

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK MİKOLOJİ
LABORATUVARINDA FUNGEMİ ETKENİ OLARAK İZOLE
EDİLEN *CANDIDA PARAPSILOSIS* KOMPLEKS
İZOLATLARINDA TÜRLERİN BELİRLENMESİ, BU
TÜRLERDE AZOLLERE DİRENÇ DURUMUNUN VE
DİRENCİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ

Dr. Selay DEMİRCİ DOS SANTOS DUARTE
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2020



T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK MİKOLOJİ
LABORATUVARINDA FUNGEMİ ETKENİ OLARAK İZOLE
EDİLEN *CANDIDA PARAPSILOSIS* KOMPLEKS
İZOLATLARINDA TÜRLERİN BELİRLENMESİ, BU
TÜRLERDE AZOLLERE DİRENÇ DURUMUNUN VE
DİRENCİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ**

Dr. Selay DEMİRCİ DOS SANTOS DUARTE

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince, her aşamada bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım vedesteğini her zaman arkamda hissettiğim, tez sürecimin çok keyifli ve öğretici geçmesindeki önemli katkıları için sayın hocam Doç.Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç'a,

Alanında tüm dünyaca saygın olan ve engin bilgi birikimi ile tezimin yönlendirilmesine ve mikoloji alanındaki eğitimimeolan önemli katkıları için sayın hocam Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı'ya,

Tezimin tasarlanma ve sonuçlarının değerlendirilmesi aşamalarında her daim kendisine ulaşabildiğim, önemli katkıları için sayın hocam Prof. Dr. Koray Ergünay'a,

Tüm uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi birikimime sağladıkları her türlü katkıları ve emekleri için Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli olan tüm hocalarım ve çok sevgili arkadaşlarıma,

Tezim boyunca bana verdikleri değerli teknik destekleri için Ferhat Furkan Öz, Dilek Böyük, İrfan Atmacaile uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tüm teknik personelimize,

Beni bu yaşlara getiren, maddi ve manevi desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen, bana onurla ve azimle çalışma ahlakını kendi hayat tarzları ve başarıları ile aşıl原因an canım annem Sevilay Demirci ve canım babam Nuri Demirci'ye,

Doktor olacağımı öğrendiğim gün, benden çok sevip benimle hep gurur duyancanım kardeşim Berkay Demirci ve her daim destekçim olaneşi kız kardeşim Eda Kulak Demirci'ye,

Başarısı, çalışma ahlakı ve kişiliği ile bir eşten öte, rol modelim olan, diğer yarım değerli eşim Joao Filipe Dos Santos Duarte'ye

TSA-2018-17112 no'lu bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

DEMİRCİ DOS SANTOS DUARTE S. Hacettepe Üniversitesi Klinik Mikoloji laboratuvarında fungemi etkeni olarak izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarında türlerin belirlenmesi, bu türlerde azollere direnç durumunun ve direncin moleküler mekanizmalarının incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık, Tıbbi Mikrobiyoloji Tezi, Ankara, 2020. *Candida parapsilosis* kompleks, biyokimyasal ve fenotipik olarak ayrılamayan ve direnç profilleri, tedavi yanıtları ve prevalansları farklı olan *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* türlerinden oluşan önemli bir fungemi etkenidir. Tedavide sıklıkla kullanılan azollere duyarlılık azalmaktadır. Bu çalışmada, kan kültüründen izole edilen *C. parapsilosis* kompleks suşlarında tür dağılımı, azollere duyarlılık durumu ve moleküler mekanizmaların ortaya konması amaçlanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Mikoloji Laboratuvarı'nda 1997-2017 yıllarında periferik kan ve kateter kanı örneklerinden üretilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında sekonder alkol dehidrogenaz (*SADH*) geni "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) yöntemiyle türler belirlenmiş, flukonazol, vorikonazol ve posakonazole ait minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri 'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing' (EUCAST) önerilerine göre saptanmış ve değerlendirilmiştir. Direncin moleküler mekanizmaları için *ERG11* ve *MRR1* genlerine ait DNA dizileri incelenmiştir. Çalışmaya alınan 181 izolatın 180'inin *Candida parapsilosis sensu stricto*, birinin ise *C. orthopsilosis* olduğu görülmüştür. Flukonazol direnç oranı %13,2'dir (24/181). *ERG11* geninde 53 izolatın yüksek dozda duyarlı ve dirençli olan 37'sinde A395T (Y132F), altısında G1372A (G458S) mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca iki izolatta daha önce bildirilmemiş olan G1261A (D421N) mutasyonu bulunmuştur. Sessiz T591C (I197I) mutasyonu, duyarlı ve dirençli 52 izolatta gösterilmiştir. *MRR1* genindeyse 29 izolatta G1214A (R405K) ve dört izolatta G2779T (G927D) mutasyonları saptanmıştır. Yıllar içinde azollere artan direncin görüldüğü ve dirence sebep olan moleküler mekanizmaların literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Daha önce bildirilmeyen G1261A (D421N) mutasyonunun da azol direnci ile ilişkisinin daha başka çalışmalar ile ortaya konması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Candida parapsilosis* kompleks, RFLP, azol direnci, tek nokta mutasyonu, fungemi

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi

Proje No: TSA-2018-17112



ABSTRACT

DEMİRCİ DOS SANTOS DUARTE S. Investigation of the distribution of species, detection of the susceptibility to azoles, and molecular mechanisms of resistance to azoles in *Candida parapsilosis* complex fungemia isolates in Hacettepe University Clinical Mycology Laboratory, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Microbiology Residency, Ankara, 2020

Candida parapsilosis complex is important in fungemia, consisting of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* species, which cannot be separated biologically and phenotypically and have different resistance profiles and prevalence. Susceptibility to azoles is decreasing in this species. In this study, it was aimed to determine the species distribution in *C.parapsilosis* complex fungemia isolates and to reveal molecular mechanisms causing decreased susceptibility to azoles. Species-level identification was determined by the secondary alcohol dehydrogenase (*SADH*) gene Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method in these isolates obtained from peripheral and catheter-drawn blood samples in 1997-2017 at Hacettepe University Hospitals Mycology Laboratory. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of fluconazole, voriconazole and posaconazole were determined and interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). DNA sequences of *ERG11* and *MRR1* genes were analyzed for molecular mechanisms of resistance. In 181 isolates per patient, 180 were *C.parapsilosis sensu stricto*, and one was *C. orthopsilosis*. The fluconazole resistance rate was 13.2% (24/181). For *ERG11* gene, 37 non-susceptible isolates of 53 isolates had A395T (Y132F) mutation and six isolates had G1372A (G458S) mutation. In addition, G1261A (D421N) mutation, which was not previously reported, was found in two isolates. The silent T591C (I197I) mutation was demonstrated in 52 of 53 isolates including susceptible and resistant isolates. In the *MRR1* gene, G1214A (R405K) mutation was detected in 29 isolates and G2779T (G927D) mutation was found in four isolates. The resistance to azoles increased over the years and the molecular mechanisms causing the resistance were compatible with the literature. The relationship of G1261A (D421N) mutation, which has not been

previously reported, with azole resistance should be demonstrated with further studies.

Keywords: *Candida parapsilosis* complex, RFLP, azole resistance, single nucleotide mutation, fungemia

Supporting Organization: Hacettepe University Scientific Research Project Unit

Project No: TSA-2018-17112



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	Sayfa iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Candida parapsilosis</i> kompleks Hakkında Genel Bilgiler	1
1.2. <i>C. parapsilosis</i> kompleks İzolatlarında Azol Türevlerinin Kullanımı ve Duyarlılık Durumu	1
1.3. Tezin amacı, kapsamı ve hipotezi	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	4
2.2. Taksonomi	4
2.3. Hücresel Özellikler	5
2.4. Fenotipik Özellikler	6
2.5. Epidemiyoloji	6
2.6. Patogenez	7
2.7. Klinik	9
2.8. Laboratuvar Tanısı	10
2.8.1. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tanısı	10
2.8.2. <i>C. parapsilosis</i> Kompleksin Tür Kompleksi ve Tür Düzeyinde Tanımlanması	11
2.9. <i>Candida</i> Türleri ile Gelişen Enfeksiyonların Tedavisinde Kullanılan Antifungal Ajanlar	13
2.9.1. Azoller	13
2.9.2. Ekinokandinler	15
2.9.3. Amfoterisin B	15
2.10. İnvaziv Kandidemilerin Tedavisi	16
2.11. Antifungal Duyarlılık Testleri	16
2.12. Azollere Olan Direncin Mekanizmaları	18
2.12.1. Dışa Atım Pompalarına Bağlı Mekanizmalar	19
2.12.2. Erg11 Enzimine Bağlı Mekanizmalar	19
2.12.3. Erg3 Enzimine Bağlı Mekanizmalar	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. İzolatların Seçimi	20
3.2. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması	20
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	21
3.2.2. Sekonder Alkol Dehidrogenaz Geninin PZR ile Çoğaltılması	23

