfeksiyonlara ve klonal salgınlara katkıda bulunabilmektedir. Çoğu merkezde *C. albicans*'tan sonra kan kültürlerinden izole edilen en yaygın ikinci veya üçüncü türdür. Kandidemide *C. parapsilosis*'in prevalansı coğrafi bölgeye göre değişebilmektedir, güney Avrupa ve bazı bölgelerde daha yüksek oranlar bildirilmiştir. Asya ve Latin Amerika'da, Kolombiya ve Venezuela'dan yapılan bazı çalışmalarda, *C. parapsilosis*, *C. albicans*'ı geride bırakarak kandideminin en yaygın nedeni olarak tanımlanmıştır (37, 158, 159).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *C. parapsilosis*, farklı oranlarda saptanarak (%6-66) NAC türleri arasında genellikle en sık tür olarak bildirilmiştir (153, 160-163). 1994-2000 arasında bir üniversite hastanesinde kandidemi izolatlarının değerlendirildiği bir çalışmada *C. albicans* (%37,2) en sık etken olarak gözlenirken hemen ardından *C. parapsilosis* (%32,2) ikinci sırada saptanmıştır (164). Türkiye’de altı yıllık zaman dilimi içerisinde kan kültürlerinden izole edilen maya mantarlarının tür dağılımının incelendiği çok merkezli bir çalışmada da bir merkez dışında en sık saptanan maya türü *C. albicans* (%43,1) olurken, bu türü *C. parapsilosis* kompleks (%29,1), *C. glabrata* (%10,1), *C. tropicalis* (%7,5), *C. krusei* (%2,4), *C. kefyr* (%1,6) ve diğer maya türleri (%6,2) izlemiş ve NAC türleri baskın olarak saptanmıştır. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde KAE’lerin tüm yıllarda ana sorumlusu bizim bulgularımıza benzer şekilde *C. parapsilosis* olmuştur. *Candida* türlerinin yıllara göre dağılımında, *C. parapsilosis* kompleks için 2016 yılında gözlenen artış ($p= 0.02$) dışında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (165). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada da sonuçlarımıza benzer şekilde *C. parapsilosis*'in en sık etken olduğu belirtilmektedir (147). Akdeniz Üniversitesi’nde yapılan çalışmada kandideminin en sık etkeni olarak NAC türlerinin sorumlu olduğu gözlenmiştir (%64). Tür dağılımına bakıldığında en sık

görülen tür *C. albicans* (%45) olup, onu %22,5 ile *C. parapsilosis*, %16,7 ile *C. tropicalis* ve %12,7 ile *C. glabrata* takip etmiştir (166). Bu çalışmaya benzer şekilde Gürcüoğlu ve ark. (167) tarafından da kandideminin en sık etkeninin NAC türleri (%55) olduğu saptanmıştır. En sık izole edilen türler sırasıyla *C. albicans* (%45), *C. parapsilosis* (%26), *C. tropicalis* (%7), *C. krusei* (%7) ve *C. glabrata* (%3,5)'dir. Bursa'da 2018-2021 arasında dört yıllık bir süre boyunca 236 *Candida* KAE izolatının değerlendirildiği bir çalışmada izolatların 131'i *C. albicans* (%55,5), 40'ı *C. parapsilosis* (%16,9), 21'i *C. tropicalis* (%8,9), 19'u *C. glabrata* (%8,1), sekizi *C. lusitanae* (%3,4) olarak saptanmıştır. Bu merkezde kandideminin en sık etkeni olan *C. albicans*'ı izleyen *C. parapsilosis* NAC türleri arasında ilk sırayı almıştır (168). İstanbul'da gerçekleştirilen bir çalışmada da yine NAC türleri en sık kandidemi etkeni olarak bildirilerek tür düzeyinde en sık *C. albicans* hemen arkasından *C. parapsilosis* saptanmıştır (169). Adana'daki bir çalışmada ise kandidemi etkeni olarak NAC türleri sorumlu tutulmuştur ve bizim bulgularımıza paralel olarak birinci sırada *C. parapsilosis* (% 33,9), ikinci sırada *C. albicans* (% 27,5) üçüncü sırada ise *C. tropicalis* (% 16) bulunmuştur (170). Şahiner ve ark. (171) da bizim bulgularımıza benzer olarak kandidemi etkenlerini sırasıyla *C. parapsilosis* (% 38,5), *C. tropicalis* (% 30,8) ve *C. albicans* (% 26,9) olarak tanımlanmıştır. 2017-2019 YBÜ verilerinin paylaşıldığı bir çalışmada da kandideminin %92'sinden NAC türleri sorumlu tutularak en sık etkenin *C. parapsilosis* (%84) olduğu belirlenmiştir (147).

Çalışmamızda Türkiye'de üçüncü basamak bir üniversite hastanesinde *Candida* türlerinin neden olduğu KAE'ler değerlendirilmiştir. Belirtilen tarihler arasında kandidemiye en sık sebep olan tür daha önceki çalışmalarla paralel olarak, *C. parapsilosis* (%36,3) olmuştur (170). Daha sonra sırasıyla *C. albicans* (%28,6), *C. glabrata* (%18,1), *C. auris* (%7,7) ve *C. tropicalis* (%3,8) saptanmıştır (Şekil 6.1). NAC türleri, çalışmaya dâhil edilen tüm kandidemi etkenlerinin %71,4'ünü oluşturmuş ve bu oran küresel veriler ve ülkemiz verileriyle uyumlu olarak gözlenmiştir. Literatürde yüksek mortalite (bazen *C. albicans* kandidemisine bağlı mortaliteyi aşan) ile sonuçlanan klinik bir sorun ve hastanede kalış süresinin uzaması nedeniyle ekonomik bir soruna da sebep olabildiği bildirilen NAC kandidemisi hastanemizde de yüksek oranda saptanmış olup önemli bir sağlık sorunu olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, NAC türlerinin antifungallere karşı direnci, gelecekteki ampirik terapötik ve profilaktik stratejiler için büyük bir zorluk teşkil etmesi nedeniyle önem taşımaktadır (172). NAC türlerindeki bu artış eğiliminin nedeni tam olarak bilinmese de bazı tıbbi risk faktörlerinin bu duruma yol açabileceği düşünülmektedir. Özellikle *C. parapsilosis* kaynaklı kandidemilerin, biyofilm oluşturabilme yetenekleri nedeniyle invaziv tıbbi cihazı olan, SVK olan ve TPN alan hastalarda oldukça sık gözlemlendiği bilinmektedir (37). Bizim çalışmamızda da invaziv tıbbi cihaz, SVK, TPN, mekanik

ventilasyon ve cerrahi öyküsü olan hasta oranlarının yüksek olması *C. parapsilosis*'in sıklığını açıklayabilir (Tablo 6.1).

Candida türleri özellikle YBÜ'deki hastalar arasında sıklıkla nozokomiyal KAE'ye neden olmaktadır ve bu enfeksiyonlar yüksek oranda morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Tüm kandidemi ataklarının yaklaşık %30-35'i YBÜ'lerde meydana gelmektedir (173, 174). Bazı çalışmalarda bu oran %50'leri bulmaktadır (175). YBÜ'de genişletilmiş enfeksiyon prevalansı ("Extended Prevalence of Infection in Intensive Care", EPIC II) nokta prevalans çalışması; enfekte, kültür pozitif hastaların %17'sinde *Candida* izole edilmiştir. Çeşitli çalışmalar son yıllarda YBÜ'de kandidemi insidansının arttığını bildirmiştir (173, 174). İnvaziv kandidemi etkeni olarak *C. albicans* sıklığındaki düşüş ve NAC türlerindeki (özellikle *C. glabrata*) artış eğilimi Trick ve ark.'nın (176) YBÜ bulgularıyla da desteklenmiş ve yazarlar *C. albicans* insidansındaki bu azalmayı profilaktik flukonazol kullanımına bağlamışlardır. *C. parapsilosis*, Güney Avrupa, Avustralya ve Latin Amerika YBÜ'lerinde diğer yerlere göre daha sık görülme eğilimindedir ve *C. glabrata* yaşlı popülasyonda orta yaşlı yetişkinlere göre daha sıktır. YBÜ'ler arasında *Candida* türlerindeki farklılık, yatan hasta profilinden kaynaklanabilmektedir. Örneğin, kandidemi için bilinen risk faktörleri arasında antimikrobiyal tedavi varlığı, antimikrobiyal tedavinin süresi, TPN, nötropeni, hemodiyaliz, önceki kolonizasyon ve kapsamlı cerrahi veya yanıklar yer almaktadır. Flukonazolün profilaktik kullanımının YBÜ tipleri arasında farklılık göstermesi de mümkündür (176). SENTRY programının 2008-2009 yılları arasında 79 merkezden elde edilen verilerinde YBÜ ve diğer servislerde *Candida* türlerinin dağılımında küçük farklılıklar saptanmıştır. YBÜ'de sırasıyla *C. albicans* (%50,4), *C. glabrata* (%17,5), *C. parapsilosis* (%15,1) ve *C. tropicalis* (%10,5) izole edilirken diğer servislerde *C. albicans* (%47,4), *C. parapsilosis* (%18,9), *C. glabrata* (%18,1) ve *C. tropicalis* (%9,6) şeklinde tespit edilmiştir. YBÜ ilişkili *Candida* KAE sıklığı, Latin Amerika'da (%56,5), Avrupa (%44,4) ve Kuzey Amerika (%39,6) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olarak belirlenmiştir (175). Bizim çalışmamızda ise diğer servislerde *C. albicans* (%41,5) daha sık kandidemi etkeni iken YBÜ'de Latin Amerika verileriyle uyumlu şekilde *C. parapsilosis* (%48,3) hakimiyeti mevcuttur (Tablo 6.2, Şekil 6.2). YBÜ popülasyonunda SENTRY programındaki verilerle paralel sonuç veren (sıklık sırası *C. albicans* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis* > *C. tropicalis* > *C. krusei* şeklinde izlenen) çalışmalar olduğu gibi (5, 177, 178), YBÜ'de KAE'nin bir nedeni olarak *C. glabrata*'ya göre *C. parapsilosis* veya *C. tropicalis*'in daha sık olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (179-182). *C. glabrata*'nın *C. parapsilosis*'ten daha sık rastlandığını belirten çalışmalar arasında *C. parapsilosis*'teki artışa dikkat çekilmektedir (5).

Horasan ve ark. (161) ülkemizde bir üniversite hastanesinde YBÜ’de kandideminin en sık etkenini *C. parapsilosis* (%66,1) olarak bildirmiştir. Bu çalışmada izolatların %18,6’sı *C. albicans*, %81,4’ü NAC türleri olarak saptanmıştır. Başka bir çalışmada da benzer şekilde YBÜ’de saptanan kandidemilerin %84’ünden *C. parapsilosis* sorumlu tutulmuştur (147). Bizim çalışmamızda da ülkemizde raporlananlara benzer şekilde izolatların çoğunluğunu YBÜ kaynaklı izolatlar (%62,7) oluşturmaktadır (170) (Tablo 6.2). *C. parapsilosis* YBÜ hastalarında en sık kandidemi etkeni olarak saptanmıştır. Bu durum YBÜ’deki hastaların çoğunun invaziv girişimlerine bağlı gelişmiş olabilir. Bulgularımız, *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının intravenöz kateteri olan hastalarda daha sık görüldüğünü gösteren önceki epidemiyolojik çalışmalarla da uyumludur (161). *C. parapsilosis*’in hastanemizde YBÜ hastalarında izlenen istatistiksel olarak anlamlı yüksekliği bu mikroorganizmanın sağlık personeli yoluyla taşınabilmesi nedeniyle dikkat çekilmesi gereken konulardandır. Verilerimize göre YBÜ hastalarında *C. parapsilosis*’i sırasıyla *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izlemiştir (Tablo 6.2 ve Şekil 6.2).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında erken tanı ve tedavi, mortalite ve morbiditenin azaltılması açısından önemli olsa da kandidemili hastalarda ölüm oranlarını açıklayan, spesifik belirti ve semptomlar genellikle eksik ve tanı araçları duyarsız olduğundan, ayrıca invaziv *Candida* enfeksiyonu ve kandidemi tanısının zorluğu nedeniyle erken tanı zordur. Doğru zamanda başlanan antifungal tedavi ve kaynak kontrolü, kandidemili hastalarda sağ kalımın en önemli belirleyicileridir. Tedavi edilmeyen kandidemilerde mortalite oranı %60’ın üzerinde iken, erken tedavi ile bu oran yaklaşık %30-40’a düşmektedir. *Candida* türlerinin türe özgü antifungal duyarlılık profilleri olduğundan, enfeksiyon etkeni olan türün ve duyarlılığının belirlenmesinin *Candida* KAE olduğundan şüphelenilen hastaların uygun tedavisi için gereklidir. Ayrıca türe bağlı olarak da antifungal ilaç duyarlılığındaki farklılıklar nedeniyle duyarlılık testinin yapılması son derece önem taşımaktadır. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) tarafından 2016’da güncellenen Kandidiyaz Yönetimi için Klinik Uygulama Kılavuzu’nda, nötropenik olmayan ve nötropenik hastalarda kandideminin başlangıç tedavisinde ekinokandin grubu antifungal ilaçlar önerilmektedir. Kandidemilerde tür tanımlamadan önce ekinokandinler ilk tedavi seçeneği olarak önerilmiş olsa da, takip tedavisi ve alternatif tedavi seçenekleri daha çok spesifik türlere ve ilişkili antifungal duyarlılığa bağlıdır. Kılavuzda tüm kan akımı *Candida* izolatları için azol duyarlılığı için test yapılması önerilmektedir. *C. parapsilosis* ise ekinokandinlere diğer *Candida* türlerine göre intrinsik olarak daha yüksek MİK’ler göstermektedir ve bu da *C. parapsilosis*’in ekinokandinlere daha az duyarlı olabileceği endişesini doğurmaktadır (183). Kaspofungin ile tedavi sırasında *C. parapsilosis*’e bağlı kalıcı fungemi sayılarının daha yüksek olduğunu belirten çalışmalar

mevcut olması nedeniyle flukonazol bu türün neden olduğu enfeksiyonlarda daha öncelikli bir konumdadır (184). Lösemi ve hematopoietik kök hücre alıcılarında invaziv kandidiyaz, aspergilloz ve mukormikoz tedavisi için yayımlanan ECIL-6 kılavuzlarına göre *C. parapsilosis* invaziv enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olarak flukonazol önerilmektedir (185). ESCMID Avrupa Mantar Enfeksiyonu Çalışma Grubu (*ESCMID European Fungal Infection Study Group*, EFISG) tarafından yayımlanan kılavuzda bazı riskli hasta gruplarında flukonazol profilaksisini önermektedir (186). Yüksek ekinokandin MİK değerleri nedeniyle *C. parapsilosis* kaynaklı kandidemi tedavisinde ilk seçenek olarak flukonazolün kullanılması bu tür içinde zamanla azol direncinin artmasına sebep olmuş olabilir (155). Başka bir çalışmaya benzer şekilde laboratuvarımızda *C. parapsilosis* kandidemisinin sık saptanması, azol kullanım öyküsünün hastaların %27'sinde belirlenmesi ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı (%51,5) nedeniyle azol direnç oranının yüksek olabileceğini düşündürmektedir (187).

EUCAST, AFDT için sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Bu yöntemde, sıvı besiyeri ve antimikrobiyal ilaçların seri sulandırımalarını içeren mikrodilüsyon plak kuyucuklarında mantarların araştırılan antifungal ajana duyarlılığı ilaçların MİK belirlenerek araştırılır. MİK, antifungal ilacın mantarın üremesini engelleyen (inhibe eden) en düşük konsantrasyon (mg/L) olarak tanımlanır. MİK, organizmanın antifungal ilaca karşı duyarlılığı veya direncine ilişkin bilgi vererek doğru tedavi kararlarının alınmasında yardımcı olmaktadır (9, 10).

C. parapsilosis izolatları arasında azol direncinin genellikle nadir olduğu kabul edilmektedir ve bu durum, Afrika/Orta Doğu bölgesinden gelen izolatlar haricinde ARTEMIS programında incelenen tüm bölgelerde geçerlidir. Flukonazol ve vorikonazol direnci Avrupa, Latin Amerika, Kuzey Amerika ve Asya-Pasifik bölgelerinde sırasıyla <%5 ve <%3 iken, Afrika/Orta Doğu bölgesinde sırasıyla %15,0 ve %11,1 olarak saptanmıştır. ARTEMIS programında en yüksek direnç oranları Güney Afrika'daki izolatlarda görülmüştür (flukonazole %21 ve vorikonazole %15) (154). Güney Afrika'da yapılan bir kandidemi surveyans çalışmasında, 2172 izolat değerlendirilmiş ve bizim çalışmamızla benzer şekilde *C. parapsilosis* izolatlarının sadece %37'sinin flukonazole duyarlı olduğu ve flukonazole dirençli izolatların %44'ünün (123/282) vorikonazole de çapraz direnç gösterdiği gösterilmiştir (188). Yakın tarihli bir küresel çalışma, *C. parapsilosis*'in, *Candida* türleri arasında en yüksek flukonazol direnci oranına sahip olduğunu göstererek Avrupa dâhil olmak üzere birçok bölgede önemli bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini belirtmiştir (189). Bizim merkezimizde de en yüksek azol direnci *C. parapsilosis* izolatları arasında gözlenmiştir. Bu tür içinde flukonazol

direnci %68,4 ve vorikonazol direnci %64,9, itrakonazol direnci ise %35,1 olarak saptanmıştır (Tablo 6.3). Türkiye’de 1997-2017 yılları arasında 12 üçüncü basamak sağlık merkezindeki kandidemi hastalarından izole edilen 1991 *Candida* izolatının antifungal direnç oranlarının araştırıldığı çok merkezli bir çalışmada, CLSI sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* izolatlarında flukonazole karşı genel direnç oranları sırasıyla %7,7 ve %0,9 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, Türkiye’deki kandidemi izolatları arasında genel olarak düşük direnç oranları tespit edilmiş olsa da merkezler arasında *C. parapsilosis* izolatlarında çok geniş bir aralıkta flukonazol direnç sıklıkları (%0-47,1) tespit edilmiştir. Çalışmaya katılan bu merkezlerde ekinokandin direnci saptanmamıştır (190). Ülkemizde bizim çalışmamızda olduğu gibi *C. parapsilosis* izolatları arasında yüksek oranda azol direnci (%76) saptayan çalışmalar da bulunmaktadır (147). Bu veriler bize direnç oranlarının değişken olabileceğini ve epidemiyolojik çalışmaların önemini göstermektedir.

C. albicans’ın neden olduğu enfeksiyonlar, enfeksiyonun türüne bağlı olarak değişen seviyelerde flukonazol direnciyle ilişkilidir. Kandidemi hastalarından elde edilen *C. albicans* izolatları en düşük azol direncine sahiptir (%0-5) (191). Çalışmamızda da bu verilerle uyumlu şekilde *C. albicans* izolatlarında yaklaşık %6 flukonazol direnci tespit edilerek izolatlar arasında en düşük flukonazol direncine sahip tür olarak belirlenmiştir. Vorikonazole dirençli izolat tespit edilmemiş itrakonazole ise %12 oranında direnç saptanmış ve *C. albicans*’ın itrakonazole daha sık direnç geliştirdiği gözlenmiştir (Tablo 6.3). Bazı çalışmalarda ise flukonazole direnç, *C. albicans*’ta %2 şeklinde bizden de daha düşük seviyelerde saptanmıştır (192).

Azol sınıfı antifungallerin geliştirilmesi, mantar enfeksiyonlarına yönelik tedavi seçeneklerini arttırmış ve toksisitelerinin az olması nedeniyle dünya çapında yaygın kullanımlarına yol açmıştır. Bu yaygın kullanımla birlikte *Candida* türlerinde bu ilaçlara, özellikle de flukonazole karşı son zamanlarda hem klinik ortamlarda hem de in vitro olarak direnç de artarak devam etmiştir. SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı verilerine göre hem azollere hem de ekinokandinlere karşı direnç en çok *C. glabrata* izolatları arasında görülmüştür. *C. glabrata*’nın ekinokandinlere (%16,7), flukonazole (%16,7), posakonazole (%5,0) ve vorikonazole (%11,0) karşı yüksek direnç oranlarına dikkat çekilmiştir (125). *C. glabrata*, *Candida* klinik izolatları arasında en yüksek azol direnci insidansına sahiptir ve sınıfa en yeni eklenen isavuconazol de dahil olmak üzere, antifungallerin azol sınıfına karşı intrinsik olarak azalmış duyarlılık sergilemektedir (191). Brezilya’da yapılan çalışmada flukonazol direnci öncelikle *C. glabrata* ve *C. krusei* izolatlarında saptanmıştır. (157). Ülkemizde ise *C.*

glabrata izolatlarında değişen oranlarda azol direnci görölmektedir. Arıkan ve ark.'nın (190) yaptığı çalışmada %0,9 gibi düşük bir azol direnci saptanırken, 2021 yılında yapılan başka bir çalışmada %9,2 (7/83) oranında direnç varlığı saptanmıştır (193). Çalışmamızda *C. glabrata* izolatlarında yaklaşık %10 flukonazol direnci tespit edilerek ölkemizdeki yeni verilerle uyumlu bir sonuç elde edilmiştir. *C. glabrata* izolatlarının %89'u ise flukonazole artmış temasta duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo 6.3). ECOFF değeri dikkate alınarak incelendiğinde vorikonazol için *C. glabrata* izolatlarının %3,6'sının non-WT, itrakonazol için ise tamamının WT olduğu gözlenmiştir (Tablo 6.4). Laboratuvarımızda *C. glabrata* izolatlarının azol direnci diğer türlerden farklı bulunmamıştır.

Candida türlerinde son yıllarda azol sınıfı ilaçlara çapraz direnç gelişimi de bildirilmektedir. 1997-2016 yılları arasında 39 ölkeden invaziv kandidiyazis etkeni olduğu bilinen 20.788 *Candida* izolatının CLSI prosedürüne göre değerlendirildiğı SENTRY sürveyans programında özellikle flukonazol ve vorikonazol arasında çapraz direnç varlığına dikkat çekmiştir. Flukonazole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının %67,3'ünün; flukonazole dirençli *C. albicans* izolatlarının ise %65'inin vorikonazole dirençli olduğu gözlenmiştir (155). Güney Afrika'da yapılan bir kandidemi sürveyans çalışmasında, flukonazole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının %44'ünün (123/282) vorikonazole de çapraz dirençli olduğu gösterilmiştir (188). Bizim çalışmamızda da azollere çapraz direnç değerlendirilmiş olup tüm izolatların yaklaşık %30'unun çoklu azol direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların tamamına yakını *C. parapsilosis* oluşturmaktadır. *C. parapsilosis* izolatlarının %68,4'ünün birden fazla azol türüne dirençli olduğu saptanarak literatürde yer alan verilere göre daha yüksek bir çapraz direnç oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Flukonazole direnç saptanan izolatların vorikonazol ve itrakonazol MİK değerlerinde de yükselme gözlenmiştir. Flukonazol direnci olmadan diğer azollere direncin bir izolat dışında gelişmediğı saptanmıştır. Bu izolatın flukonazol MİK değeri 4 µg/ml olup artmış temasta duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. Bu sonuç tedavi seçiminde merkezimizde özellikle YBÜ'de yatan hastalarda azollerin ilk seçenek olarak kullanılmaması gerektiğini ve ADT sonuçlarına göre hasta yönetimine devam etmenin önemini göstermektedir. Çalışmada, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole karşı saptanan yüksek direnç oranları nedeniyle lokal epidemiyolojik verilerin kandideminin insidansını ve mortalitesini azaltmak için etkili ampirik tedavi stratejilerinde klinisyene rehberlik etmede oldukça önemli olduğunu vurgulamaktayız. Çalışmamızda birden fazla azole direnç gösteren izolatlara ait azol MİK değerleri Tablo 6.8'de verilmiştir.

Çalışmamıza dâhil edilen izolatların %62'si YBÜ'de yatan hastalardan izole edilmiştir ve bu izolatların %50'si *C. parapsilosis*, %44'ü *C. albicans* ve %17,9'u *C. glabrata*'dır. Çalışmamızda YBÜ ile diğer servislerde yatan hastalardan izole edilen izolatların direnç oranları karşılaştırılmıştır (Şekil 6.3). YBÜ kaynaklı izolatlarda flukonazol ve itraconazol direncinde yükseklik olmasına rağmen fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 6.5 ve Tablo 6.7). Bununla birlikte vorikonazol direncinin YBÜ'den gelen örneklerden elde edilen izolatlardaki anlamlı yüksekliği dikkat çekmektedir ($p<0,05$) (Tablo 6.6). YBÜ hastalarında azol grubu antifungallere karşı mevcut olan bu yüksek direnç dikkate alınarak klinik ortamlarda flukonazol dirençli *C. parapsilosis*'in daha fazla yayılmasını önlemek için merkezimizde aktif süveyans çalışmalarına daha fazla ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Ekinokandin direncinin mekanizması, enzimin ilaca duyarlılığını azaltan ve daha yüksek MİK değerlerine yol açan, *fks* geni tarafından kodlanan glukon sentaz alt birimlerinin "sıcak nokta" bölgelerindeki amino asit değişikliklerini içermektedir (132). Çalışmalarda ekinokandinlere direnç nadir olarak gözlenmiştir (88) Bazı çalışmalarda anidulafungine direnç (%3.8 gibi düşük oranda) saptanmıştır (192). Bir veya daha fazla ekinokandin direnci yalnızca *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izolatları arasında tespit edilmiştir. Ekinokandin sınıfı ilaçlara direnç, *C. albicans* ve çoğu *Candida* türünde %3 'ten daha düşük oranlarda seyretmektedir (196). Ancak, ekinokandin direnci aynı zamanda azollere de sıklıkla dirençli olan *C. glabrata* izolatları arasında daha sık görülmektedir ve bu durum tedavisi zor olan çoklu ilaca dirençli suşların gelişmesine neden olmaktadır (132). Yapılan bir çalışmada, ekinokandin dirençli izolatların yaklaşık %36'sının aynı zamanda flukonazole de dirençli olduğu saptanmıştır (131). Ekinokandin direncinin, *C. glabrata*'da daha sık gözlenmesinde, bu türün direnç mutasyonları geliştirmek için daha yüksek bir potansiyelinin olmasından mı kaynaklandığı yoksa flukonazol gibi azollere karşı intrinsik olarak azalmış duyarlılığı nedeniyle daha sık uzun süreli ekinokandin tedavisi alan *C. glabrata* enfeksiyonlu hastalarla mı ilgili olduğu henüz anlaşılmamıştır. SENTRY Antimikrobiyal Süveyans Programı'nda, flukonazol dirençli *C. glabrata* KAE izolatları arasında ekinokandin direnci, 2006-2010 yılları arasında %8,0-%9,3 olarak rapor edilmiştir (197). 2006–2016 yılları arasında ise, flukonazole dirençli *C. glabrata* izolatlarında %5,5–%7,6, flukonazole dirençli *C. tropicalis* izolatlarında %1,9–%3,6 ve *C. krusei* izolatlarında %0,0–%1,7 oranında ekinokandin direnci saptanmıştır (155). 2006-2016 arasında ekinokandinlere karşı direnç oranları genel olarak şu şekildedir; *C. albicans* (%0,0-0,1), *C. parapsilosis* (%0,0-0,1), *C. tropicalis* (%0,5-0,7) ve *C. krusei* (%0,0-1,7). Bu izolatlar arasında bir veya daha fazla ekinokandine direnç nadir olarak gözlenmiştir. *C. glabrata* izolatları arasında ise bu zaman diliminde direnç oranı anidulafungin için %2,2, kaspofungin