3.2.3 RFLP ve Elektroforez	24
3.2.4 ITS Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması	25
3.3. İzolatların in vitro Duyarlılıklarının Belirlenmesi	26
3.3.1. Mikroplak Özelliği	26
3.3.2. Besiyeri Özelliği	26
3.3.3. Antifungal Ajanlar	27
3.3.4. Plak Hazırlığı	27
3.3.5. İnokulum Hazırlığı	27
3.3.6 Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu ve	28
Değerlendirme	
3.3.7. Kalite Kontrol	28
3.4 Test Edilen Azollere Artmış Dozda Duyarlı ve	28
Dirençli İzolatlarda Direncin Moleküler Mekanizmalarının	
Belirlenmesi	
3.4.1. <i>ERG11</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması	29
3.4.2. <i>MRR1</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması	30
3.4.3 DNA Dizi Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR	32
4.1 İzolatlara Ait Genel Özellikler	32
4.2. İzolatlarda Tür Düzeyinde Tanımlama	32
4.3. İzolatlara Ait in vitro Azol Duyarlılık Testi	33
Sonuçları	
4.4 Azollere Artmış Dozda Duyarlı ve Dirençli İzolatlara	37
Ait Direncin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması	
4.4.1 <i>ERG11</i> ve <i>MRR1</i> Gen Bölgelerinin Baz Diziliminde	37
Gözlenen Farklar	
5.TARTIŞMA	42
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece santigrad
g	Gram
L	Litre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molarite
mM	Milimolar
µl	Mikromolar
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
ABC	ATP-bağlayan kaset (“ATP binding cassette”)
AFDT	Antifungal duyarlılık testlerinin
ALFP	amplifiye edilen fragmanların uzunluk polimorfizmi (“amplified fragment length polymorphism”)
bç	Baz çifti
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standatları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECV	Epidemiyolojik eşik değerler (epidemiological cut-off value)
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay”

ESCMID	Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
MALDI-TOF MS	Matriks aracılı laser desorpsiyon uçuş süresi kütle spektrofotometrisi ("Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrophotometry")
MFS	Ana kolaylaştırıcı süperaile ("major facilitator superfamily")
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MLST	Çoklu bölge sekans tiplendirmesi ("multilocus sequence typing")
non-WT	Sokak tipi olmayan
RFLP	Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi ("restriction fragment length polymorphism")
RNA	Ribonukleik Asit
rRNA	ribozomal RNA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SADH	Sekonder alkol dehidrogenaz
SDA	Sabouraud dekstroze agar
ITS	"internal transcribed space"
T_m	Bağlanma sıcaklığı
YPD	Maya Özü Peptonlu Dekstroze ("Yeast Peptone Dextrose")
WT	Sokak tipi (wild type)



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
4.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların yattıkları servislere göre dağılımı.	32
4.2. RFLP yöntemi sonrası jel elektroforezi görüntüsü.	33
4.3. <i>ERG11</i> ve <i>MRR1</i> geninde görülen mutasyonlara ait örnek kromatogramlar	38



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Mayalar için önerilen referans antifungal duyarlılık testlerindeki farklılıklar.	17
3.1. Tür düzeyinde tanıda kullanılan primerler ve özellikleri	21
3.2. <i>Candida parapsilosis</i> kompleks izolatlarında <i>SADH</i> gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan bileşen miktarları.	23
3.3. <i>SADH</i> geni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri.	23
3.4. <i>SADH</i> geni PZR ürününü BanI ile kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.	24
3.5. <i>ITS</i> geni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri.	25
3.6. <i>ERG11</i> ve <i>MRR1</i> gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler ve özellikleri.	29
3.7. <i>MRR1</i> geni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri	30
4.1. Test edilen izolatların azol duyarlılık kategorilerine göre dağılımları.	34
4.2. Azol MİK değerlerinin dağılımı, MİK50 ve MİK90 değerleri.	34
4.3. Birden fazla azole dirençli olan izolatların azol MİK değerleri ve izole edildikleri yıl.	35
4.4. Ardışık üremelerinde azol duyarlılık paterninde farklılıklar olan hastalardan (n=4) izole edilen suşların özellikleri.	37
4.5. <i>ERG11</i> ve <i>MRR1</i> genleri baz dizilimi incelenen izolatlarda (n=53) belirlenen değişiklikler.	38
4.6. Azollere azalmış duyarlılık saptanan izolatlarda azol minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve gözlenen mutasyonlar.	40

1.GİRİŞ

1.1.Candida parapsilosis kompleksHakkında Genel Bilgiler

Candida türlerine bağlı gelişen kan dolaşımı enfeksiyonları, tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmektedir. Bu enfeksiyonlar özellikle hastanede uzun süre yatan, altta yatan ciddi hastalıkları bulunan, bağışıklık sistemi baskılanmışveya yoğun bakımda uzun süreli yatan hasta gruplarında sık görülen enfeksiyonlar arasındadırlar ve kötü prognozla ilişkilidirler(1, 2). Daha önceki yıllarda kandidemilerde en sık izole edilen tür *Candida albicans*ken, son yıllarda *C. albicans*dışı türler de sıklıkla izole edilmeye başlanmıştır (3, 4). Kandidemi etkeni *C. albicans* dışı *Candida* türleri arasında *C. parapsilosis*kompleksine ait türler oldukça önemli yer tutmaktadır (1). *C. parapsilosis*kompleks, bazı coğrafi bölgelerde ikinci en sık fungemi etkeni olarak görülmekte, özellikle çocuk hastalarda fungemi etkenleri arasında ilk sıraya yerleşebilmektedir(5).Bu tür kompleksi içerisinde birbirlerinden fenotipik ve morfolojik olarak ayırt edilemeyen, ancak genetik analizler ile birbirlerine çok yakın türler olarak tanımlanan *C. parapsilosis*sensu stricto (Grup I), *C. orthopsilosis*(Grup II) ve *C. metapsilosis* (Grup III) olmak üzere üç tür bulunmaktadır. Her ne kadar aynı tür kompleksi içinde yer alsalar da, bu türler arasında klinik prevalans, virülans faktörlerinin üretimi ve etkinliği ve geliştirdikleri enfeksiyonun prognozu açısından bazı farklılıklar gözlenmiştir(3, 6, 7). Bu durum, türler arasındaki farklılıkların daha iyi araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

1. 2.C. parapsilosis kompleks İzolatlarında Azol Türevlerinin Kullanımı ve Duyarlılık Durumu

Candida türleri ile meydana gelen fungemilerin tedavisinde azol türevi ilaçlar ucuz ve iyi tolere edilebilir olmaları sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır(8, 9). Ancak, son yıllarda fungemi etkeni olarak izole edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında azollere karşı direnç oranlarında artış gözlenmiştir. Bu direncin meydana gelmesinde, 14- α -demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* geninde gelişen mutasyonlar veya genin aşırı ifade edilmesi ile *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* gibi azol dışı atım pompalarını kodlayan genler ve bunların transkripsiyon faktörlerinde (*TAC1* ve *MRR1*) gelişen mutasyonlar rol oynayabilmektedir(10, 11). Direnç

gelişimindebu genlerde meydana gelen farklı mutasyonların ve etkilerinin araştırılmasının, gelecekteki antifungal direnç araştırmalarına ışık tutabileceği düşünülmektedir.

1.3.Tezin amacı, kapsamı ve hipotezi

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda kan örneklerinden izole edilen *C. parapsilosis* kompleksizolatlarında tür dağılımı, azol direnç durumu ve mekanizmaları araştırılmıştır. Bu amaçla 20 yıllık bir süreç boyunca periferik venler ve kateterlerden alınan kan örneklerinden izole edilmiş, *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanmış ve stoklanmış tüm izolatlar ulaşılmaya çalışılmıştır. Böylece, merkezimizde baskın olan tür ya da türlerin, azol direnç oranları ve mekanizmalarının belirlenmesi ve yıllara göre değişimin aydınlatılması hedeflenmiştir. Ayrıca, elde aynı hastaya ait ardışık izolatlar bulunduğunda, tümüne antifungal duyarlılık testi yapılarak tedavi sırasında direnç gelişen izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu tez ile çok sayıda yüksek riskli hasta takibi yapılan bir üçüncü basamak hastanesinde kandidemi etkeni olan *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında tür dağılımı ve azol direncine ilişkin veri sağlanarak ilgili hasta grubunda tedavi seçiminin yönlendirilmesinde yardımcı olunması ve direnç mekanizmalarının aydınlatarak Türkiye'de bu alandaki verilere başlangıç yapılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Mantarlar ile meydana geldiği düşünülen ilk enfeksiyonlar, milattan önce 500'lü yıllarda Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. Bunlar, ağız mukozasında gözlenen ve 'aft' olarak isimlendirilen lezyonlardır. Etken olan patojenleri mantarlar olarak tanımlayan ilk sistematik çalışmalar, modern tıp çağında, 1842-1844 yıllarında David Gruby tarafından yapılmıştır(12). On dokuzuncu yüzyıl ortalarında, infantlarda stomatit ve kadınlarda vajinal mukozitler şeklinde patojen mantar enfeksiyonları rapor edilmiştir(12, 13). Charles Philip Robin, 1853'te etkeni '*Oidium albicans*' olarak adlandırmıştır(14). Burchardt 1864'te aft etkeni fungusu ilk kez mikroskopik olarak incelemiş ve psödohip yapılarını da içerecek şekilde resmetmiştir(15). Afttan alınan örneğin kültüründe maya üremesi ilk olarak 1877'de tespit edilmiştir (16). Bu mikroorganizmanın ismi 1890'da '*Monilia albicans*' olarak değişmiş, 1923'te de '*Candida albicans*' olarak son ismini almıştır (17). Yirminci yüzyılın başından itibaren keşfedilen ve kullanıma giren antibakteriyel ilaçlar ve devamında 1928'de keşfedilen ilk antibiyotik olan penisilin, insan vücudunu yeni ve invaziv olabilen bir takım mantar enfeksiyonlarına daha açık hale getirmiştir(12, 18). Bu durum, 1950-1952 yılları arasında oral ve anogenital moniliyazis vakalarında artışa neden olmuş ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı aşırı fungal üreme ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ciddi moniliyazise bağlı bronkopulmoner komplikasyonlar sonucu ölüm, endokardit, üriner sistem enfeksiyonları ve sistemik enfeksiyonlar da bildirilmeye başlanmıştır. Bu enfeksiyonlarda en sık görülen etyolojik ajan *C. albicans* olarak bildirilmiştir(19). Ciddi vaka sayıları az olsa da bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda da bu tip enfeksiyonların bildirilmeye başlanması endişeye sebep olmuştur (20). Bağışıklığı baskılanmış hasta sayısında 1960'lı yıllardan sonra gözlenen hızlı artışa paralel olarak lokal ve sistemik invaziv kandida enfeksiyonları da artmış ve özellikle 1980'li yıllarda insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve buna bağlı gelişen kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) vakalarının görülmesi ile beraber *Candida* enfeksiyonlarında artışlar meydana gelmeye başlamıştır (21).