için %3,5 ve mikafungin için %1,7 şeklinde olup diğer türlerden daha yüksek oranlar saptanmıştır (155). *C. glabrata*'daki ekinokandin direncinin dünya çapında gün geçtikçe artışı önemli sağlık problemlerinden biri olmuştur. Bu, yakın zamanda Duke Üniversitesi hastanesinde 2001-2010 arasında ekinokandin direnç oranının %4,9'dan %12,3'e yükseldiği 10 yıllık bir araştırmada belirtilmiştir. Benzer bir eğilim, Danimarka'da ülke çapında yapılan bir araştırmada da daha küçük bir ölçekte de olsa gözlemlenmiştir. *C. glabrata* KDE'nun direnç oranlarına bakıldığında, 2004–2007'de hiç vaka bulunmazken, 2008–2009'da %0,9, 2010–2011'de %1,2 ve 2012–2013'te %3,1 şeklinde artma eğiliminde olan bir direnç saptanmıştır (198). Ülkemizde ise ilk ekinokandin dirençli izolat 2021 yılında Ankara'da kandidemi etkeni olan bir *C. glabrata* izolatında *fk*s mutasyonu varlığı ile birlikte tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda ekinokandin tedavisine yanıt alınamayan ancak in vitro olarak duyarlı *fk*s mutasyonu taşıyan *C. glabrata* klinik izolatları da bildirilmiştir (199). Çalışmamızda ekinokandinlere direnç dokuz izolatta tespit edilmiştir ve genel ekinokandin direnç oranı %6,7 olarak belirlenmiştir. Anidulafungin direnci (%6), mikafungin direncinden (%0,7) daha yüksek saptanmıştır. Anidulafungin direnci saptanan izolatlarda mikafungin direnci, mikafungin direnci saptananlarda anidulafungin direnci (çapraz direnç) gözlenmemiştir. Ekinokandin direnci saptanan izolatların sekizi *C. glabrata*, biri *C. albicans*'tır. Anidulafungin direnci saptanan izolatlar literatürde de en sık ekinokandin direncinin gözlemlendiği *C. glabrata* (n=8) olmuştur. Anidulafungin direnci gözlenen *C. glabrata* izolatlarının ise flukonazole artmış temasta duyarlı ve vorikonazole WT olduğu ayrıca dört tanesinin (%50'si) İç Hastalıkları YBÜ'den izole edildiği görülmüştür. Mikafungin direnci saptanan izolat ise *C. albicans* türüne aittir. Bu izolat anidulafungine duyarlı ve flukonazole dirençli olup çoklu ilaç direncine sahiptir. *C. parapsilosis*'te ise ekinokandin direnci gözlenmemiştir. Ekinokandinlere karşı literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olarak *C. glabrata*'da direnç oranı diğer türlerle kıyaslandığında yüksek ve izolatların yarısının aynı YBÜ'den aynı zaman dilimi içinde (Aralık 2022-Şubat 2023) saptanması nedeniyle klonal ilişkisinin belirlenmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerine daha fazla dikkat edilmesi gerekmektedir. Laboratuvarımızda ekinokandinlere direnç şu anda düşüktür ancak bu durum, ekinokandinlerin kandidemi vakalarında artan kullanımları ile değişebilmesi nedeniyle direnç durumunun izlenmesini gerektirmektedir. Ayrıca ekinokandin direncine sahip izolatların azol sınıfı ilaçlara artmış MİK değerlerinin (4-32 µg/ml aralığında) saptanması ve çoklu ilaç direncine sahip izolatların tedavide başarısızlıklara neden olabilmesi nedeniyle dikkatli olunması gerekmektedir.

Kaspofungin için klinik sınır değer ve ECOFF değerleri mevcut olmadığından çalışmamızdaki izolatların duyarlılık kategorisi belirlenememiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre

izolatlarımızda kaspofungin için EUCAST yöntemi ile elde edilen MİK değerleri, $\leq 0,015$ -2 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişiklik göstermektedir. Ülkemizde KAE izolatlarının Sensititre Yeast One paneli ile gerçekleştirilen antifungal duyarlılık sonuçlarının verildiği bir çalışmada CLSI sınır değerleri kullanılarak kaspofungine tüm izolatların duyarlı olduğu bulunmuştur (202). Çalışmamızda, kaspofungin MİK değeri $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ üzerinde saptanan izolatların %96,2'si (51/52) *C. parapsilosis* olup ekinokandinlere diğer *Candida* türleriyle kıyaslandığında daha yüksek MİK sergilemiştir. Kaspofungin için MİK50 ve MİK90 değeri en yüksek tür *C. parapsilosis*, en düşük tür ise *C. albicans* olmuştur.

Çalışmalarda amfoterisin B'ye karşı direnç nadir olarak gözlenmiştir (203). Bazı çalışmalarda amfoterisin B'ye dirençli *Candida* türü saptanmamıştır. Ülkemizde çok merkezli bir çalışmada da amfoterisin B direnci saptanmamıştır (190). Ülkemizde KAE etkeni olan *Candida* türlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Amfoterisin B'ye karşı genel direnç oranı %2 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada *C. albicans* izolatlarının üç tanesinde (%3), NAC türleri arasında ise *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* izolatlarının birer tanesinde (%0,5) direnç gözlenmiştir (170). Çalışmamızda ise izolatlar genel olarak amfoterisin B'ye duyarlı (%97) olarak saptanmış ve izolatların %3'ünde amfoterisin B direnci (n=4) tespit edilerek uluslararası ve Türkiye verileriyle uyumlu sonuç alınmıştır. Diğer raporlara benzer olarak dirençli izolatların %75'i *C. albicans* %25'i *C. parapsilosis* olmuştur. Merkezimizde amfoterisin B'ye en duyarlı tür *C. glabrata* olmuştur (tamamı duyarlı). Bu türün ardından %97,2 duyarlılık oranı ile *C. parapsilosis* gelmiş ve en düşük duyarlılığa sahip tür *C. albicans* (%93,9) olmuştur (Şekil 6.3). Diğer servislerde amfoterisin B direnci YBÜ'ye göre az da olsa yüksek saptanmış ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (p=0,120) (Tablo 6.11 ve Şekil 6.14).

Literatürdeki raporlarda KAE etkeni *Candida* türleri arasında flusitozine karşı değişen oranlarda direnç bildirilmektedir. Etiz ve ark. (170) *Candida* KAE izolatlarında en düşük direnç oranını (%0,4) flusitozin için saptamıştır, sadece bir *C. tropicalis* izolatında flusitozin direnci saptamışlardır. Öztürk ve ark. (204) *Candida* KAE izolatlarında, bir *C. glabrata* izolatında (%3) flusitozin direnci gözlemlemiş, diğer *Candida* türlerini flusitozine duyarlı bulmuşlardır. Başka bir çalışmada da benzer şekilde flusitozine artmış temasta duyarlı bir *C. glabrata* izolatı tespit edilmiştir (205). YBÜ'de gerçekleştirilen bir çalışmada ise *Candida* türlerinde %20 gibi yüksek bir oranda flusitozin direnci tespit edilmiştir (206). Çalışmamızda VITEK 2 yöntemi ile gerçekleştirilen AFDT'de *Candida* izolatlarının flusitozine yüksek duyarlılık (%99,3) sergilediği saptanmıştır (Tablo 6.13). Sadece Anesteziyoloji ve Reanimasyon YBÜ kaynaklı

bir *C. albicans* izolatında direnç saptanmıştır (MİK >16 µg/ml). Bu veriler ülkemizde daha önce KAE izolatlarında gerçekleştirilen çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

EUCAST'ın önerdiği referans sıvı mikrodilüsyon yönteminin en önemli dezavantajları, yöntemin zaman alıcı ve emek yoğun olmasıdır, bu sebeple rutin mikrobiyolojik raporlama için günümüzde AFDT'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını amaçlayan, kullanıma hazır ticari sistem ve kitler geliştirilmektedir. Bu yöntemler arasında VITEK 2 Antifungal Duyarlılık Sistemi (BioMérieux, Fransa, AST-YS08) yaygın olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen bu yöntemin, referans yöntemle uyumu ise hala araştırılmaktadır. Herhangi bir ticari duyarlılık yönteminin uygulanması için, 1) sonuçların laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin olması, 2) duyarlı ve dirençli izolatları tutarlı bir şekilde ayırt etme yeteneğinin olması ve 3) MİK'lerin ve kalite kontrol aralıklarının referans testinkilere karşılık gelmesi gerekmektedir. Bu kriterlerin karşılanmaması, yanlış dirençli (büyük hata, BH) ve yanlış duyarlı (çok büyük hata, ÇBH) gibi hata sınıflandırmalarına yol açmaktadır (11). Bu sebeple yeni ortaya çıkan bu ticari sistemlerin referans yöntemlerle karşılaştırıldığı çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır.

Birçok laboratuvar, performans kolaylığı, ekonomik olması veya daha hızlı sonuç vermesi gibi belirli avantajları olan ticari sistemleri kullanmayı günümüzde tercih etmektedir. VITEK 2 antifungal duyarlılık sistemi, maya üremesini spektrofotometrik olarak belirleyen ve hem mantar tanımlamasına hem de MİK belirlemesine aynı anda izin veren tam otomatize bir ticari yöntemdir. Bu sistem için önceden belirlenmiş konsantrasyon aralıklarında bir dizi antifungal ilaç (amfoterisin B, flusitozin, kaspofungin, mikafungin, flukonazol ve vorikonazol) yer alan antifungal duyarlılık kartı (AST-YS08) mevcuttur. AST kartına dilüsyon ve inokülasyon, spektrofotometrik son nokta okuma ve raporlama, kullanıcı müdahalesine gerek olmadan otomatize olarak gerçekleştirilir ve bu da manuel MİK belirlemenin olası dezavantajlarını ortadan kaldırmaktadır. Bu otomasyon, hızlı sonuç süresi ile (sonuçlar genellikle 12-15 saat içinde elde edilir) büyük tanı laboratuvarlarında, özellikle özel mikoloji alt yapısı olmayanlar için ideal hale gelmektedir. Bu veriler ışığında FDA, 2006 yılında bu sistemin flukonazol direncini tespit etmek için klinik kullanımını onaylamıştır (207).

VITEK 2 yöntemini değerlendiren çalışmalarda hem CLSI hem de EUCAST referans metodolojileri ile EA genel olarak yaklaşık >%95'tir (8). Çok merkezli bir çalışmada CLSI sıvı mikrodilüsyon metodolojisi ile karşılaştırıldığında amfoterisin B, flusitozin ve vorikonazol için EU değerleri sırasıyla %99,1, %99,1 ve %96,7 olarak bildirilmiştir (207). Kaspofungin,

mikafungin ve posakonazol için EU değerleri ise sırasıyla %99,5, %98,6 ve %95,6 olarak bildirilmiştir (208). Başka bir çalışmada VITEK 2 sistemi ile referans prosedürler (CLSI, EUCAST) karşılaştırıldığında, flukonazol ve vorikonazol için ortalama EU >%95, ÇBH yüzdeleri VITEK 2 ile EUCAST arasında %2,6 ve VITEK 2 ile CLSI tekniği arasında %1,6 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada flukonazol için EUCAST yöntemi ile EU %96,6, ÇBH sekiz izolatta (%2,6), kH 23 izolatta; vorikonazol için EU %97,5, kH 10 izolatta saptanmış olup ÇBH rapor edilmemiştir (8). Genel olarak minör hatalar tespit edilmiş olan bu çalışmada ÇBH yüzdesi %3'ten düşük olup kabul edilebilir düzeydedir, EU yüzdesi ise yüksek oranda saptanarak sıvı mikrodilüsyona alternatif bir yöntem olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda 134 izolatın VITEK 2 ile flukonazol EU yüzdesi %88,5, KU %91,8 şeklinde tespit edilerek referans yöntem ile kategorik açıdan iyi bir uyum yakalanmışken EU literatür verilerinden düşük saptanmış ve FDA kriterlerine göre sınır olan %90'ın biraz altında kalmıştır. ÇBH oranı flukonazol için %4,35 (iki izolatta) (%95 güven aralığı; %0-%10,29) olup bu çalışmaya göre biraz yüksek bulunmuyor ve bu değerle belirtilen kabul edilebilirlik kriterlerine uymamaktadır (ÇBH oranının %95 güven aralığında %7,5'in altında olması). Çalışmamız sonucunda bu çalışmalarda olduğu gibi BH saptanmamıştır (Tablo 6.13).