İnvaziv mantar enfeksiyonların insidans ve prevalansı 1980’li yıllardan bu yana giderek artmıştır (22).Günümüzde meydana gelen mantar enfeksiyonlarının %15-30’unu yüksek mortalite ve morbidite ile giden invaziv enfeksiyonlar oluşturmaktadır. *Candida* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlar, bunlar arasında geniş yer tutmaktadırlar (12, 22-24).Bu enfeksiyonlarda en sık görülen etken olarak *C. albicans* genellikle yerini korusada, albicans-dışı *Candida* türlerinin sıklığı artmaktadır. *C. parapsilosis* kompleksde invaziv enfeksiyonlarda sık gözlenen bir tür olarak yerini almıştır (1, 22, 25).

2.2. Taksonomi

Mantarlar alemi içinde, Ascomycetes filumunda Saccharomycetales sınıfında klinik olarak önemliolan bir çok *Candida* türü bulunmaktadır(26). Ascomycetes filumunda eşeyli üreme, kese içinde gelişen eşeyli sporların oluşturduğu askospor ile karakterizedir. *Candida* cinsi içerisinde, eşleşme ve mayoz bölünmenin intakt olduğu haploid türler(*Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* gibi) veseksüel yapıların gözlenmediği diploid türler (*C. albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candia tropicalis*, *C. parapsilosis*) yer almaktadır. Moleküler incelemeler sonucunda tüm bu türlerin aynı filuma ait oldukları gösterilmiştir (27, 28)

Candida cinsi içinde yer alan *C. parapsilosis* ile ilgili yapılan ilk moleküler taksonomi çalışmaları, bu türün genotipik heterojenitesinin diğer *Candida* türlerine göre daha fazla olduğunu ortaya koymuştur(29, 30). İlerleyen zamanlarda, moleküler taksonomik çalışmalar ve kullanılan yöntemler arttıkça, *C. parapsilosis* olarak tanımlanan izolatların, yakın ancak bağımsız oldukları genetik çalışmalarla gösterilmiş ve üç farklı tür içeren bir tür kompleksi oldukları gösterilmiştir. Bu türler *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* olarak adlandırılmıştır (3).Çoklu bölge sekans tiplendirmesi (“multilocus sequence typing”, MLST),kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi (“restriction fragment length polymorphism”, RFLP) gibi moleküler yöntemler ile bu üç tür birbirlerinden ayırt edilebilmektedir.Yapılan bazı çalışmalar ile ortak atadan gelen *C. metapsilosis*’in en eski tür olduğu ve daha çok çevresel bir mikroorganizma olduğu gösterilmiştir (31, 32).

2.3.Hücresel Özellikler

Mayalar nükleer membranla çevrili bir çekirdek ve bunun içerisinde çekirdekçik yapısı bulunan, sitoplazmasında zarla çevrili organellere ve kompleks bir hücre duvar yapısına sahip ökaryotik hücrelerdir. Bazı maya türlerinde ise bu organellere ek olarak hücre duvarının etrafını saran kapsül yapıları bulunmaktadır (33).

Maya hücre duvarı, çevresel durumlar ve stresler karşısında maya hücresinin canlılığını, şeklini ve stabilitesini koruyan; patogeneizde, morfolojide ve immün yanıtta temel rol oynayan bir organeldir (34). Diğer ökaryotik hücre duvar yapılarından içerik açısından ayrılan bu özgün hücre duvarı, esneyebilir bir yapıda olmasına karşın mekanik olarak oldukça da sağlam olan, dinamik bir yapıdır(35). Duvar yapısı çok tabakalıdır.Çoğunlukla glukan ve kitinin oluşturduğu polisakkaritler ve mannoproteinler ile minör bazı bileşenlerden oluşmaktadır (34, 35). Hücre duvarının içeriğindeki polisakkaritler ve miktarları farklı türlerde ve aynı türün farklı morfolojik formlarında değişiklik gösterebilmektedir (36, 37). *Candida* türlerinde duvar yapıları birbirine çok benzer olmakla beraber, içerik türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. *C. parapsilosis* hücre duvarında kitin ve glukanın daha çok dış yüzeyde yerleştiği ve hücre duvar yapısının daha gözenekli olduğu bildirilmiştir(1).

Mayalarda hücre membranı gliserofosfolipitler, sfingolipidler, steroller ve membran proteinlerinden meydana gelen karmaşık bir yapıdır (38). *Candida* türlerinde hücre membranının akışkanlığını sağlayan yapısal sterol bileşeni ergosteroldür (39). Son yıllarda yapılan çalışmalar, ergosterolün yapısal katkının yanı sıra fungal virülansta da etkisi olduğunu ve bazı mutasyonların fagositik hücrelerde piropitozisi artırarak immün cevabı değiştirebileceği göstermiştir (40, 41). Hücrede yapısal ve işlevsel rolünün öneminden dolayı, ergosterol işlevinin veya sentezinin inhibisyonu antifungaller açısından önemli hedeflerden biridir(42). Ergosterol sentezi yaklaşık 30 enzim aracılığı ile gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Bu enzimlere Erg proteinleri adı verilir (43). Asetil-CoA ile başlayan sentez, mevalonattan skualen, skualenden ise lanosterol oluşumuyla devam eder. Lanosterol,

ergosterolün öncülü olan moleküldür. Son basamaklarda ise Erg 11, Erg 2, Erg 3, Erg 5 gibi enzimler aracılığı ile lanosterolden ergosterol sentezi gerçekleşir(44).

2.4. Fenotipik Özellikler

Candida türleri, değişik morfolojik formlar oluşturabilmektedir. En sık görülen morfolojik formlardan biri olan blastokonidya, oval, tomurcuklanan, $2-5 \times 3-7 \mu\text{m}$ çapında maya hücreleri şeklinde görülmektedir (45). Diğer bir morfolojik form olan psödohif ise, ana maya hücresinden tomurcuklanan yavru hücrenin kopmayarak uzaması ve hücre-hücre bağlantı bölgesinde bir boğumlanma oluşturması sonucunda meydana gelen bir yapıdır. Psödohif yapısının görüntüsü ve uzunluğu gibi özellikler, *Candida* türleri arasında değişkenlik gösterebilmektedir (46). *C. parapsilosiskompleks* tomurcuklanan maya ve psödohif oluşturabilmektedir. Ancak, bugüne kadar gerçek hif oluşturduğu gösterilmemiştir (1).

Candida türlerinin izolasyonu amacıyla rutin olarak Sabouraud dekstroz agar (SDA) kullanılmaktadır. Ekim yapılan besiyerleri 24-48 saat boyunca oda sıcaklığında ($22-25^{\circ}\text{C}$) ya da vücut sıcaklığında ($36\pm 2^{\circ}\text{C}$) inkübe edilebilmektedir. *C. parapsilosiskompleks* ait türlerin kolonileri makroskopik olarak beyaz ya da krem renkli, düzgün veya dantelimsi olabilmektedir (47). Başta sitrülün olmak üzere yapısal aminoasit içeriğinin psödohif yapısını ve koloni morfolojilerini değiştirebildiği gözlenmiştir(48). Antifungallere maruziyet sonrasında da koloni morfolojisinde değişimler görülebilmektedir (26).

2.5. Epidemiyoloji

Mantarlara bağlı gelişen enfeksiyonların dünya çapında 1 milyardan fazla kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Bunların yaklaşık %15-30'unu hayatı tehdit eden ciddi invaziv enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Ağır immün baskılayıcı tedavi gören hasta sayısındaki artış, invaziv mikozların insidansını artırmaktadır (49). Ülkemizde mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisine ilişkin çok merkezli sürveyans verisi bulunmamaktadır. Ancak, Türkiye'den yapılan bir epidemiyolojik modelleme

çalışmasında, her yıl toplam ülke nüfusunun yaklaşık %2,21'nin ciddi mantar hastalıklarından etkilendiği öngörülmüştür(50).