Bu sistemin antifungal performansı açısından veriler sunan başka bir çalışmada CLSI M27 mikrodilüsyon referans yöntemi ile VITEK 2 otomatize sistemi flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve anidulafungin antifungalleri kıyaslanarak değerlendirilmiştir. VITEK 2 sisteminde anidulafungin bulunmadığından CLSI ile elde edilen anidulafungin sonuçları mikafungin ile sadece KU açısından karşılaştırılmıştır. KU değerlendirilmesinde CLSI klinik sınır değerleri; mevcut olmadığında ise ECOFF değerleri kullanılan bu çalışmada 140 KAE etkeni *Candida* izolatu değerlendirilmiştir. Genel olarak azol grubu ilaçlar için VITEK 2 ile elde edilen MİK değerleri, 24. saatte okunan CLSI MİK'lerinden bir kat daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise farklı olarak flukonazol için EUCAST MİK değerleri VITEK 2 MİK değerlerinden genel olarak daha yüksek saptanmıştır. Cilo ve ark. (209) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, iki yöntem arasındaki EU, amfoterisin B ve vorikonazol için >%90 iken, flukonazol için %85'te kalmıştır. Bizim çalışmamızda da EU flukonazol için %88,5 şeklinde bu çalışma ile benzer bulunmuşken, vorikonazol için EU %75 olarak belirlenmiş ve bu çalışmadan düşük saptanmıştır. Cilo ve ark. (209) genel olarak kategorik uyumu en iyi amfoterisin B (%99,3) ile, en düşük olarak ise vorikonazol (%85,7) ile elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda en yüksek KU mikafunginde (%95,9) izlenirken en düşük KU flukonazolde (%91,8) bulunmuş, genel KU sonucumuz bu çalışmaya göre yüksek saptanmıştır. Cilo ve ark.'nın (209) çalışmasında hata oranı çok yüksek olmamakla birlikte CLSI yöntemi ile

flukonazole dirençli bir *C. parapsilosis* ve bir *C. glabrata* suşu VITEK 2 ile duyarlı bulunmuştur. Birer *C. parapsilosis* suşunda amfoterisin B (%0,7) ve flukonazolde (%0,7) ÇBH görülmüştür. Referans yöntemle flukonazole dirençli olduğu tespit edilen bir *C. glabrata* izolatında VITEK 2 ile direnç saptanmamıştır. Azol ilaçlarda BH ve kH oranları amfoterisin B ve anidulafungin/mikafungine göre daha yüksek olarak saptanmıştır (209). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmanın aksine ÇBH mikafungin ve amfoterisin B için saptanmamış, flukonazol için %4,35 (iki izolatta), vorikonazol için %7,89 (üç izolatta) olarak belirlenmiştir. Cilo ve ark.'nın sonucuna benzer şekilde çalışmamızda flukonazol için ÇBH *C. parapsilosis* ve *C. albicans* olmak üzere iki izolatta saptanmış, (4 ve 11 numaralı izolatlar) *C. glabrata*'da bulunmamıştır. Sadece bir tane *C. albicans* izolatında yanlış duyarlı (ÇBH) saptanmasına rağmen ÇBH oranının *C. albicans* türünde %33 şeklinde yüksek çıkması *C. albicans* izolatlarının hem toplam sayısının az olması hem de duyarlılığının oldukça yüksek saptanıp paydadaki dirençli izolat sayısının düşük olmasına bağlanmıştır (VITEK 2 ile yanlış duyarlı/Referans yöntem ile dirençli). *C. parapsilosis*'te flukonazol için ÇBH oranı çalışmamızda %2,5'tir ve bir izolatta saptanmıştır. Vorikonazol için ÇBH üç *C. parapsilosis* izolatında (%8,1) saptanmış olup diğer *Candida* türlerinde vorikonazol için ÇBH bulunmamıştır. BH oranımız ise vorikonazolde %3'ün altındadır ve FDA kriterlerini sağlamaktadır (ME: %2,1, iki izolatta). BH oranı mikafungin için %4,6 olarak bulunmuş ve kriterin üst sınırının biraz üzerinde kalmıştır. Amfoterisin B için BH %7,7 (10 izolatta) olarak belirlenmiş ve literatüre göre yüksek saptanmıştır. kH ise sadece azol sınıfı ilaçlarda görülmüş, mikafungin ve amfoterisin B'de saptanmamıştır (Tablo 6.13).

CLSI ve VITEK 2 antifungal duyarlılık yöntemleri arasındaki uyumun değerlendirildiği başka bir çalışmada EU flukonazol için >%94 ve amfoterisin B için >%99 olarak saptanmış ve bizim çalışmamıza kıyasla daha olumlu sonuçlar alınmıştır (210). Toplamda 292 *Candida* izolatının değerlendirildiği Lim ve ark. (211) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 28 *C. albicans*, 57 *C. parapsilosis*, 24 *C. tropicalis* ve 183 *C. glabrata* izolatı test edilmiştir. CLSI klinik sınır değerleri kullanılarak elde edilen VITEK 2 sonuçları flukonazol için şu şekildedir; KU %92,4 (*C. albicans*), %96,5 (*C. parapsilosis*) ve %87,0 (*C. tropicalis*). VITEK 2'nin flukonazol ile ilgili kH oranını %13 saptamışlar ve bu hataları 10 flukonazol dirençli izolattan üçünün artmış temasta duyarlı olarak yanlış sınıflandırıldığı *C. tropicalis* izolatında gözlemişlerdir. Bu durum VITEK 2 flukonazol testinden elde edilen artmış temasta duyarlı sonuçlarının dikkatli bir şekilde yorumlanması gerektiğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da VITEK 2 flukonazol sonuçları değerlendirildiğinde, *C. albicans* için %95,9 KU ile bu çalışmadan daha yüksek bir uyum izlenirken, *C. parapsilosis* için %84,2 olarak

belirlenerek bu çalışmadan daha düşük bir sonuç alınmıştır. (Tablo 6.13). Lim ve ark. (211) *C. glabrata* vorikonazol sonuçları için WT'yi mutant izolatlardan ayıran hem önceki hem de yeni CLSI ECOFF değerlerini (sırasıyla 0,5 ve 0,25 µg/ml) kullanarak değerlendirmiş, bu şekilde KU değeri eski ECOFF değeri ile %97,8 uyumlu bulunurken yeni sınır değer kullanıldığında bu oran %82,4'e düşmüştür. Bu bulgular, VITEK 2 vorikonazol testinin 0,5 µg/ml ECOFF ile kullanılmasının, klinik laboratuvarlar için WT ile mutantları ayırmada güvenilir bir sınır sağlayabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da *C. glabrata*'da VITEK 2 vorikonazol için 1 µg/ml ECOFF değeri kullanıldığında EUCAST yöntemi ile %100 KU yakalanmıştır (izolatların biri non-WT, diğerleri WT olarak belirlenmiştir). Lim ve ark. (211) VITEK 2 ile *C. glabrata* için mikafungin testinde %1,1 ÇBH ve %6,5 kH göstermiştir. Bizim çalışmamızda mikafungin için VITEK 2'nin ≤0,06 µg/ml MİK değeri sonucu vermesi ancak hem klinik sınır değerinin hem de ECOFF değerinin *C. glabrata* izolatlarında 0,03 µg/ml olması nedeniyle KU, ÇBH, BH ve kH değerlendirilememiştir. *C. glabrata*'nın tümünün VITEK 2 mikafungin MİK değeri ≤0,06 µg/ml'dir ve EUCAST sonucu da bu aralığa girmektedir. Eğer bu uyum EU olarak kabul edilirse EU %100 olarak saptanabilmektedir.

Çalışmamızda EUCAST sıvı mikrodilüsyon testi referans alınarak VITEK 2 yöntemi değerlendirilmiştir ve sonuçları Tablo 6.13'te verilmiştir. Flukonazol için tüm izolatlarda EU %88,5 ve vorikonazol için %75 olarak belirlenmiş ve azoller için %90'ın altında EU saptanarak FDA kriterleri sağlanamamıştır. Mikafungin EU oranı ise %83,3 saptanmıştır. En iyi EU amfoterisin B için (%91,7) tespit edilmiştir. Tür düzeyinde incelendiğinde *C. parapsilosis*'te en iyi EU mikafunginde (%92,6) daha sonra sırasıyla amfoterisin B (%91,1), flukonazol (%84,4) ve vorikonazolde (%73,7) tespit edilmiştir. *C. albicans*'ta EU sıralaması flukonazolde (%97,9) Amfoterisin B'den (%90,8) daha yüksek olup %90'dan yüksek değer saptanmıştır. Vorikonazol EU yüzdesi izolatların neredeyse tamamında MİK sonuçlarının VITEK 2 ile ≤0,125 µg/ml ve EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ≤ 0,015 µg/ml şeklinde sonuçlanması nedeniyle hesaplanamamıştır. *C. albicans* izolatlarının mikafungin klinik sınır değeri (MİK=0,016 µg/ml) VITEK 2 MİK değerinin (≤0,06 µg/ml) altında kaldığı için EU belirlenememiştir. *C. glabrata*'da ise EU sıralaması vorikonazol (%100) >flukonazol (%96,4) > amfoterisin B (%95,4) şeklinde olup referans yöntemle iyi bir EU sergilemiştir. *C. glabrata* izolatlarının klinik sınır değeri (0,03 µg/ml) VITEK 2 MİK değerinin (≤0,06 µg/ml) altında kaldığı için EA belirlenememiştir.

VITEK 2 sistemi ile sıvı mikrodilüsyon arasındaki genel KU, kaspofungin için %99,8, mikafungin için %98,2 olarak saptanarak bu sistemin *Candida* türleri arasında kaspofungin ve

mikafungin MİK'lerini güvenilir bir şekilde saptadığı belirlenmiştir (208). Bizim çalışmamızda da tüm izolatlarda mikafungin için KU %95 olarak belirlenmiş ve bu çalışma ile benzer sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada *C. albicans*'ta mikafungin için EU >%99, KU %99,8, ÇBH %0,2, BH %0 olarak saptanmıştır (208). Mikafungin için *C. glabrata* sonuçları EU %98,9, KU % 84,1, ÇBH %15,9, BH %0 olarak; *C. parapsilosis* sonuçları EU %93,9, KU %100, ÇBH %0, BH %0 olarak; *C. tropicalis* sonuçları ise EU %100, KU %98,9, ÇBH %1,1, BH %0 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda *C. albicans* mikafungin VITEK 2 sonucu $\leq 0,06$ µg/ml olup klinik sınır değerinin ve ECOFF değerinin 0,016 µg/ml olması nedeniyle duyarlılık kategorisi sonucu verilemediğinden EU, KU, ÇBH, BH ve kH hesaplanamamıştır. Çalışmamızda *C. parapsilosis* VITEK 2 mikafungin sonucu %92,6 EU, %98,2 KU saptanarak bu çalışmaya benzer sonuç alınmıştır.

Çalışmamızda VITEK 2 antifungal duyarlılık testi sonuçları Tablo 6.12'de, MİK değerlerinin EUCAST ile karşılaştırma sonucunda elde edilen veriler ise Tablo 6.13'te özetlenmiştir. Bu çalışma ile VITEK 2 sisteminin, maya türlerinde KU'nun EU'ya göre daha iyi olduğu saptanmıştır (özellikle *C. parapsilosis*'te). Esansiyel uyumsuzluğun kategorik uyuma yansımaması çalışmamızda dikkat çeken noktalardandır.

Çalışmamızla VITEK 2 yönteminin klinik laboratuvarlar için CLSI veya EUCAST tarafından geliştirilen prosedürlerden daha hızlı ve daha kolay bir alternatif olduğu gösterilmiştir. Örnek yükü fazla olan büyük laboratuvarlarda bu özellikleri ile tercih edilebilmektedir. VITEK 2 kolay uygulanabilir, hızlı sonuç verebilen, aynı zamanda tanımlama yapabilen tam otomatize bir yöntemdir. Referans yöntemlerle EU ve KU oranı yüksek ve CLSI/EUCAST sınır değerleri ile sonuç verebilmesi gibi avantajlara sahipken, yeni sınır değerlerin kullanılması ile dilüsyon aralıklarının alt sınırı, bazı türler için tanımlanan ECOFF sınırının üzerinde olması gibi dezavantajlara sahip bir yöntemdir. Ayrıca *C. glabrata* türleri için çalışma aralığı dirençli kökenleri tanımlamada yetersiz (ECOFF 0,03 µg/ml) olması nedeniyle sonuç vermede zorluklar yaşanabilmektedir. *C. glabrata* gibi azollere dirençli olabilen kökenler için VITEK 2 konsantrasyon aralıklarının düzenlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

C. parapsilosis enfeksiyonu hastanede yatan hastalar arasında giderek daha fazla rapor edilmektedir ve özellikle ABD, İspanya, İtalya ve Latin Amerika'nın birçok ülkesinde bu türün kandidemiye neden olan en yaygın NAC türü olduğu saptanmıştır (212-215) (159, 216, 217). SENTRY Programında nozokomiyal KAE'li hastalardan izole edilen *Candida* türleri incelendiğinde *C. parapsilosis*'in en sık görülen nozokomiyal patojen olduğu bildirilmiştir. *C.*

parapsilosis mukozal yüzeylerden ziyade ciltte bulunabilen eksojen bir patojendir. Kateterler ve diğer implante cihazlar üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği, ellerle taşıma yoluyla nozokomiyal yayılımı ve hastane ortamında kalıcılığı ile ünlüdür. Ayrıca bebeklerde ve yenidoğanlarda enfeksiyonlara neden olduğu da iyi bilinmektedir. *C. parapsilosis* kaynaklı kandidemiler, kateter bakımı ve enfeksiyon kontrol prosedürlerinde yapılacak iyileştirmelerle önlenabilir hastalıklar olması yönüyle de önem taşımaktadır (2). Azoller ve ekinokandinler *C. parapsilosis* KAE'nin tedavisinde ilk kullanılan ilaçlardır. Ekinokandinlere karşı bu türün MİK değerlerinin yüksek olması tedavide endişelere sebep olsa da klinik tedavide başarısızlık yaşandığına dair vakalar raporlanmamıştır (37, 158, 183). Ancak son raporlar bu tür içerisinde artan azol direncine dikkat çekerek bu durumun klinik kaygıya sebep olabileceğini düşündürmektedir (218). Arastehfar ve ark. (219) tarafından Türkiye'de yapılan bir çalışmada, tedavi veya profilaksi için flukonazol kullanımında 3 kat artışın belgelendiği 2015 yılından sonra *C. parapsilosis*'te flukonazol direncinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum flukonazole maruz kalmanın ardından *C. parapsilosis*'te hızlı bir şekilde azol direncinin meydana geldiği başka çalışmalarda da gösterilmiştir (220). Konuyu aydınlatmak amacıyla *Candida* izolatlarında antifungal direnç mekanizmasının tanımlanmasında, moleküler yöntemlerin birçoğundan (PZR, RFLP, RAPD, sekans analizi) yararlanılmıştır. Azol direncinin moleküler mekanizmaları üzerine yayınlanmış çalışmalar şimdiye kadar çoğunlukla *C. albicans*'a odaklanmıştır. *C. albicans*'ta kazanılmış azol direncinin altında üç ana mekanizma yatmaktadır: Bunlar; (i) membran lipitleri ve sterollerindeki değişikliklere bağlı olarak ilaç penetrasyonunun olmamasından kaynaklanabilecek ilacın hücre içinde biriktirilememesi veya özellikle *cdr1*, *cdr2* ve *mdr1* genlerinin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan aktif ilaç akışı (ii) azol hedef enziminin artan üretimi veya (iii) hedef enzimi kodlayan gendeki (*erg11*) nokta mutasyonları ile ilacın hedefine afinitesinin azaltılması. DAP'nin aşırı ekspresyonu ve buna bağlı olarak artan aktivitenin, çeşitli azollere çapraz direnç kazandıran, azol direncinin en önemli mekanizması olduğu düşünülmektedir. Özellikle *mrr1* geninde gelişen mutasyon sonucunda flukonazol ve vorikonazole çapraz direncin oluşabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (221).

Bu mekanizmaların *C. parapsilosis* de dâhil olmak üzere NAC türleri için de geçerli olup olmadığı hala açık değildir ve konuyla ilgili ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarla *C. parapsilosis*'te azollere karşı direnç gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların *C. albicans* için olanlar ile benzer olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarla, en yaygın mekanizmalar arasında *erg11* genindeki mutasyonlar ile bu genin aşırı ekspresyonu ve DAP'nin ekspresyonunun artması belirlenmiştir. *erg11* geninde Y132F aminoasit değişikliğine neden olan nokta mutasyonu (A395T), enzimde ilacın

bağlandığı bölgeyi değiştirerek direnç gelişimine neden olmaktadır. Son mekanizma olarak DAP'yi kodlayan *cdr* ve *mdr* genlerinin ve/veya bu genlerin aktivitesini düzenleyen transkripsiyon faktörü olan *mrr1*, *upc2* ve *tac1* gibi genlerde oluşan nokta mutasyonların neden olduğu bu transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu sonucunda DAP'nin ekspresyonunun artması azol direnci ile ilişkili olarak saptanmıştır (31, 35, 37). Ancak *C. parapsilosis*'te azol direncinin mekanizmalarına ilişkin hala çok az veri bulunmaktadır. Literatürde *erg11* ve *mrr1* üzerine yoğunlaşılması nedeniyle bu konuya katkı sağlamak için biz de merkezimizdeki *C. parapsilosis* KAE izolatlarının bu iki geni üzerinde çalışmalar yaptık.

erg11 genindeki A395T (Y132F) mutasyonu ile enzimin katalitik bölgesi etkilenerek flukonazolün etkisi azalmakta ve MİK değerleri yükselmektedir. Raporlarda *erg11* genindeki A395T (Y132F) mutasyonunun *C. parapsilosis*'deki azol direnci ile güçlü ilişkisi göz önüne alındığında, *C. parapsilosis* için azol direncinin belirlenmesinde hızlı ve ucuz bir tarama testi olarak çalışmamızda literatürde yer alan iki farklı MAS PZR protokolü ile bu mutasyonun varlığını araştırdık. Her iki MAS PZR protokolü de birbirleriyle aynı sonuçları vermiş olup yöntemler arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. İki yöntemde de tüm *C. parapsilosis* izolatlarının %61,4'ünde (n=35) A395T mutasyonu olduğu saptanmıştır. Azollere dirençli olduğu belirlenen 41 izolatın %80,5'inde (n=33) bu mutasyon tespit edilirken, dirençli izolatlardan biri (29 numaralı örnek) MAS PZR-2 amplifikasyonu sonrası bu mutasyon için heterozigot mutant olarak belirlenmiştir. MAS PZR-2 yöntemi heterozigot mutasyon taşıyan izolatları saptama yönünden daha kullanışlı olabilir. Azol direnci olan ve *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu saptanmayan iki izolatta (116 ve 134 numaralı izolatlar) *mrr1* geninde de mutasyon saptanmamış ve bu izolatlarda dirençten *erg11* ve *mrr1* dışında başka faktörlerin rol oynayabileceği düşünülmüştür. Azol direnci olan ve *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu olmayan altı izolatta ise (2, 24, 30, 51, 65, 87 numaralı izolatlar) *mrr1* geninde G2779T (G927C) mutasyonu bulunmaktadır. Bu altı izolatta azol direncinden sorumlu mekanizma yüksek ihtimalle *mrr1* G2779T (G927C) mutasyonu sonucunda meydana gelen aminoasit değişikliğidir. *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu barındıran dokuz izolatta ise aynı zamanda *mrr1* geninde G1214A (R405K) mutasyonu bulunmaktadır. Bu dokuz izolatta dirençten hem enzimin hedefi hem de DAP'ın ekspresyonunun artışı sorumlu olabilir. Ancak çalışmamızda MDR pompa ekspresyonunun analizinin yapılmaması çalışmamızın eksik yönlerindendir.

Duyarlı izolatlarda da A395T mutasyonu tespit edilmiş olup 16 azol duyarlı *C. parapsilosis*'in iki tanesinde (%12,5'inde) (14 ve 19 numaralı izolatlar) mutasyon saptanmıştır.

Duyarlı izolatlarda da mutasyon tespit edilmiş olması özellikle bu izolatlarda flukonazol kullanımı sonrası direncin gelişebilme ihtimalinden dolayı tedavi seçiminde dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

2016-2017 yılları arasında dünya çapında 25 ülkede bulunan 60 hastaneden toplanan flukonazole duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarının değerlendirildiği bir çalışmada, çoğu izolatın tek başına veya diğer direnç mekanizmalarıyla birlikte *erg11*'de A395T (Y132F) mutasyonu taşıdığı saptanmıştır (189). Bu değişikliği içeren izolatlar İtalya, Fransa, Kore ve ABD'de de tespit edilmiştir (138). Benzer bulgular eşzamanlı olarak veya daha sonra İtalya, Brezilya, Meksika, Yunanistan, İspanya ve Türkiye'de de rapor edilmiştir (158, 219, 222-227). Bazı çalışmalarda azol dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının tamamında Y132F değişikliği tespit edilmiştir (222, 228). *C. parapsilosis* Y132F izolatlarının ortaya çıkmasının kesin nedeni henüz tanımlanmamıştır (229); seçici ilaç baskısı ile ilişkili olabileceği veya bu aminoasit değişikliğinin *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* için de azol direncinde rol oynadığının gösterilmesi nedeniyle 132. pozisyonundaki mutasyonun, azol hedefini kodlayan bir gen olan *erg11*'deki sıcak bir nokta olabileceği düşünülmektedir (228). Alternatif olarak, *C. parapsilosis* Y132F izolatının ortaya çıkışının ekzojen klonal aktarımla ilişkili olabileceği de belirtilmektedir (136).

Çalışmamızda değerlendirilen MAS PZR 1 *erg11*'deki Y132F mutasyonunun tespiti için Asadzadeh ve ark. (137) tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Asadzadeh ve ark. bu yöntem ile tespit edilen A395T mutasyonunu *erg11* kodon 132 dizi analizi sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde tespit etmiştir. MAS PZR 1, Y132F mutasyonu içeren flukonazole dirençli beş izolatın hepsinde 323 ve 231 bç'lik iki amplikon veren *erg11* kodon 132'de TTC dizisi tespit etmiştir (A395T mutasyonu pozitif). Duyarlılığı ve özgüllüğü, bu çalışmada tanımlanan 30 ek flukonazole duyarlı *C. parapsilosis* izolatı kullanılarak daha fazla çalışılmış ve 30 flukonazole duyarlı izolatın tamamında *erg11* kodon 132'deki WT diziyi (Y132) doğru bir şekilde tespit etmiştir. MAS PZR-1 yönteminde tek bir reaksiyonda daha kolay ve hızlı şekilde Y132F varlığının gözlenmesi bu yöntemin MAS PZR-2 yöntemine göre avantajlı olduğu bir noktadır; ancak, zayıf bant yoğunluğu sebebiyle yorumlanması daha zor olduğundan çalışmamızda tekrar çalışılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Y132F tespit primeri *erg11* WT dizisine göre yalnızca tek bir uyumsuzluk içerdiğinden yanlış pozitif reaksiyonlara sebep olabileceği düşünülmektedir.

MAS PZR-2 yönteminde ise *C. parapsilosis* izolatlarında *erg11* geninde Y132F değişikliğinin hızlı tespiti için bir PZR testi geliştiren yazarlar, 2018'den 2021'e kadar

uluslararası şekilde toplanan tüm flukonazole duyarlı olmayan *C. parapsilosis* izolatlarını bu yaygın flukonazol direnç mekanizmasının varlığı açısından taramak için kullanmışlardır (138). Hubler ve ark. (138) tarafından geliştirilen bu yöntem *erg11* Y132F değişikliğini taşıdığı bilinen 37 *C. parapsilosis* izolatının tümünü tanımlamıştır. Test, dizi analizi ile her alelin bir kopyasını taşıdığı belirlenen duyarlı olmayan izolatta hem *erg11* Y132F hem de WT aleli (6/6) başarıyla tanımlamıştır. Buna ek olarak, sekiz flukonazole duyarlı olmayan ve 10 flukonazole duyarlı WT *erg11* genotipine sahip olduğu bilinen 18 izolatın tümünde WT *erg11* alelini tanımlamıştır. Çalışma sonucunda bu testin %100 duyarlılık ve özgüllük gösterdiği saptanmıştır. Bu yöntemi 2018'den 2021'e kadar flukonazole duyarlı olmayan 125 *C. parapsilosis* izolatının tümüne uygulayarak izolatların %83,2'sinde (104/125) *erg11*'de Y132F değişikliği PZR ile gösterilmiştir. Bu değişiklik, çalışmaya katılan 12 ülkenin altısından gelen izolatlarda gözlenmiştir. En yüksek *erg11* Y132F oranları Türkiye (8/8 izolat, %100), İsrail (7/7 izolat, %100), İspanya (6/6 izolat, %100), İtalya (63/66 izolat, %95,4), Yunanistan (6/7 izolat, %85,7) dahil olmak üzere Avrupa izolatları arasında gözlenmiştir. ABD'den gelen izolatların ise %60,9'unda (14/23 izolat) *erg11* Y132F varlığı kaydedilmiştir. Y132F *erg11* değişikliği taşıyan izolatlar Asya Pasifik veya Latin Amerika'da tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda da MAS PZR-2 yöntemi ile gerçekleştirilen amplifikasyon ile izolatların %57,9'unda, dirençli izolatların ise %80,5'inde (33/41) bu mutasyon tespit edilerek literatür verileri ile uyumlu bir sonuç bulunmuştur. Azol dirençli bir izolatta (29 numaralı izolat) ise bu çalışmaya benzer şekilde hem *erg11* Y132F hem de WT alleli başarıyla tanımlanarak heterozigot mutasyon varlığı saptanmıştır. WT allel taşıyanlarda bu yöntemin *erg11* Y132F alelini de yakalayabilme yeteneği MAS PZR-1 yöntemine göre avantajıdır. Bu yöntemde mutasyonu tespit etmeye yönelik hem WT hem de Y132F forward primeri ana diziden iki farklı nükleotid içermektedir. Primerler, karşılık gelen allel mevcut değilse 3' ucunda iki yanlış eşleşme verecek şekilde tasarlanmıştır ve bu şekilde polimerazın uzamasını inhibe ederek yanlış pozitiflikler önlenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu yöntem ile izolatlarda Y132F varlığı bantların daha net ve yoğun oluşmasından dolayı reaksiyon tekrarına gerek kalmadan kolay ve daha az malzeme harcayacak bir şekilde tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu yöntemde WT primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyonda mutasyon taşımayan izolatlarda yaklaşık 600 bp uzunluğunda non-spesifik bir bant oluşmuştur ancak bu bant mutasyon tanımlamasını etkilememiştir. Bu yöntemin iki reaksiyonda gerçekleştirilmesi ise diğer yönteme göre en önemli dezavantajıdır.

Çalışmalarda *erg11* Y132F değişikliği varlığının vorikonazol için çapraz dirence yol açarak duyarlılık oranlarını daha da düşürdüğü saptanmıştır. *erg11* Y132F açısından WT

izolatlar vorikonazole %36 duyarlı, Y132F mutasyonu olanlar ise %29,8 duyarlı bulunmuştur (138). Bizim çalışmamızda ise *erg11* Y132F mutasyonu taşımayan izolatların flukonazole duyarlılığı %63,8 ve vorikonazole duyarlılığı %68,2 iken Y132F mutasyonu olanlar flukonazole ve vorikonazole %5,7 oranında duyarlı saptanmış ve bu mutasyon varlığının istatistiksel olarak vorikonazol ve flukonazol duyarlılığını azalttığı gözlenmiştir (Tablo 6.21). Ayrıca çalışmamızda vorikonazol, itrakonazol, anidulafungin, mikafungin ve amfoterisin B'ye duyarlı kategoriye sahip izolatların yüzdesi bu izolatların flukonazol duyarlılığına veya *erg11* değişikliğinin varlığına bakılmaksızın benzer olarak saptanmıştır. Çalışmamızda flukonazole duyarlı olmayan ve *erg11* Y132F açısından WT izolatların vorikonazole duyarlılık oranı %12,5 iken; Y132F mutasyonu olanların tamamı vorikonazole dirençli bulunmuştur (Tablo 6.22).