Dünyada en sık görülen invaziv sistemik mikoz etkenleri *Candida* türleridir(2). Bu sistemik mikozların önemli bir parçası olan kandidemilerde en sık karşılaşılan patojen türler, başta *C. albicans* olmak üzere, *C. parapsilosis* kompleksi, *Candida glabrata*, *C. tropicalis* ve *Candida krusei*'dir (11, 22). Kandidemiler genellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda daha fazla görülmekle beraber, sıklıkları diğer servislerde de giderek artmaktadır (51).

C. parapsilosis kompleksin etken olduğu kandidemi, tüm hastalarda sıklıkla görülmekle birlikte pediatrik hastalarda, özellikle yoğun bakımda yatan yenidoğanlarda daha ön plandadır(25). Özellikle damar içi kateter ve benzeri tıbbi araçlara tutunmayı kolaylaştıran kuvvetli biyofilm oluşturabilme yeteneği sebebiyle, invaziv işlem gören hastalarda görülme sıklığı yüksektir(1). *C. parapsilosis*'in ellerde kolonize olabilmesi, sağlık personelinin el hijyeni yetersiz olduğunda, bu mikroorganizma ile gelişebilecek invaziv enfeksiyonlara katkı sağlayabilmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, cerrahi operasyon sonrası gelişen kandidemilerde, *Candida parapsilosis*'in nörocerrahi ve çoklu travma olgularında *C. albicans*'ın ardından en sık görülen tür olması dikkati çekmiştir(52).

C. parapsilosis bazı Asya ülkeleri, Güney Amerika ve bazı güney Avrupa ülkelerinde *C. albicans* sonrasında en sık görülen ikinci kandidemi etkenidir(53). Akdeniz'e kıyısı olan Yunanistan, İtalya, İspanya ve Portekiz gibi Avrupa ülkelerinde *C. parapsilosis* komplekse bağlı invaziv enfeksiyon sıklığı, tüm kandidemi epizodlarının %20-25 ini oluşturmaktadır. Güney Amerika kıtasındaki prevalans artışı ise, Colombia ve Venezuela gibi bazı ülkelerde *C. albicans*'ı geride bırakarak en sık kandidemi etkeni olabilmesini sağlamıştır(1).

Merkezimizde 2009-2018 yılları arasında klinik örneklerde mantar üremelerinin dağılımını inceleyen bir çalışmada kan örneklerinde *C. parapsilosis* kompleks izole edilme oranlarının %14-33 arasında değiştiği gözlenmiştir(54).

2.6. Patogenez

Candida türleri yüzeyel mikozlar, kronik mukokutanöz kandidoz ve ciddi invaziv hastalık gibi çok farklı tablolar ile seyreden enfeksiyonlarda görülebilen fırsatçı patojenlerdir. Patogenez, mikroorganizmanın virülansı ve konak özellikleri başta olmak üzere pek çok faktörden etkilenmektedir(26).

Bu virülans faktörlerinden en önemlisi olan tutunma, konak hücre yüzeylerinde ve medikal aletler kolonizasyonu başlatan en önemli etmendir(55). Tutunmanın gerçekleşmesi biyofilm oluşumuna da zemin hazırlar. Tutunma hücre duvar proteinin konak hücrelerinin ekstraselüler matriksinde bulunan fibronektin, vikronektin ve laminin gibi bazı proteinlerine bağlanması ile meydana gelmektedir (56). İlginç olarak, *C. parapsilosis*'indiger *Candida* türlerine göre adezyon ve biyofilm oluşumu açısından daha yüksek tür içi varyasyon gösterdiği görülmüştür (1, 57).

Tutunma sonrasında, hücrelerin bölünmesi ve çoğalması ile meydana gelen biyofilm, hem patojenitede hem de antifungal ilaçlara direnç gelişiminde önemli rolü olan bir virülans faktörüdür. *C. parapsilosis* kompleks plastik yüzeylere yüksek afinite göstermektedir, glukoz ve yağ içeriği yüksek besiyerlerinde biyofilm oluşturma yeteneği artmaktadır. Bu özelliklerinin total parenteral nütrisyon alan veya damar içi kateteri olan hastalardaki kan dolaşımı enfeksiyonlarında yüksek prevalansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir(45).

Fenotipik değişim, hidrolitik enzimlerin salgılanması, besin kazanımlarına yönelik adaptasyonlar, yağ asitleri ve prostoglandinlerin üretim, gibi virülans faktörleri de patojeniteye katkıda bulunmaktadır (1).

Literatürde ise, *C. parapsilosis* kompleks içinde yer alan üç tür arasında, virülans faktörlerinin üretim ve etkinliği açısından farklılıkların olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Bu türler arasında, en az virülen olan türün *Candida metapsilosis* olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (6, 32, 58).

Candida enfeksiyonlarının gelişmesi için gereken konağa ait faktörler tüm türlerde benzerdir. Bunlar arasında *Candida* türleri ile kolonizasyon, antibiyotik kullanımı, bağışıklık sistemini baskılayan ilaç veya hastalıklar, hematolojik malignite, solid organ tümörleri, direkt damar invazyonuna sebep olan damar içi araç

varlığı, total parenteral nütrisyon, nütropeni, yoğun bakımda uzamış yatış öyküsü, uzun operasyon süresi, hemodiyaliz ve periton diyalizi, ve uç yaş grubunda olmak (neonatal veya yaşlı) sayılabilir(59).

2.7. Klinik

Candida türleri insanda ağız, gastrointestinal sistem ve vajende endojen mikrobiyota üyesi olarak bulunurlar. Bu türler ile gelişen enfeksiyonlar, aft, vulvovajinit, onikomikoz ve kutanöz kandidoz gibi yüzeysel enfeksiyonlardanen sık kandidemi şeklinde görülen fırsatçı invazivenfeksiyonlara kadardeğişebilmektedir(60).

Candida türlerinin endojen flora elemanı olduğu bölgelerde sağlam bir mukozanın varlığı,yüksek mortaliteye sebep olan invaziv enfeksiyonların gelişmesinden koruyucu bir etki göstermektedir. Mukozal bütünlüğün bozulması ya da mukozal immüniteyi etkileyen bağışıklık sorunlarının olması durumunda, invazyon gelişebilmektedir(22, 61).

C. parapsilosiskomplekse ait türler çeşitli klinik tablolar ile kendisini gösteren önemli bir hastane kaynaklı enfeksiyon etkenidirler. Diğer sık görülen*Candida* türlerinden farklı olarak*C. parapsilosis* kompleks sadece endojen olarak değil, horizontal bulaş sonrasında da enfeksiyona neden olabilmektedir. Bubulaş sağlık çalışanlarının elleri, kontamine medikal cihazlar, kateterler, intravenöz sıvılar, prostetik cihazlar vb. ile temas aracılığı ile olabilmektedir. *C. parapsilosis*'in genel invaziv *Candida* enfeksiyonlarına sebep olan risk faktörlerine ek olarak, hiperalimentasyon sıvılarında kolay üremesi, damar içi cihazlara ve prostetik materyallere afinitesinin yüksek olması dolaşım yolu enfeksiyonlarındaki sıklığını artırmaktadır(62).*C. parapsilosis*'inyenidoğanlarda, özellikle düşük doğum ağırlıklı ve yoğun bakım ihtiyacı olanlardasık görülen bir enfeksiyon ajanı olduğu gösterilmiştir(1, 25, 63).

*C. parapsilosiskompleks*in sebep olduğu enfeksiyonlar, onikomikoz, vulvovajinit, otomikoz, oküler enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları, artrit,

peritonit, menenjit, endokardit ve fungemiler olarak sıralanabilir (32). Bu enfeksiyonların seyri diğer türlerin etken olduklarına benzerdir. Ancak, yukarıda bahsedilen bazı predispozan faktörler sebebiyle bazı gruplarda daha sık olarak gelişmektedir (1). *C. parapsilosis* komplekse ait bu türler içerisinde invaziv enfeksiyonlara en sık sebep olan ve en fazla doku hasarıyla seyreden tür *C. parapsilosis sensu stricto*'dur (3, 64). Onu önemli miktarda doku hasarı oluşturma kapasitesi olan *C. orthopsilosis* takip etmektedir (64). *C. orthopsilosis* enfeksiyonlarının kronik böbrek ya da karaciğer yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar ile olan ilişkisinin, *C. parapsilosis sensu stricto*'ya göre daha fazla görüldüğünü öne süren çalışmalar da vardır (65). *C. metapsilosis*'in enfeksiyonlarda görülme sıklığının daha düşük olduğu ve prognozun daha iyi seyirli olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (32, 58, 63).

2.8. Laboratuvar Tanısı

2.8.1 *Candida* Enfeksiyonlarının Tanısı

Candida türlerine bağlı gelişen yüzeysel enfeksiyonlar, doku ve steril bölge enfeksiyonları ve vajinal enfeksiyonların tanısında kullanılacak temel yöntemler, kültür ve direkt mikroskopik/histopatolojik incelemedir. İnvaziv *Candida* enfeksiyonları ve kandidemilerde ise kan kültürü temel tanı yöntemidir (66, 67).

İnvaziv kandidoz ve kandidemilerin tanısında, kan kültürü temel yöntem olsa da, duyarlılığı istenen düzeyde olmadığından, kandidemi tespiti için alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla önerilen serolojik yöntemler bulunmaktadır. Belirli hasta gruplarında serumda mantar hücre duvarı bileşenlerinden 1-3- β -D-glukanın "limulus assay" yöntemiyle tespit edilmesi invaziv bir mantar enfeksiyonunu gösterebilmekte veya dışlayabilmektedir. Bu test *Candida* türlerine özgü değildir, çoğu mantarın etken olduğu mikozda pozitiflik saptanabilmektedir (67). İnvaziv *Candida* enfeksiyonların tanısında "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) yöntemiyle mannan antijeni ve anti-mannan antikorlarının birlikte test edilmesi de önerilmektedir (67, 68).

Kandidemi tanısı için geliştirilen başka yöntemler de bulunmaktadır. Bunlardan biri olan T2 manyetik rezonans testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

ve manyetik rezonansı kombine ederek çalışan ve *ITS2* gen bölgesi mikroorganizma varlığında çoğaltıldığı taktirde, amplikonlara bağlanan manyetik bilyeler ile manyetik rezonans sinyalinin değişiminin ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* ile gelişen kandidemilerin tanısında yüksek bulunmuştur(69, 70).

Moleküler yöntemlerden olan peptid nükleik asit floresan *in situ* hibridizasyon (PNA-FISH) testleri kandidemi tanısında kullanılabilir. Bu testler, mikroorganizmaların varlığında, rRNA sekanslarına *in situ* hibridizasyon ile bağlanan floresan ile işaretlenmiş oligonükleotit probolar kullanmaktadır. “Yeast Traffic Light” testi (AdvanDx, Woburn, ABD) , kan kültürlerinde üreyen en yaygın beş *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*) tespitinde kullanılabilmekte, QuickFISH testi (AdvanDx, Woburn, ABD) ise daha kısa sürede *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*’yı saptayabilmektedir(71, 72). Kandidemi tanısında “multiplex real time / tandem” PZR veya PZR ve dizileme yöntemlerini bir arada kullanan cihazlar mevcuttur. Bu yöntemler için bildirilen duyarlılık ve özgüllük genellikle yüksek olsa da standardizasyon eksikliği, sonuçlarının değişkenliği ve klinik örneklerden nükleik asitlerin ekstraksiyon ve saflaştırılmasındaki zorluklar nedeniyle, henüz tanısal algoritmada bu yöntemlerin yeri tam belirlenmemiştir (73).

2.8.2 *C. parapsilosis* Kompleksin Tür Kompleksi ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde tanımlanması için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasındagerm tüp (çimlenme borusu) testi, mısır unlu Tween 80 besiyerinde morfolojik görünüm, kromojenik agarlar, karbonhidrat asimilasyon/fermentasyon testleri, kütle spektrofotometrisi ve moleküler yöntemler sayılabilir(74).

2.8.2.1 Makroskopik ve Mikroskopik Morfoloji

C. parapsilosis komplekse ait türler SDA’da beyaz ya da krem renkli, düzgün veya dantelimsi koloniler oluştururlar. Mikroskopisinde oval, elipsoid tomurcuklanan maya hücreleri gözlenir. Mısır Unlu Tween 80 besiyerinde 25°C’de üretilerek

mikroskopik morfoloji incelenebilir. *C. parapsilosis* komplekse ait türlerde, 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında tek tek ya da kümeler halinde blastokonidya ve psödohifler gözlenir. Bu tür kompleksinde psödohiflerin karakteristik özelliği, genellikle kısa ve çarpık ya da kavisli yapıda olmalarıdır. Nadir olarak, dev hücre olarak adlandırılan hifal elemanlar da görülebilir (47)

2.8.2.2 Çimlenme Borusu Testi ve Biyokimyasal Özellikler

C. parapsilosis komplekse ait türler gerçek hif üretmediklerinden çimlenme borusu testleri negatiftir. Ayrıca üreaz testi, askospor oluşumu ve fenol oksidaz testleri de negatiftir (26)

C. parapsilosis kompleks, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testlerinde glukozu, maltozu, sukrozu, galaktozu, ksilozu, trehalozu, melezitozu, L-arabinozu, D-mannitolüve 2-K-D-glukronatı oksijenli ortamda tek karbon kaynağı olarak asimile edebilmektedir. L-laktatı, D-glukronatı, mellobiyozu, sellobiyozu, D-arabinozu kullanamamaktadır. Bunun dışında glukozu fermente edebilmekte; laktoz, galaktoz, threaloz, maltoz ve sükrozu ise edememektedir (26, 75).

Rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan fenotipik testler, *C. parapsilosis* kompleks içindeki farklı türleri birbirinden ayırmakta yetersiz kalmaktadır. Bu ayrımın yapılabilmesi için aşağıda ayrıntıları verilen kütle spektrofotometrisi veya nükleik asit temelli yöntemler kullanılmaktadır (3, 76-78).

2.8.2.3 Kütle Spektrofotometrik Yöntemler

Kütle spektrofotometrisi temelli yöntemler mikrobiyolojik tanıda hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak yakın zamanda ortaya çıkmış ve hızla kullanıma girmiştir. Rutin laboratuvarlarda bakteri ve mantarların tanımlanmasında kullanılan matriks aracılı laser desorpsiyon uçuş süresi kütle spektrofotometrisi ("Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrophotometry", MALDI-TOF MS) sistemleri, kütüphanelerinin genişletilmesiyle birlikte *Candida* türlerinin ayrımında başarılı sonuçlar vermeye başlamışlardır (79-81). *C. parapsilosis* kompleks

içerisinde yer alan üç yakın türünde, bu sistemler iletür düzeyinde başarılı bir şekilde tanımlandığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (76, 82)

2.8.2.4 Moleküler Yöntemler

C. parapsilosis komplekse ait türlerdeoksiribonükleik asit (DNA) içinde belirli gen bölgelerinin incelenmesi ile birbirlerinden ayrılabilir. Bunun için, istenen bölge PZR ile çoğaltılmakta ve gendeki farklılıklar tespit edilerek yorumlanmaktadır(63).Sık kullanılan yöntemler içerisinde ribozomal DNA'yı kodlayan“internal trcribed space”(ITS) bölgesinin PZR ile çoğaltılıp baz diziliminin belirlenmesi ve referans suşlarla karşılaştırılması ya da PZR ürününün RFLP ile incelenmesi sayılabilir(3, 63, 83). Sekonder alkol dehidrogenaz (*SADH*) geninin PZR ile çoğaltılarak, RFLP ile incelenmesi ise görece daha ucuz, hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak önerilmiştir(3, 5, 84). MLST yöntemi ile ayırım yapan çalışmalar da bulunmakla birlikte, bu yöntem pahalı ve zaman alıcıdır(3). Bunlar dışında amplifiye edilen fragmanların uzunluk polimorfizmi (“amplified fragment length polymorphism”, ALFP)analizi, mikrosatellit analizleri ve 28S ribozomal RNA'nınbüyük altbirim (“large subunit”, LSU) kısmındaki D1/D2 genlerinde baz diziliminin incelenmesigibi yöntemler de kullanılabilmektedir(63, 85).

2.9. *Candida* Türleri ile Gelişen Enfeksiyonların Tedavisinde Kullanılan Antifungal Ajanlar

2.9.1. Azoller

Azoller lokal ya da sistemik olarak kullanılabilen,yapılarında N-karbon ucunda tutunan bir imidazol ya da triazol halkası bulunduran sentetik bileşiklerdir. İmidazol halkası içeren formlar oral biyoyararlanımlarının düşük olması ve önemli sistemik yan etkileri sebebiyle,daha çokmukokutanöz enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar. Sistemik enfeksiyonlar için isetriazol halkası içeren azoller tercih edilmektedir (70, 86). Azoller, sitokrom P-450 enzimine bağlı olan 14- α -sterol demetilazı (lanosterol demetilaz) inhibe ederler. Bu enzim, mantar hücre membranının önemli bileşenlerinden ergosterolün, lanostroiden sentezinde rol alan bir enzimdir (70, 86, 87). Bu enzimin inhibisyonu ile ergosterol üretimi azalırken aynı zamanda toksik steroller membranda birikir ve membran yapı ve işlevi bozulur

(86).Ayrıca ergosterolün membran gelişimine uyarıcı etkisi engellenir. Sonuç olarak fungal gelişim durur yani azol grubu ilaçlar fungistatik etki gösterirler(87).Bazı durumlarda, örneğin *Aspergillus* türleri ve bazı küflerde doza bağlı fungisidal etki gözlenebilmektedir(86).

2.9.1.1. Flukonazol

Flukonazol, oral ve intravenöz formu bulunan iyi oral biyoyararlanım gösteren, beyin omurilik sıvısı ve vitreus dahil olmak üzere çoğu dokuda iyi penetrasyonu olan, ucuz ve az sayıda yan etki gözlenen bir azoldür. Azoller arasında en dar spektruma sahip ilaç olmakla beraber, *Candida* türleri ile meydana gelen invaziv enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır(88, 89).Ancak, bazı türlere etkisi sınırlıdır. Bunlara *C.krusei*'de doğal direnç ve *C. glabrata*'da azalmış duyarlılık gözlenmesi örnek olarak verilebilir(70, 90).

2.9.1.2. Vorikonazol

Vorikonazol, geniş spektrumlu, oral ve intravenöz formu bulunan, oral biyoyararlanımı yüksek bir azoldür.İnvaziv veya dissemine *Candida* enfeksiyonlarında kullanılabilmekle birlikte, diğer seçenek olan flukonazole göre daha az tercih edilmektedir. Bunun nedeni hastalar arası ciddi serum konsantrasyon farklılıkları gösterebilmesi, ilaç etkileşimi ve yan etki profili daha yüksek bir ilaç olmasıdır (70, 86, 91).