Grossman ve ark. (136) da vorikonazole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının tamamının (6/6) flukonazole dirençli ve *erg11* geninde A395T mutasyonu içerdiğini ayrıca, bu mutasyon homozigot olduğunda heterozigota kıyasla vorikonazol MİK değerlerinin dağılımlarının önemli ölçüde farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p < 0,0005$). Bizim çalışmamızda da bu bulgulara benzer şekilde vorikonazole dirençli izolatların neredeyse tamamının flukonazole de dirençli (36/37, bir izolat flukonazole artmış temasta duyarlı) olduğu ve %86,5'inin (32/37) *erg11* geninde A395T mutasyonu içerdiği saptanmıştır.

Çalışmalarda Y132F değişikliğine sahip flukonazol dirençli klinik izolatların klonal yayılımının oldukça yüksek oranlarda olduğu raporlanmıştır (222, 229). Bu nedenle, hızlı bir moleküler test aracılığıyla rutin olarak bir KAE etkeni olan *C. parapsilosis* üretildiğinde Y132F mutasyonunu tespit etmek, hastane veya klinik ortamlarda klonal *C. parapsilosis* izolatlarını tanımlamak ve sonuçta KAE riski taşıyan hastalar arasında bulaşmalarını önlemek için cazip bir yol olabilir. Bu amaçla A395T mutasyonuna ilişkin tarama yapmak için her iki MAS PZR yönteminin de benzer sonuçlara sahip olması nedeniyle klinik ortamlarda rutin çalışmalara uygun olarak belirlenmiştir.

İlacı taşıyan DAP'nın aşırı ekspresyonu: *cdr1/cdr2* ve *mdr1* yoluyla genlerin upregülasyonunu ve transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlar sonucunda (*tac1* ve *mrr1* yoluyla genlerin ekspresyonunun artması sonucunda) özellikle diğer azollerle de çapraz dirençle sonuçlanan flukonazol direnci oluşmaktadır. Flukonazol ve vorikonazolün *C. parapsilosis*'te çapraz dirence neden olması, altta yatan direnç mekanizmaların benzer olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, flukonazol ve vorikonazole dirençli suşların transkripsiyonel profillerinin karşılaştırılmasıyla desteklenmiş ve direnç kazanımıyla ilişkili iki genin aşırı

eksprese edildiği görülmüştür: *mdr1* ve bunun düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü *mrr1*. İn vitro-indüklenmiş dirence sahip izolatların kullanıldığı bu çalışmada yazarlar, bir ilaç DAP'ı olan MDR1'in, duyarlı atasına kıyasla indüklenmiş flukonazol direncine sahip bir izolatta 19 kat arttığını bulmuşlardır. Bu durum, MDR1 pompası için bir transkripsiyon faktörü olan *mrr1* genindeki fonksiyon kazanımına yol açan nokta mutasyonuna bağlanmıştır. Flukonazol ve vorikonazole dirençli suşların *mrr1* genlerinde iki farklı missens mutasyon (G1747A ve A2619C) tespit edilmiş ve bu mutasyonlar Mrr1 polipeptit zincirinde sırasıyla glisinden arjinine (G583R) ve lizinden asparajine (K873N) değişikliklere yol açmıştır. Bu mutasyonların *mrr1* geninde işlev kazandıran mutasyon olduğu belirtilmiştir (221). Yine aynı ekip tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada vorikonazole dirençli bir izolatta *mrr1* dizi analizi yapılmış ve glutaminden proline (Q1064P) değişime neden olan A3191C mutasyonu tespit edilmiş ancak bu mutasyonun dirence etkisinin olmadığı belirtilmiştir (230).

Farklı flukonazol MİK değerlerine sahip 122 *C. parapsilosis* klinik izolatının *mrr1* geni için gerçekleştirilen dizi analizi sonrası izolatların %18,9'unda (n=23) *mrr1* geninde SNP varlığını saptayan bir çalışmada SNP'lerin MDR1 pompasının ekspresyonunu artırıp artırmadığını belirlemek için gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) gerçekleştirmiş ve iki *mrr1* polimorfizminin, [G53A ve C1856T (A619V)], yalnızca duyarlı olmayan izolatlarda izlendiği saptanmıştır. Tespit edilen G1214A (R405K) mutasyonu ise hem duyarlı hem de duyarlı olmayan izolatlarda görülmüştür. Üç *mrr1* polimorfizmi, G2575A (A859T), -102_-101insT (101 veya 102. pozisyonunda bir Timin insersiyonu) ve G2337T (L779F) birer dirençli izolatta görülmüştür. G1436A (R478K) mutasyonu ise bir artmış temasta duyarlı izolatta saptanmıştır. Duyarlı izolatların %12,7'sinde (n = 7), artmış temasta duyarlı izolatlarının %16,2'sinde (n = 6) ve dirençli izolatların %33,3'ünde (n = 10) en az bir *mrr1* polimorfizmi saptamışlardır. *mrr1* geninde G1436A (R478K), C1856T (A619V), G2337T (L779F), G2575A (A859T) ve -101insT mutasyonlarının görüldüğü izolatlarda MDR1 pompasının ekspresyonunun da arttığı saptanmıştır (136). G1747A (G583R) ve A2619C (K873N) mutasyonlarının, *C. parapsilosis* *mrr1* transkripsiyon faktöründe açıklanan işlev kazandıran mutasyonlar olduğu başka bir çalışmada bildirilmiştir (230).

Ülkemizde Ankara'da bulunan ve çalışmamızdaki hasta popülasyonuna benzer bir üniversite hastanesinde gerçekleştirilen çalışmada, 29 izolatta G1214A (R405K) ve dört izolatta G2779T (G927D) mutasyonları saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da azollere dirençli olan *C. parapsilosis* izolatlarının (n=41) %36,6'sında (n=15) *mrr1* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır. İzolatların dokuzunda G1214A (R405K) ve altısında G2779T (G927D)

mutasyonu belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde bu mutasyonlar birlikte saptanmamıştır. G2779T (G927D) mutasyonu taşıyan altı izolatın hiçbirinde *erg11* geninde A395T mutasyonu bulunmamaktadır (6/6 izolat azol dirençli). *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu içermeyen azol dirençli izolatların (n=8) %75'inde bir *mrr1* polimorfizmi (G2779T (G927D)) saptanmıştır. Bu bulgu literatürde yer alan başka bir çalışmanın *erg11* A395T içermeyen dirençli izolatlarının %76,9'unda en az bir *mrr1* polimorfizmi içerdiği ve duyarlı izolatların yalnızca %12,7'sinde en az bir *mrr1* polimorfizmi içerdiği sonucu ile örtüşmektedir (136). Bizim çalışmamızda ise azol duyarlı izolatlarda *mrr1* geninin incelenmemiş olması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

Azol dirençli *C. parapsilosis* izolatlarında *mrr1* dizi analizi sonucunda T2957C/WT (L986P) mutasyonu saptanan bir çalışmada bu mutasyon açısından heterozigot olan izolatların MİK değerlerinin homozigotlardan daha düşük olduğunu ve MDR1 pompasının daha düşük seviyelerde arttığını saptamışlardır (231). Bizim çalışmamızda ise G1214A (R405K) mutasyonlarının tamamı heterozigot iken, G2779T (G927D) mutasyonları homozigot olarak saptanmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da homozigot olarak saptanan G2779T (G927D) mutasyonu içeren izolatların flukonazol için MİK 50 16 µg/ml iken, heterozigot mutasyon şeklinde saptanan G1214A (R405K) mutasyonu içeren izolatlarda bu değer 8 µg/ml şeklinde belirlenmiştir (231). Ayrıca çalışmamızda saptanan *mrr1* mutasyonlarının MDR1 pompasının ekspresyon düzeyini etkileyip etkilemediğinin araştırılmamış olması çalışmamızın eksik yönlerindendir.

Buradaki bulgularımız, klinik izolatlarda *mrr1* mutasyonların flukonazol direncine katkısını ortaya koymakta ve bu tür mutasyonların *C. parapsilosis*'te *erg11* A395T (Y132F) mutasyonu kadar sık olmasa da nispeten yaygın bir direnç mekanizmasını temsil ettiğini düşündürmektedir. Gerçekten de, azol dirençli izolatlarımızın %36,6'sında *mrr1* mutasyonları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *erg11* geninde en sık tespit edilen Y132F tek nokta mutasyonunu tarama yöntemi olarak iki MAS PZR protokolü değerlendirilmiş ancak *erg11* geni için DNA dizi analizi uygulanmadığından bu gende başka bir mutasyon olup olmadığı belirlenememiştir. Ayrıca çalışmamızda *mrr1* geni için dizi analizi yapılmış ancak transkripsiyon faktörlerinden *tac1* genindeki mutasyonların ve DAP'nın (MDR1, CDR1) ekspresyon düzeyleri araştırılmamış olması çalışmamızın eksik yönlerindendir. Ancak çalışmamızda daha önce azol duyarlı *C. parapsilosis* izolatlarında da bildirilmeyen A395T mutasyonu tespit edilmiş olup tedavi

esnasında direncin gelişebileceğine dikkat çekilmiştir. Çalışmamızda *mrr1* dizi analizi sadece duyarlı olmayan 41 *C. parapsilosis* izolatında çalışılmış olup duyarlı izolatlarda herhangi bir mutasyonun olup olmadığı hakkında yorum yapılamamaktadır. Ayrıca azollere duyarlı olmadığı saptanan bazı izolatlarda *erg11* geninde A395T (Y132F) mutasyonu ve *mrr1* geninde mutasyon saptanmamış olup başka direnç mekanizmalarının bu süreçte etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple bu izolatlarda diğer azol direnç mekanizmalarının da araştırılması gerekmektedir.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada laboratuvarımızdaki kandidemi etkenlerinin dağılımı, antifungal ilaçlara duyarlılığı belirlenmiştir. Baskın kandidemi etkeninin *C. parapsilosis* olduğu ve azollere yüksek oranda dirençli olduğu görülmüştür. Çalışmamızda tüm izolatlar arasında genel flukonazol direnci %33,6, *C. parapsilosis*'te ise %68,4 şeklinde oldukça yüksek düzeyde saptanırken, *C. glabrata*'da %10,7 ve *C. albicans*'ta %6,1 olarak belirlenmiştir. *C. parapsilosis* özellikle sağlık çalışanları arasında elleri de içeren doğrudan temas yoluyla aktararak klonal salgınlara sebep olabilmesi, biyofilmler oluşturarak hastane ortamında varlığını sürekli devam ettirebilmesi, azollere artmış direnci ve azoller arasında çapraz direnç gelişimi nedeniyle hastanemizde önemli bir sağlık sorunu olarak tanımlanmıştır. Bu amaçla *C. parapsilosis* izolatlarının klonal ilişkisinin ve direnç mekanizmalarının araştırılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Klinik ortamlarda flukonazol dirençli *C. parapsilosis*'in daha fazla yayılmasını önlemek için aktif sürveyans çalışmalarına daha fazla ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda YBÜ ve diğer servislerde kandidemi risk faktörlerinin ve kandidemi etkenlerinin dağılımı belirlenerek türlere göre duyarlılık profilleri analiz edilmiştir. Hasta popülasyonuna bağlı olarak (mekanik ventilasyon, invaziv tıbbi cihaz, SVK ve TPN varlığı vb.) *C. parapsilosis*'in YBÜ'de daha sık kandidemi etkeni olduğu görülmüşken *C. albicans*'ın diğer servislerde gözlenen yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. Ayrıca YBÜ kaynaklı izolatlarda genel olarak flukonazol ve itrakonazol direnci fazla olarak gözlenmesine rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. YBÜ kaynaklı izolatlarda diğer servislerdeki izolatlarla göre vorikonazol direncinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda VITEK 2 ile referans yöntem olan EUCAST sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarının uyumluluğu karşılaştırılmıştır. Genel olarak literatür verilerine benzer sonuçlar elde edilerek EUCAST yöntemi ile kategorik olarak uyumlu olduğu saptanmıştır. Ancak bazı izolatlarda VITEK 2 MİK çalışma aralıklarının izolatların EUCAST klinik ve ECOFF değerlerini içermemesi nedeniyle yorumlamada sıkıntılar yaşandığından VITEK 2 çalışma aralığının bu değerleri kapsayacak şekilde yeniden düzenlenmesi gerekmektedir.

Kandideminin en sık sebebi olan ve azol direncini oldukça yüksek bulduğumuz *C. parapsilosis* izolatlarında bu direncin altında yatan mekanizmaları da aydınlatmaya çalıştık. İlk

olarak azol dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının çoğunda daha önce sıklıkla bildirilen flukonazolün hedefi olan *erg11* genindeki A395T (Y132F) mutasyonunun taramasını iki ucuz ve kolay yöntemle gerçekleştirdik ve izolatlarımızda bu mutasyonu oldukça yüksek oranda (%61,4) tespit ettik. Çalışmamızda daha önce azol duyarlı *C. parapsilosis* izolatlarında bildirilmeyen A395T mutasyonu tespit edilmiş olup tedavi esnasında direncin gelişebileceğine dikkat çekilmektedir. Bu mutasyon laboratuvarımızdaki *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol direncinin büyük bir kısmından sorumlu olabilir. İkincisi, önemli bir flukonazol DAP'sini düzenleyen bir gen olan *mrr1* geninin DNA dizi analizi ile mutasyonlarının tespit edilmesi çalışmamızda gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar çalışmamızın verileri izolat sayısının nispeten düşük olması nedeniyle sınırlı olsa da, verilerimiz, A395T (Y132F) mutasyonu taşıyan izolatların neden olduğu KAE'nin daha fazla klonal bulaşını önlemek için *C. parapsilosis* Y132F izolatlarının klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanımlanması gerektiğini göstermektedir. Bunu gerçekleştirmek için azol direnci saptanan KAE etkeni *C. parapsilosis* izolatlarına her iki MAS PZR yöntemi ile bu mutasyon varlığı açısından tarama gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda hem *erg11*'de hem de *mrr1*'de mutasyonların saptanması, *C. parapsilosis* izolatlarında birden fazla moleküler mekanizmanın kombinasyonunun azol direncinde rol oynayabileceği göstermiştir.