2.9.1.3. Posakonazol

Posakonazol, geniş spektrumlu bir antifungal ajandır. İlk başta sadece solüsyon formu bulunurken, daha iyi oral biyoyararlanıma sahip tablet formu ve intravenöz formu da invaziv fungal enfeksiyonların tedavi ve profilaksisinde onay almış ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür (42, 91, 92). Posakonazol, *Candida* türlerine oldukça etkilidir.Flukonazol, itraconazol ve vorikonazole dirençli *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyonlarda da etkili olabilmektedir(86).

2.9.1.4. İtrakonazol

İtrakonazol, oral solüsyon ve kapsül formülasyonları bulunan, geniş spektrumlu bir azol grubu ilaçtır. *C. glabrata* dışındaki *Candida* türlerine etkilidir. Ancak, intravenöz formunun piyasadan çekilmesi ve oral formunun uygulanması sırasında hastalar arası serum konsantrasyonlarının çok farklı seyretmesi nedeniyle kullanım alanı genellikle mukokutanöz *Candida* enfeksiyonlarının tedavisi ile sınırlanmıştır (70).

2.9.2. Ekinokandinler

Ekinokandinler, hücre duvarındaki en önemli komponentlerden biri olan glukanın sentezinde görevli olan 1,3- β -D-glukan sentaz enzimini yarışmasız inhibe ederler. Glukan, insan hücre duvarı yapısında bulunmadığından, ekinokandinler düşük toksisite gösteren ve aynı zamanda geniş spektrumlu olan, biyofilmler üzerinde de etkili olan ilaçlardır (86, 93). Ekinokandinler, *Candida* türleri üzerinde fungisidal etki gösterirler (94).

Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin invaziv fungemiler ve kateter ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilmektedir. Mikafungin için ayrıca allojenik kök hücre nakli olan hastalarda fungal enfeksiyonların profilaksisi için yüksek öneri düzeyi bulunmaktadır (8, 89, 95).

Ekinokandinlerin *Candida* türlerine etkinliği genel olarak yüksek olmakla birlikte *C. parapsilosis* komplekse ait türlerin de dahil olduğu bazı türlerde minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri daha yüksek bulunmaktadır (11, 95). *FKS1* gen bölgesinde doğal olarak meydana gelen P660A aminoasit değişiminin *C. parapsilosis* kompleks türlerine ait bazı izolatlarda azalmış duyarlılık fenotipine sebep olduğu gösterilmiştir (96). Bununla birlikte, türe özgü direnç sınır değerlerine göre duyarlı bulunan suşlarda ekinokandin kullanımı ile tedavi başarısı bildirilmiştir. Ancak, tedavi sırasında kazanılmış direnç gelişme olasılığı ve lokal epidemiyolojik veriler göz önünde tutulmalıdır (8).

2.9.3 Amfoterisin B

Amfoterisin B, polien grubu bir antifungaldır. Membrandaki ergosterole bağlanarak membranın bariyer işlevini bozar ve hücre içeriğinin dışarı çıkmasını sağlayarak etki eder. Ayrıca oksidatif etki göstererek membran hasarına da katkıda bulunur. Amfoterisin B, *Candida* türleri üzerinde fungisidal etki gösterir (97). Amfoterisin B deoksikolatin serum konsantrasyonu düşük seyredabilmektedir ve renal hasar riski nedeniyle yenidoğan dışında kullanımı sınırlıdır. Renal hasarı azaltmak için geliştirilen lipid formülasyonlardan biri olan lipozomal amfoterisin B, daha yüksek serum konsantrasyonlarına ulaşabilmektedir. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde lipozomal amfoterisin B kullanılabilmektedir (8, 9, 88, 89, 98).

2.10. İnvaziv Kandidemilerin Tedavisi

Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan azollerin (flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itraconazol) ve amfoterisin B'nin *C. parapsilosis* komplekse ait türlere olan etkinliği oldukça iyidir. Ekinokandinlerin etkinliği ise azoller ve amfoterisin B'ye göre daha az olmakla beraber, iyi düzeydedir (86). Nötropenik olmayan hasta grubunda azoller ve ekinokandinler altta yatan çeşitli klinik durumlarda, erişkin hastalarda invaziv fungal enfeksiyon profilaksisinde ve tedavisinde kullanılabilecek ilk sıra ilaçlardır (9, 89, 98). *C. parapsilosis* komplekse bağlı gelişen invaziv enfeksiyonlarda ekinokandin kullanımına, etkinlik daha düşük olabileceğinden lokal epidemiyolojik verilere göre karar verilmelidir (98). Ayrıca, en sık kullanılan azol olan flukonazolde dahil azollere kazanılmış direnç gelişimi gözlenebildiği için kılavuzlarda bazı hasta gruplarında ekinokandin veya amfoterisin B önerilebilmektedir (8, 9, 89).

2.11. Antifungal Duyarlılık Testleri

Candida enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antifungal ilaçların seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerinin (AFDT) yararı bilinmektedir. Bu amaçla, standart referans yöntemler ile mikroorganizmanın üremesini gerekli düzeyde inhibe eden konsantrasyon belirlenmekte ve elde edilen MİK değeri türe özgü duyarlılık sınır değerleri ile karşılaştırılmaktadır (99, 100). *Candida* türleri ile gelişen tüm invaziv enfeksiyonlarda, etken AFDT yapılması

önerilmektedir (1). Bu enfeksiyonlarda MİK değeri belirlemek için önerilen standart referans yöntemler sıvı mikrodilüsyon testleridir (100, 101). AFDT için ilk standardizasyon çalışmalarına Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) başlamıştır ve standartlar güncellenmeye devam etmektedir (102). Ayrıca, Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) Avrupa'daki insan gücünü bu amaçla bir araya getirmiştir. Diğer in vitro antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yanı sıra AFDT'nin de standardizasyonu, epidemiyolojik ve klinik sınır değerlerin belirlenmesi için çalışmaktadır (103). Bu testler dışında gradiyent difüzyon testleri veya otomatize sistemler de kullanılabilmektedir (101). Ancak, bu testler için teste özgü sınır değerler bulunmamaktadır.

EUCAST ve CLSI rehberlerinde önerilen referans yöntemlerinin farklılıkları bulunmaktadır. Mayalar için bu farklılıklar Tablo 2.1'de verilmiştir (102, 103).

Tablo 2.1: Mayalar için önerilen referans antifungal duyarlılık testlerindeki farklılıklar*

Özellikler	EUCAST	CLSI
İnokulum miktarı (Son konsantrasyon)	0,5-2,5 x 10 ⁵ hücre/ml	0,5-2,5 x 10 ³ hücre/ml
Kullanılan besiyeri	%2 glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri, L-glutamin katkılı, MOPS içeren	%0,2 glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri, L-glutamin katkılı, MOPS içeren
Mikroplak Özellikleri	Düz Tabanlı	U tabanlı
Hazır Plak Saklama Süreleri (kapalı plastik poşette veya alüminyum folyoya sarılı olarak)	-70 °C'de 6 ay ya da -20 °C'de <1 ay	-70 °C'de 6 ay

İnkübasyon Süresi	18-24 saat	24-48 saat
Okuma	Spektrofotometrik	Gözle/Spektrofotometrik
Okumada kullanılan inhibisyon miktarı	Amfoterisin B için $\geq$ %90 Azoller,ekinokandinler ve flusitozin için $>$ %50	Amfoterisin B için %100 Azoller ve ekinokandinler için $>$ %50

*Kaynak 102 ve 103'ten derlenmiştir.

Standardize sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilenin vitro MİK değerleri, rehberlerdeki epidemiyolojik eşik değerler (epidemiological cut-off value, ECV) ve klinik eşik değerler ile karşılaştırılarak duyarlılık değerlendirilmektedir. ECV, sokak tipi (wild type, WT) suşların %97,5 veya %99,0'unun altında olduğu MİK değerini göstermekte ve büyük olasılıkla direnç mutasyonu gelişmediğine işaret etmektedir. Sokak tipi olmayan (non-WT) suşlarda ise ilgili MİK değeri ECV'nin üzerinde bulunmakta ve direnç mutasyonu varlığını ile ilişkilendirilebilmektedir. Bu durum kazanılmış dirence neden olabilmektedir (57, 104). Klinik eşik değeri ise izolatin neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde ilgili antifungalın kullanılması durumunda tedavi başarısını tahmin etmek için kullanılmaktadır. Klinik eşik değeri ve ECV kavramları tam olarak örtüşmemektedir. Non-WT bir suş, in vitro olarak duyarlı olabilmekte ve tedaviye iyi yanıt verebilmektedir (105).

2.12. Azollere Olan Direncin Mekanizmaları

Azol grubu ilaçların hedefi olan lanosterol demetilaz enzimini kodlayan gen *ERG11* olarak adlandırılmaktadır. *Candida* türlerinde azollere karşı kazanılmış direnç oranları düşük seyretmekteyse de, genellikle non-albicans türlerde direnç geliştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (105, 106). Duyarlı bir popülasyonun azollere maruziyeti arttıkça, direncin ortaya çıkmasına sebep olan mutasyonlar da artmaktadır (1, 107).

Candida türlerinde kazanılmış azol direncinin altında üç ana mekanizma yatmaktadır:

1. İlacı taşıyan dışa atım pompalarının aşırı ekspresyonu ("up-regulation"),

2. *ERG11* genindeki bazı mutasyonlara bağlı olarak hedef enzim lanosterol demetilazda değişim ve ilacın bağlanmasında azalma ya da enzim sentezinin artması,

3. *ERG3* geninde mutasyon sonucu fungal hücre membranında meydana gelen değişimler(11).

C. parapsilosis kompleks izolatlarında azol direnç oranları genellikle düşük olmasına rağmen, son yıllarda artış bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bu tür kompleksinde de azollere karşı gelişen direncin altında yatan moleküler mekanizmaların *C. albicans* ile benzer olduğu da görülmüştür(58, 108, 109).

2.12.1. Dışa Atım Pompalarına Bağlı Mekanizmalar

Candida türlerinde azollere dirence katkı sağlayan iki dışa atım pompası grubu yer almaktadır. Bunlar, ATP-bağlayan kaset (“ATP binding cassette”, ABC) ve ana kolaylaştırıcı süper aile (“major facilitator superfamily”, MFS) taşıyıcılarıdır(106). ABC taşıyıcı ailesinden Cdr1p ve Cdr2p ile MFS taşıyıcı ailesinden CaMDR1p dışa atım pompaları, *Candida* türlerinde azol direncine katkı sağlamaktadır(110). Bu pompaların üretilmesini sağlayan *CDR* ve *MDR* genlerinin ifadesindeki artış, direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır(10). Bu durum, sırasıyla *CDR1/CDR2* ve *MDR1* genleri transkripsiyon faktörü olan *TAC1* ve *MRR1* genlerindeki mutasyonlara bağlıdır. Ancak, bu etkinin *C. parapsilosis*’te *C. albicans*’a göre daha az olduğu ve genelde ılımlı bir MİK artışına sebep olduğu bildirilmiştir (111).

2.12.2. Erg11 Enzimine Bağlı Mekanizmalar

ERG11 geni, fungal hücre membranına bileşenlerinden biri olan ergosterolün sentezinde rol oynamaktadır. Bu genin aşırı ifadenmesi sonucunda azollere direnç geliştiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır(10, 112, 113). *C. parapsilosis* türlerinde *ERG11* geninin ana düzenleyicileri Upc2 ve Ndt80

transkripsiyon faktörleridir. Azol direnci bu transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler veya *ERG11* genindeki mutasyonlar ile meydana gelmektedir (112). Bunlara sık görülen bir örnek olarak *ERG11* geninde Y132F aminoasit değişikliğine neden olan nokta mutasyonu verilebilir. Bu mutasyonlar enzimde ilacın bağlandığı bölgeyi değiştirerek direnç gelişimine neden olmaktadır(11).

2.12.3. Erg3 Enzimine Bağlı Mekanizmalar

ERG3 geni, ergosterol sentezinde rol oynayan C-5 sterol desatüراز enzimini kodlamaktadır. Bu enzimde meydana gelen G111R aminoasit değişikliği, *C. parapsilosis* izolatlarında membran sterol içeriğini değiştirerek, yüksek düzeyde azol ve orta düzeyde ekinokandin direnci ile ilişkili olabilmektedir(114).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. İzolatların Seçimi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde 1997-2017 yılları arasında Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen periferik kan ve kateter kanı örneklerinin kültürlerinden elde edilen ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda *C. parapsilosis* olarak raporlanan izolatlardan stok kültürlerinden üretilenler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatlar, rutin laboratuvar işlemleri sırasında germ tüp testi negatifliği, mısır unlu Tween 80 agarda uygun morfolojik görünüm ve ID32C kiti (BioMerieux, Fransa) ile elde edilen karbonhidrat asimilasyon testi profillerine göre tanımlanmışlardır. Stoklar gliserollü beyin kalp infüzyon buyyonu içinde -20°C'de saklanmıştır. Stoklanmış izolatlar SDA'ya ekilerek 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve yeniden canlandırılmıştır. Üreyen suşlarda saflık kontrolü yapılmış ve gerekli görüldüğü durumlarda mısır unlu Tween 80 agardaki morfoloji yeniden test edilmiştir. Antifungal tedavi sırasında azol direnci gelişen izolatların atlanmaması amacı ile aynı hastadan izole edilen ardışık izolatların tamamına antifungal duyarlılık testi yapılmıştır. Aynı hastadan duyarlı ve dirençli izolatlar tespit edilmesi durumunda, bu durum değerlendirilmede belirtilmiştir.

3.2. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması

Bu amaçla *SADH* geninin PZR ile çoğaltılarak RFLP ile incelenmesi yöntemi kullanılmıştır (3). Bu yöntem ile teknik sorunlar nedeniyle sonuç elde edilemeyen durumlarda *ITS* geni dizilenmesi ile tür tanısı kesinleştirilmiştir (30, 115, 116). Tür düzeyinde tanı için kullanılan primerler ve özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Tür düzeyinde tanıda kullanılan primerler ve özellikleri

Primer Adı	Primer Dizisi	Çoğalttığı Gen Bölgesi	Bağlanma Sıcaklığı (Tm)	Amplikon Uzunluğu (bp)
SADH F	5_-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3	<i>SADH</i>	58	716
SADH R	5_-CAATGCCAAATCTCCCAA-3	<i>SADH</i>	58	
ITS1-F	5_-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3	<i>ITS</i>	65	520
ITS4-R	5_- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3	<i>ITS</i>	58	

3.2.1 DNA Ekstraksiyonu

DNA elde edebilmek için iki yöntem kullanılmıştır. İlk olarak uygulama kolaylığı, toksik madde kullanımı gerektirmemesi ve maliyet etkinliği sebebi ile kaynatma yöntemi ile DNA elde edilmiştir. PZR yönteminde kullanıldığında yeterli netlikte bant elde edilemediğinde, ilgili izolattan fenol kloroform yöntemi ile ikinci bir ekstraksiyon yapılmış ve bu DNA ekstresi kullanılmıştır.

Kaynatma yöntemi için literatürde verilen yöntem biraz modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır(117):

1. Stoklardan canlandırılan izolatlar SDA'ya pasajlanmış ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.
2. Steril mikrosantrifüj tüplerine 20 µl steril distile su konmuş ve üzerlerine bir koloni eşdeğeri maya hücresi eklenerek homojenize edilmiştir.
3. Maya süspansiyonu içeren tüpler 8 dakika 95°C'ye getirilmiş ısı bloğunda bekletilmiştir.
4. Tüpler ısı bloğundan alınarak -80 °C'ye konmuş ve 1 saat burada bırakılmıştır.

5. Ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen DNA hemen kullanılmayacaksa - 20 °C’de saklanmıştır.

Gerektiğinde ikinci DNA ekstraksiyonu yöntemi olarak kullanılan fenol-kloroform ile ekstraksiyon,aşağıdaki adımlardaki şekilde uygulanmıştır(3, 118):

1. İzolatların üretilmesi amacıyla Maya Özütü Peptonlu Dekstroz (“Yeast Peptone Dextrose”, YPD) sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Bunun için 2 g glukoz, 2 g mikrobiyolojik pepton ve 1 g maya ekstresi 1 litre distile suya eklenmiş, homojenize edilmiş ve otoklavda sterillemiştir.
2. Steril mikrosantifüj tüpü içindeki 1 ml YPD sıvı besiyerine 1-3 adet maya kolonisi konularak 30°C’de bir gece inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası mikrosantrifüj tüpü 20000 g’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atılmıştır.
4. Kalan pellete 200 µl parçalama tamponu (“lysis buffer”,100 m M Tris-HCl (pH: 8,0), %2 Triton-X-100, % 1 sodyum dodesil sülfat, 1m M EDTA), 200 µl fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı (25/24/1 oranında) ve steril cam boncuklar (0,3 g’lık,asitle muamele edilmiş, 0,45-0,52 mm çaplı), eklenerek 10 dakika vortekslenmiştir.
5. Vorteks sonrası karışım 20000 g’de 10 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatant faz alınmıştır.
6. Alınan kısma 1 ml saf etanol eklenerek 20000 g’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Tüm sıvı alınarak mikrosantifüj tüpleri kurumaya bırakılmıştır.
7. İçlerindeki etanol tamamen uçtuktan sonra tüplere 400 µl Tris-EDTA ve 5µlRNaz (10 mg/ml) eklenerek karışım vortekslenmiş ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.
8. Karışıma tekrar 1 ml saf etanol eklenmiş, 2 dakika 20000 g’de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüp içindeki sıvı tamamen kuruduktan sonra kalan çökelti üzerine 100 µl Tris-EDTA eklenmiş ve homojenize edilmiştir.
9. Elde edilen DNA ekstresi kullanım öncesinde -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.2 Sekonder Alkol Dehidrogenaz Geninin PZR ile Çoğaltılması

İzolatlara tür düzeyinde tanımlama yapabilmek için ilk aşamada *SADH* genini (GenBank erişim No: AB010636) hedefleyen bir PZR gerçekleştirilmiştir. Bunun için Tablo 3.1'deki primerler kullanılarak 716 baz çiftlik bir ürün elde edilmiştir(3). *SADH* PZR için kullanılan bileşen miktarları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarında *SADH* gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu için kullanılan bileşen miktarları.