Bu çalışmada, merkezimizde *C. parapsilosis* klinik izolatlarında flukonazol direncinde rol oynayan ilk mutasyonları tanımladık. Literatürde de en yaygın mutasyon olan *erg11* Y132F'in mevcut olduğunu ve *mrr1* genindeki polimorfizmlerin hastanemizde yatan hastalardan izole edilen kökenlerde de var olduğunu gösterdik. Sağlık çalışanlarının elleri ile yayılma yeteneği ve ülkemiz hastanelerindeki mevcut artışı göz önüne alındığında, bu mutasyonları barındıran *C. parapsilosis* izolatları için daha fazla sürveyans çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

9. KAYNAKLAR

1. Poissy J, Damonti L, Bignon A, Khanna N, Von Kietzell M, Boggian K, et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Critical Care*. 2020;24:1-11.
2. Pfaller MA, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(1):133-63.
3. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(3):841-8.
4. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clinical infectious diseases*. 2012;55(10):1352-61.
5. Playford E, Nimmo G, Tilse M, Sorrell T. Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999–2008. *Journal of Hospital Infection*. 2010;76(1):46-51.
6. Arendrup MCM JM, J.W.; Lagrou, K.; Hamal, P.; Guinea, J. EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts 2023 [Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAS_T_E.Def_7.4_Yeast_definitive_revised_2023.pdf].
7. Kidd SE, Crawford LC, Halliday CL. Antifungal susceptibility testing and identification. *Infectious Disease Clinics*. 2021;35(2):313-39.
8. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. 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*. 2010;48(5):1782-6.
9. Espinel-Ingroff A. *Medical Mycology and Training in the United States: A Historical Analysis (1894-1996)*: Springer Science & Business Media; 2003.
10. Yücel A. Tıp Mikolojisinin Dünü ve Bugünü. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2014;30(2):191-8.

11. Ainsworth GC. Introduction to the history of medical and veterinary mycology: Cambridge University Press; 2002.
12. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book: 2-Volume Set: Elsevier health sciences; 2019.
13. McCullough M, Ross B, Reade P. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. International journal of oral and maxillofacial surgery. 1996;25(2):136-44.
14. Howell SA, Hazen KC, Brandt ME. Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance. Manual of clinical microbiology. 2015:1984-2014.
15. Bennett RJ, Turgeon BG. Fungal sex: the Ascomycota. Microbiology spectrum. 2016;4(5):10.1128/microbiolspec.funk-0005-2016.
16. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. Fundamental medical mycology: John Wiley & Sons; 2011.
17. James H. Jorgensen MAP, Karen C. Carroll, Marie Louise Landry, Guido Funke, Sandra S. Richter, David W. Warnock. Manual of Clinical Microbiology. Warnock DW, editor. Washington, DC: ASM Press 2015. 1935-44 p.
18. Ahmed N, Mahmood MS, Ullah MA, Araf Y, Rahaman TI, Moin AT, et al. COVID-19-associated candidiasis: possible patho-mechanism, predisposing factors, and prevention strategies. Current Microbiology. 2022;79(5):127.
19. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. Journal of clinical microbiology. 2005;43(1):284-92.
20. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS microbiology reviews. 2012;36(2):288-305.
21. Sharma J, Rosiana S, Razzaq I, Shapiro RS. Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. Journal of Fungi. 2019;5(1):17.
22. Larone DH. Larone's Medically Important Fungi, A Guide to Identification: Asm Press; 2023.
23. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryotic cell. 2011;10(9):1173-82.
24. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends in microbiology. 2004;12(7):317-24.

25. Gow NA. Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology*. 1994;140(12):3193-205.
26. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*. 2021;7(2):79.
27. Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(1):80-96.
28. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 2006;28(8):799-808.
29. Richard A Calderone CJC. *Candida and candidiasis*: ASM Press; 2012.
30. Lenardon MD, Sood P, Dorfmueller HC, Brown AJ, Gow NA. Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *The Cell Surface*. 2020;6:100047.
31. Ruiz-Herrera J, Victoria Elorza M, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS yeast research*. 2006;6(1):14-29.
32. de Nobel H, van den Ende H, Klis FM. Cell wall maintenance in fungi. *Trends in microbiology*. 2000;8(8):344-5.
33. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1998;62(1):130-80.
34. Gow NA, Latge J-P, Munro CA. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum*. 2017;5(3):10.1128/microbiolspec. funk-0035-2016.
35. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Frontiers in microbiology*. 2020;10:2993.
36. Klis F, Groot PD, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical mycology*. 2001;39(1):1-8.
37. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(2):10.1128/cmr. 00111-18.
38. Burg JS, Espenshade PJ. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in lipid research*. 2011;50(4):403-10.

39. Sant D, Tupe S, Ramana CV, Deshpande M. Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. *Journal of Applied Microbiology*. 2016;121(6):1498-510.
40. Liu J-F, Xia J-J, Nie K-L, Wang F, Deng L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35:1-8.
41. Hu Z, He B, Ma L, Sun Y, Niu Y, Zeng B. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian journal of microbiology*. 2017;57:270-7.
42. Koselny K, Mutlu N, Minard AY, Kumar A, Krysan DJ, Wellington M. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. *MBio*. 2018;9(4):e01204-18.
43. Rodrigues ML. The multifunctional fungal ergosterol. *MBio*. 2018;9(5):10.1128/mbio.01755-18.
44. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essentials of clinical mycology*: Springer; 2011.
45. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28.
46. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39:1797-819.
47. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*'ların Patojenlik Belirtgenleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2014;31(3).
48. Patrick R. Murray KSR, Michael A. Pfaller. *Medical Microbiology*: ELSEVIER; 2021. 571-685 p.
49. Calderone R. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*: CRC Press; 2001.
50. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends in microbiology*. 2001;9(12):591-6.
51. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virulans faktörleri. *Ankem Dergisi*. 2012;26(2):261-9.
52. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003;67(3):400-28.
53. Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(1):10-24.

54. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*. 2009;56(2):211-24.
55. Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F. Combating fungal infections: problems and remedy: Springer Science & Business Media; 2010.
56. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(1):122-43.
57. Dutton LC, Jenkinson HF, Lamont RJ, Nobbs AH. Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. *FEMS Pathogens and Disease*. 2016;74(3):ftw005.
58. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):5895.
59. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current genetics*. 2009;55:497-509.
60. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):606-25.
61. Kuhn D, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*. 2002;70(2):878-88.
62. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022;13(1):89-121.
63. Alby K, Bennett RJ. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(14):3178-91.
64. Bennett R, Johnson A. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:233-55.
65. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller Mt, Soll D. " White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*. 1987;169(1):189-97.
66. Soll D. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of oral microbiology*. 2014;6(1):22993.
67. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(9):1232-9.

68. Pristov K, Ghannoum M. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(7):792-8.
69. Lass-Flörl C, Kanj SS, Govender NP, Thompson III GR, Ostrosky-Zeichner L, Govrins MA. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2024;10(1):20.
70. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(2):177-86.
71. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Annals of surgery*. 1994;220(6):751-8.
72. León C, Alvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, León M, Nolla J, Jordá R, et al. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2009;28:233-42.
73. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander B, Donowitz G, Kan V, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2007;26:271-6.
74. Cortés JA, Corrales IF. Invasive candidiasis: epidemiology and risk factors. *Fungal infection: IntechOpen London, UK*; 2018.
75. Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. COVID-19-associated candidiasis (CAC): an underestimated complication in the absence of immunological predispositions? *Journal of fungi*. 2020;6(4):211.
76. Lass-Flörl C, Steixner S. The changing epidemiology of fungal infections. *Molecular Aspects of Medicine*. 2023;94:101215.
77. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(5):10.1128/jcm. 01909-17.
78. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(9):1284-92.
79. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clinical infectious diseases*. 2012;54(8):1110-22.

80. Weems Jr JJ. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases*. 1992;14(3):756-66.
81. Ben-Ami R, Weinberger M, Orni-Wasserlauff R, Schwartz D, Itzhaki A, Lazarovitch T, et al. Time to blood culture positivity as a marker for catheter-related candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(7):2222-6.
82. Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(8):2879-83.
83. Errol Reiss HJS, G. Marshall Lyon. *Fundamental Medical Mycology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
84. Jorgensen JH, Pfaller, Michael A., Carroll, Karen C. *Manual of clinical microbiology* /. 11. ed. Warnock MEBaDW, editor. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM); 2015 2015.
85. Gary W. Procop DLC, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gail L. Woods. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Seventh ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017.
86. Govrins M, Lass-Flörl C. *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting. *Nature Reviews Microbiology*. 2024;22(1):46-59.
87. Pincus D, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification—past, present, and future methods. *Medical mycology*. 2007;45(2):97-121.
88. Ahmad S, Khan Z. Invasive candidiasis: a review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian journal of medical microbiology*. 2012;30(3):264-9.
89. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(5):1510-7.
90. Arafa SH, Elbanna K, Osman GE, Abulreesh HH. *Candida* diagnostic techniques: a review. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*. 2023;9(3):360-77.
91. Camp I, Spettel K, Willinger B. Molecular methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Fungi*. 2020;6(3):101.
92. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*. 2008;46(1):120-8.
93. Zhu P, Li Y, Guo T, Liu S, Tancer RJ, Hu C, et al. New antifungal strategies: drug combination and co-delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023:114874.

94. Carroll KCJ, James H._ Pfaller, Michael A. Manual of Clinical Microbiology 2 Volume set. WARNOCK DW, editor: ASM Press; 2015.
95. Christopher C. Kibbler RB, Neil A.R. Gow, Susan Howell, Donna M. MacCallum, Rohini J. Manuel. Oxford Textbook of Medical Mycology: Oxford University Press; 2018. 337-60 p.
96. Carol A. Kauffman PGP, Jack D. Sobel, William E. Dismukes. Essentials of Clinical Mycology. Second Edition: Springer; 2011.
97. Groll AH, Gea-Banacloche JC, Glasmacher A, Just-Nuebling G, Maschmeyer G, Walsh TJ. Clinical pharmacology of antifungal compounds. Infectious Disease Clinics. 2003;17(1):159-91.
98. Alp Ş, Arikan Akdağlı S. *Candida auris* ve antifungal ilaçlara direnç mekanizmaları. Mikrobiyoloji Bülteni. 2021;55(1):99-112.
99. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. The Journal of infectious diseases. 2017;216(suppl_3):S445-S51.
100. Hokken MW, Zwaan B, Melchers W, Verweij P. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. Fungal genetics and Biology. 2019;132:103254.
101. Sokovic M, Liaras K. Antifungal compounds discovery: natural and synthetic approaches: Elsevier; 2020.
102. Stefan Riedel SAM, Timothy A. Mietzner, Steve Miller. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology (Lange)2022.
103. Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. Microbiology spectrum. 2016;4(5):4.5. 19.
104. Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH. Organism-dependent fungicidal activities of azoles. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998;42(11):3018-21.
105. Susever S, Yeğenoğlu Y. İmmün sistemi baskılı hastaların klinik örneklerinden soyutlanan *Candida* türlerinin PCR ile belirlenmesi ve antifungal direnç genlerinin RFLP ve sekans analizi ile saptanması. Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi. 2012;39(2).
106. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Current opinion in microbiology. 2018;45:70-6.
107. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(7):a019752.
108. Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu M-J, Register E, et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and

- clinical *Candida* sp. isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(8):3264-73.
109. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. Fungal Genetics and Biology. 2010;47(2):117-26.
 110. Reddy GKK, Padmavathi AR, Nancharaiah Y. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. Current Research in Microbial Sciences. 2022;3:100137.
 111. Elewski BE. Mechanisms of action of systemic antifungal agents. Journal of the American Academy of Dermatology. 1993;28(5):S28-S34.
 112. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: current approaches. Clinical Microbiology Reviews. 2020;33(3):10.1128/cmr. 00069-19.
 113. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2015;57:57-64.
 114. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
 115. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, et al. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E. Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). Journal of clinical microbiology. 2007;45(1):109-11.
 116. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clinical microbiology reviews. 2001;14(4):643-58.
 117. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Medical mycology. 2007;45(7):569-87.
 118. Pfaller M, Arikan S, Lozano-Chiu M, Chen Y-S, Coffman S, Messer S, et al. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. Journal of clinical microbiology. 1998;36(9):2609-12.
 119. Barry A, Pfaller M, Rennie R, Fuchs P, Brown S. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(6):1781-4.
 120. Zomorodian K, Bandegani A, Mirhendi H, Pakshir K, Alinejhad N, Fard AP. In vitro susceptibility and trailing growth effect of clinical isolates of *Candida* species to azole drugs. Jundishapur journal of microbiology. 2016;9(2).

121. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(12):931-4.
122. Ugozzoli L, Wallace RB. Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods*. 1991;2(1):42-8.
123. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS yeast research*. 2009;9(7):1029-50.
124. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(2):76-81.
125. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*. 2012;125(1):S3-S13.
126. Bohner F, Papp C, Gácsér A. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. *FEMS Yeast Research*. 2022;22(1):foac019.
127. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;66(4):373-84.
128. Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*. 2006;313(5785):367-70.
129. Silver PM, Oliver BG, White TC. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryotic Cell*. 2004;3(6):1391-7.
130. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(2):382-402.
131. Pham CD, Iqbal N, Bolden CB, Kuykendall RJ, Harrison LH, Farley MM, et al. Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(8):4690-6.
132. Perlin DS. Echinocandin resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61(suppl_6):S612-S7.
133. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, Clancy CJ. Caspofungin MICs correlate with treatment outcomes among patients with *Candida glabrata* invasive candidiasis and prior echinocandin exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(8):3528-35.
134. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*. 2013;2013.

135. Testing ECoAS. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.4, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. 2023.
136. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a US surveillance system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1030-7.
137. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Epidemiology and molecular basis of resistance to fluconazole among clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Microbial Drug Resistance*. 2017;23(8):966-72.
138. Hubler CM, Carvalhaes CG, Castanheira M. Recent increase in fluconazole-nonsusceptible *Candida parapsilosis* in a global surveillance with the expansion of the Erg11 Y132F genotype and a rapid detection method for this alteration. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2023;106(3):115957.
139. Administration FaD. Guidance for Industry and FDA Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health August 28, 2009
140. Yang Z-T, Wu L, Liu X-Y, Zhou M, Li J, Wu J-Y, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. *BMC infectious diseases*. 2014;14:1-10.
141. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical infectious diseases*. 1999;29(2):239-44.
142. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*. 2004;39(3):309-17.
143. Playford EG, Lipman J, Jones M, Lau AF, Kabir M, Chen SC-A, et al. Problematic dichotomization of risk for intensive care unit (ICU)-acquired invasive candidiasis: results using a risk-predictive model to categorize 3 levels of risk from a multicenter prospective cohort of Australian ICU patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(11):1463-9.
144. Ahmad S, Kumar S, Rajpal K, Sinha R, Kumar R, Muni S, et al. Candidemia among ICU patients: species characterisation, resistance pattern and association with Candida Score: A Prospective Study. *Cureus*. 2022;14(4).

145. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. PLoS One. 2017;12(4):e0175172.
146. Ghrenassia E, Mokart D, Mayaux J, Demoule A, Rezine I, Kerhuel L, et al. Candidemia in critically ill immunocompromised patients: report of a retrospective multicenter cohort study. Annals of intensive care. 2019;9:1-10.
147. Korkmaz P, Mistanoğlu Özatağ D, Yalin Ş, Gülcan A, Aslan H. Kandidemide epidemiyolojik özellikler, risk faktörleri ve klinik gidişin değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2021;78(4):517-24.
148. Tortorano A, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler C, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004;23:317-22.
149. Pinho Resende J, De Resende M, Saliba J. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. Mycoses. 2002;45(7-8):306-12.
150. Chapman B, Slavin M, Marriott D, Halliday C, Kidd S, Arthur I, et al. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2017;72(4):1103-8.
151. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73(suppl_1):i4-i13.
152. Ao W, Klonoski J, Berlinghoff E, Jensen J, Afroz T, Munns D, et al. Rapid detection and differentiation of clinically relevant *Candida* species simultaneously from blood culture by use of a novel signal amplification approach. Journal of clinical microbiology. 2017;56(1):e00982-17.
153. Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, Yuce A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. Mycoses. 2006;49(2):134-8.
154. Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1366-77.

155. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN, editors. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. Open forum infectious diseases; 2019: Oxford University Press US.
156. Pfaller MA, Diekema D. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. Journal of Clinical microbiology. 2002;40(10):3551-7.
157. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. PloS one. 2016;11(1):e0146909.
158. Demirci-Duarte S, Arian-Akdagli S, Gülmez D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: increase in fluconazole resistance in 21 years. Mycoses. 2021;64(8):823-30.
159. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PloS one. 2013;8(3):e59373.
160. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. Selçuk Tıp Derg. 2012;28(3):149-51.
161. Horasan EŞ, Ersöz G, Göksu M, Otag F, Oner Kurt A, Karaçorlu S, et al. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. Mycopathologia. 2010;170:263-8.
162. Kiliñel Ö, Akar N, Karamurat ZD, Çalışkan E, Öksüz Ş, Öztürk CE, et al. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları.
163. Kazak E, Akın H, Ener B, Sığırlı D, Özkan Ö, Gürcüoğlu E, et al. An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. Mycoses. 2014;57(10):623-9.
164. Bakir M, Cerikcioglu N, Barton R, Yagci A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. Apmis. 2006;114(9):601-10.
165. Ergon MC, Dereli MD, Atalay MA, Koç AN, Çerikçioğlu N, Erturan Z, et al. Türkiye’de altı yıllık zaman dilimi içerisinde kan kültürlerinden soyutlanan maya mantarlarının tür dağılımı: çok merkezli bir çalışma. 2020.
166. Cicek-Kolak C, Erman-Daloglu A, Ozhak B, Ogunc D, Gunseren F. Epidemiology of Candidemia, Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species and Their Impact on Mortality in Adult Patients Admitted to Akdeniz University Hospital/Akdeniz Universitesi Hastanesi’nde Izlenen Yetiskin Hastalarda Kandidemi Epidemiyolojisi,

- Candida* Türlerinin Antifungal Duyarlılıkları ve Mortalite Üzerine Etkileri. Klinik Journal. 2019;32(3):250-9.
167. Gürcüoğlu E, Ener B, Akalin H, Sinirtaş M, Evci C, AKÇAĞLAR S, et al. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiology & Infection*. 2010;138(9):1328-35.
 168. Cilo BD. Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Isolated From Blood Culture. *Cureus*. 2023;15(4).
 169. Mete B, Zerdali EY, Aygun G, Saltoglu N, Balkan II, Karaali R, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021;40:325-33.
 170. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımının ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Ankem Derg*. 2015;29(3):105-13.
 171. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(3):478-88.
 172. Krcmery V, Barnes A. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of hospital infection*. 2002;50(4):243-60.
 173. Calandra T, Roberts JA, Antonelli M, Bassetti M, Vincent J-L. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. *Critical Care*. 2016;20:1-6.
 174. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009;302(21):2323-9.
 175. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(1):65-9.
 176. Trick W, Fridkin S, Edwards J, Hajjeh R, Gaynes RP, Hospitals NNIS. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clinical infectious diseases*. 2002;35(5):627-30.

177. Zilberberg MD, Kollef MH, Arnold H, Labelle A, Micek ST, Kothari S, et al. Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: a retrospective cohort study. *BMC infectious diseases*. 2010;10:1-7.
178. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Critical care medicine*. 2009;37(5):1612-8.
179. Hsu DI, Nguyen M, Nguyen L, Law A, Wong-Beringer A. A multicentre study to evaluate the impact of timing of caspofungin administration on outcomes of invasive candidiasis in non-immunocompromised adult patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(8):1765-70.
180. Labelle AJ, Micek ST, Roubinian N, Kollef MH. Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. *Critical care medicine*. 2008;36(11):2967-72.
181. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6:1-6.
182. Xie G-H, Fang X-M, Fang Q, Wu X-M, Jin Y-H, Wang J-L, et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Critical Care*. 2008;12:1-9.
183. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2016;62(4):e1-e50.
184. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(25):2020-9.
185. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *haematologica*. 2017;102(3):433.
186. Cornely O, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg B, Lortholary O, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18:19-37.
187. Ben-Ami R, Olshtain-Pops K, Krieger M, Oren I, Bishara J, Dan M, et al. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2518-23.

188. Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(7):1994-2004.
189. Castanheira M, Deshpande LM, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(1):105799.
190. Arikan-Akdagli S, Gülmez D, Doğan Ö, Çerikçioğlu N, Dereli MD, Birinci A, et al. First multicentre report of in vitro resistance rates in candidaemia isolates in Turkey. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;18:230-4.
191. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in microbiology*. 2017;7:231851.
192. Klingspor L, Ullberg M, Rydberg J, Kondori N, Serrander L, Swanberg J, et al. Epidemiology of fungaemia in Sweden: A nationwide retrospective observational survey. *Mycoses*. 2018;61(10):777-85.
193. Kaan Ö, Koc AN, Atalay MA, Sarigüzel FM. Molecular epidemiology, antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida glabrata* complex strains in Kayseri/Turkey. *Microbial Pathogenesis*. 2021;154:104870.
194. Favarello L, Nucci M, Queiroz-Telles F, Guimarães T, Salles M, Sukiennik T, et al. Trends towards lower azole susceptibility among 200 *Candida tropicalis* bloodstream isolates from Brazilian medical centres. *J Glob Antimicrob Resist* 25: 199-201. 2021.
195. Trouvé C, Blot S, Hayette M-P, Jonckheere S, Patteet S, Rodriguez-Villalobos H, et al. Epidemiology and reporting of candidaemia in Belgium: a multi-centre study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36(4):649-55.
196. Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller MA. Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2655-9.
197. Pfaller M, Castanheira M, Lockhart S, Ahlquist A, Messer S, Jones R. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(4):1199-203.
198. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(6):484.

199. Arastehfar A, Daneshnia F, Salehi M, Yaşar M, Hoşbul T, Ilkit M, et al. Low level of antifungal resistance of *Candida glabrata* blood isolates in Turkey: fluconazole minimum inhibitory concentration and FKS mutations can predict therapeutic failure. *Mycoses*. 2020;63(9):911-20.
200. Khan Z, Ahmad S, Mokaddas E, Meis JF, Joseph L, Abdullah A, et al. Development of echinocandin resistance in *Candida tropicalis* following short-term exposure to caspofungin for empiric therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(4):10.1128/aac.01926-17.
201. Lima R, Ribeiro FC, Colombo AL, de Almeida Jr JN. The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment. *Frontiers in Fungal Biology*. 2022;3:957021.
202. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(2):306-17.
203. Cheng M-F, Yu K-W, Tang R-B, Fan Y-H, Yang Y-L, Hsieh K-S, et al. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2004;48(1):33-7.
204. Öztürk T, Özseven AG, Çetin ES, Kaya S. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2013;14(1):17-22.
205. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G. Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Ankem Derg*. 2013;27(1):25-30.
206. Zer Y, Balcı İ. Yoğun Bakım Ünitesindeki Hastalardan İzole Edilen *Candida* Suşlarının İdentifikasyonu ve Antifungal Duyarlılıkları.
207. Pfaller M, Diekema D, Procop G, Rinaldi M. 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*. 2007;45(11):3522-8.
208. Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledeboer NA. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(5):1765-71.
209. Cilo BD, Ener B. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Microdilution method and VITEK 2 automated antifungal susceptibility system for the determination of antifungal susceptibility of *Candida* species. *Cureus*. 2021;13(12).

210. Kaur R, Dhakad MS, Goyal R, Haque A, Mukhopadhyay G. Identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species: a comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. *Journal of global infectious diseases*. 2016;8(4):139-46.
211. Lim HJ, Shin JH, Kim M-N, Yong D, Byun SA, Choi MJ, et al. 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*. 2020;64(11):10.1128/aac.00740-20.
212. Barchiesi F, Orsetti E, Osimani P, Catassi C, Santelli F, Manso E. Factors related to outcome of bloodstream infections due to *Candida parapsilosis* complex. *BMC infectious diseases*. 2016;16:1-7.
213. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. *PloS one*. 2014;9(7):e101510.
214. Strollo S, Lionakis MS, Adjemian J, Steiner CA, Prevots DR. Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States.
215. Wisplinghoff H, Ebberts J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;43(1):78-81.
216. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(8):2816-23.
217. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(4):1829-35.
218. Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Soll DR, Pujol C, Pfaller MA, Richardson M, et al. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(6):2729-35.

219. Arastehfar A, Daneshnia F, Hilmioğlu-Polat S, Fang W, Yaşar M, Polat F, et al. First report of candidemia clonal outbreak caused by emerging fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates harboring Y132F and/or Y132F+ K143R in Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2020;64(10):10.1128/aac. 01001-20.
220. Pinto e Silva AT, Costa-de-Oliveira S, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. *FEMS yeast research*. 2009;9(4):626-33.
221. Silva A, Miranda I, Guida A, Synnott J, Rocha R, Silva R, et al. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(7):3546-56.
222. Martini C, Torelli R, De Groot T, De Carolis E, Morandotti GA, De Angelis G, et al. Prevalence and clonal distribution of azole-resistant *Candida parapsilosis* isolates causing bloodstream infections in a large Italian hospital. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020;10:232.
223. Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, Del Puente F, Gandolfo N, Codda G, et al. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. *Mycoses*. 2020;63(4):361-8.
224. Thomaz DY, de Almeida Jr JN, Sejas ON, Del Negro GM, Carvalho GO, Gimenes VM, et al. Environmental clonal spread of azole-resistant *Candida parapsilosis* with Erg11-Y132F mutation causing a large candidemia outbreak in a Brazilian cancer referral center. *Journal of Fungi*. 2021;7(4):259.
225. Corzo-Leon DE, Peacock M, Rodriguez-Zulueta P, Salazar-Tamayo GJ, MacCallum DM. General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an Erg11 Y132F mutation. *Medical mycology*. 2021;59(7):664-71.
226. Mamali V, Siopi M, Charpantidis S, Samonis G, Tsakris A, Vrioni G, et al. Increasing incidence and shifting epidemiology of candidemia in Greece: results from the first nationwide 10-year survey. *Journal of Fungi*. 2022;8(2):116.
227. Díaz-García J, Gómez A, Alcalá L, Reigadas E, Sánchez-Carrillo C, Pérez-Ayala A, et al. Evidence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* genotypes spreading across hospitals located in Madrid, Spain and harboring the Y132F ERG11p substitution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022;66(8):e00710-22.

228. Souza ACR, Fuchs BB, Pinhati HM, Siqueira RA, Hagen F, Meis JF, et al. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(10):6581-7.
229. Choi YJ, Kim Y-J, Yong D, Byun J-H, Kim TS, Chang YS, et al. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* bloodstream isolates with Y132F mutation in ERG11 gene, South Korea. *Emerging infectious diseases*. 2018;24(9):1768.
230. Branco J, Silva AP, Silva RM, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Butler G, et al. Fluconazole and voriconazole resistance in *Candida parapsilosis* is conferred by gain-of-function mutations in MRR1 transcription factor gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(10):6629-33.
231. Zhang L, Xiao M, Watts MR, Wang H, Fan X, Kong F, et al. Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. *BMC infectious diseases*. 2015;15:1-7.