Bileşenler	Miktarlar Ml
Taq DNA Polimeraz (5U/ µl)	0,125
10X Tampon Çözeltisi (1,5 mM MgCl ₂ içeren)	3,0
2,5 mM MgCl ₂	0,125
dNTP Mix (10 mM)	0,6
Primer,“Forward” (10 pmol/µl)	1,2
Primer,“Reverse” (10 pmol/µl)	1,2
Kalıp DNA	1,0
DNAaz, RNaz içermeyen su	22,75
Toplam hacim	30,0

PZR karışımı hazırlandıktan sonra termal döngü cihazı kullanılarak *SADH* geni çoğaltılmıştır. Bunun için kullanılan termal döngü cihazı ayarları Tablo 3.3'te verilmiştir (3).

Tablo 3.3 *SADH* geni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri

Döngüler	Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk	İlk denatürasyon	94°C	7 dakika
35 tekrar	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Bağlanma (“Annealing”)	58°C	60 saniye
	Elongasyon	72°C	90 saniye
Son	Son elongasyon	72°C	5 dakika
	Saklama	4 °C	Sonsuz

3.2.3 RFLP ve Elektroforez

Elde edilen *SADH* geni PZR ürünü BanI enzimi ile kesilerek elde edilen fragmanlar incelenmiş ve *C. parapsilosis* komplekse ait türlerin ayrımı yapılmıştır(3, 118).

PZR ürününün kesimi için yapılan reaksiyonda kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Her izolat için elde edilen karışım 37°C'de 90 dakika inkübe edilerek kesim gerçekleştirilmiş ve sonra 65°C'de 20 dakika bekletilerek restriksiyon enzimi inaktive edilmiştir.

Tablo 3.4 *SADH* geni PZR ürününü BanI ile kesimi için gerekli bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar (μl)
10 X tampon çözelti	2
Su	6
Ban I (10 U/ μl)	2
PZR ürünü	10
Toplam hacim	20

Oluşan fragmanların uzunluk analizlerinin yapılabilmesi için kesim ürünlerinin %2 agaroz içeren jelde elektroforezi yapılmıştır. Bunun için 2 g agaroz, 100 ml 1X TrisboratEDTA (TBE) [10x TBE için: 108 g Tris baz, 55 g boric asit, 40 ml 0,5M EDTA (pH: 8,0)] çözeltisinde homojenize edilmiş ve mikrodalga fırında eritilmiştir. Eriyen çözeltiye 5 μl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiş, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dökülmüş ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Katılaştıran jelTBE içeren elektroforez tankına yerleştirilerek kesimi yapılmış PZR ürünlerinin yüklenmesine hazır hale getirilmiştir. Her bir kuyucuğa 5 μl örnek ve bir kuyucuğa 5 μl 100 baz çifti aralıklı DNA büyüklük belirteci (Gene Ruler 100 bp PlusDNA ladder", Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) yüklenmiş ve örnekler 100 Volt'luk doğru akımda (Owl Lightning Volt OSP-300, ABD) 30 dakika

yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel, ultraviyole ışıklı görüntüleme cihazında (Geliance 600 Imaging System, Perkin Elmer, ABD) incelenmiştir.

Tür düzeyinde tanımlama şu şekilde yapılmıştır:

C. parapsilosissensu stricto:196. baz hizasından kesim nedeniyle iki parça.

C. orthopsilosis:Kesim bölgesi olmadığından 716 bp uzunluğunda tek parça.

C. metapsilosis: 96, 469. ve 529. baz hizasından 3 farklı kesim nedeniyle 4 parça.

Bu yöntem ile tür tayini sırasında kontrol suşları olarak *C. parapsilosis* AM2001/0013, *C. orthopsilosis* J981226 ve *C. metapsilosis* J960161 suşları kullanılmıştır (57).

3.2.4 ITS Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

Tür ayrımı için *SADH* geninin RFPF ile değerlendirilmesinde teknik sorun yaşanan izolatlarda *ITS* geni baz dizisinin incelenmesi ile tür ayrımı yapılmıştır. Ayrıca *C. parapsilosissensu stricto* dışında tür tanısı yapıldığında doğrulama için de *ITS* geni dizisi incelenmiştir. *ITS* geninin çoğaltılması için, Tablo 3.1’de belirtilen ITS1-F ve ITS4-R primerleri ve reaksiyon bileşeni olarak ise Tablo 3.2’deki bileşenler kullanılmıştır. Amplifikasyon için kullanılan koşullar Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.5ITSgeni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri.

Döngüler	Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk	İlk denatürasyon	94°C	7 dakika
35 tekrar	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Bağlanma (“Annealing”)	60°C	60 saniye
	Elongasyon	72°C	90 saniye
Son	Son elongasyon	72°C	5 dakika
	Saklama	4°C	Sonsuz

Elde edilen PZR ürününün baz dizilimleri Sanger sekanslama yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, elde edilen PZR ürünleri üretici firmanın önerileri

doğrultusunda PureLink PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürünlerin her biri için ilgili primerler kullanılarak BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı ile baz dizilimleri çıkarılmıştır. Elde edilen baz dizilerinin kalitesi, kromatogramlardaki pikler incelenerek kontrol edilmiştir. Bunun için Bioedit 7.2.5 Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics, ABD) kullanılmıştır. Belirgin pik elde edilememesi durumunda yeni PZR ürünü ile yeniden dizi belirlenmiştir. Elde edilen diziler National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesinde kayıtlı DNA dizileri ile karşılaştırılmış ve tür tanısı yapılmıştır. Bu amaçla Q skoru (“Query cover”), E skoru (“Expect Value”) ve I skoru (“Identity score”) temel alınmıştır. Veri tabanı ile karşılaştırıldığında Q skoru %100’e ve E skoru 0’a en yakın olan, ayrıca I skoru karşılaştırılan sekans ile en az %95 olmak üzere en yüksek düzeyde benzerlik gösteren dizi ile karşılaştırılan dizi aynı tür olarak tanımlanmıştır(119).

3.3 İzolatların in vitro Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların flukonazol, vorikonazol ve posakonazole karşı in vitro duyarlılıkları EUCAST önerilerine göre test edilmiştir. Bu amaçla yapılan tüm testler, EUCAST EDef 7.3.1 Son Doküman, Mayalar İçin Antifungal İlaçların Sıvı Dilüsyonla Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarını Belirleme Yöntemi önerileri doğrultusunda yapılmıştır(120).

3.3.1 Mikroplak Özellikleri

Sıvı mikrodilüsyon testi, öneriler doğrultusunda doku kültürü için muamele edilmiş, düz tabanlı 96 kuyucuklu sterilmikroplaklar (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avusturya) kullanılmıştır.

3.3.2. Besiyeri Özellikleri

Antifungal duyarlılık testi için L-glutamin ve %2 glukoz içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin hazırlanması için 900 ml distile suya 10,4 g toz RPMI 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) ve 34,53 g MOPS tamponu (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) ve 18 g glukoz

eklenmiştir. Besiyeri pH'ı 1 M (%4'lük) NaOH çözeltisi ile 7-7,2'ye ayarlanmış veson hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenmiştir. Çözelti 22 µm por çaplı filtreden (Sartolab, Almanya) geçirilerek steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

3.3.3 Antifungal Ajanlar

Antifungal duyarlılık testlerinde kullanılan flukonazol (Pfizer, İrlanda), posakonazol (Merck Sharp & Dohme, ABD) ve vorikonazol (Pfizer, İrlanda) toz şeklinde temin edilmiştir. İstenilen konsantrasyonlara ulaşmak için test edilen tüm azollerde çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır.

İstenilen konsantrasyondaki stok solüsyonlarını hazırlamak için gerekli olan hacim miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

Çözücü Hacmi (ml): Antifungal toz (mg) x Potens (µg/ml) / istenen antifungal konsantrasyonu (µg/ml).

Tamamen çözünen antifungal stok solüsyonları, mikrosantifüj tüplerine bir seferde kullanılacak miktarlarda bölünmüş ve -70°C'de saklanmıştır. Plak hazırlama için sonraki 6 ay içinde kullanılmış ve her tüp yalnızca bir kez eritilmiştir.

3.3.4 Plak Hazırlığı

Antifungal duyarlılık testi için mikrop plaklar EUCAST önerilerine uygun şekilde manuel olarak hazırlanmıştır. Mikrop plakların ilk 10 sütununda RPMI besiyeri içinde ilgili konsantrasyonda hazırlanan antifungal solüsyonu dağıtılmış, 11. ve 12. sütunlara sadece RPMI besiyeri konmuştur. Kalite kontrolü için 11. sütun üreme kontrolü, 12. sütun ise besiyeri sterilit kontrolü olarak ayrılmıştır. Hazırlanan plaklar -70°C'de 6 ayı geçmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.3.5 İnokulum Hazırlanması

Çalışılacak olan izolatlar SDA'ya pasajlanmış ve 18-24 saat 35±2°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan plaklardan alınan koloniler, en az 3 ml steril distile su içerisinde homojenize edildikten sonra, oluşan bulanıklık spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda %78-80 arasında (absorbans 0,08-0,13) ayarlanmıştır. Bu şekilde elde edilen süspansiyonda 1-5 x 10⁶ hücre/ml

inokulumu elde edilmiştir. Daha sonra bu süspansiyondan 0,5 ml alınarak, 4,5 ml steril distile suya eklenmiştir ve böylece maya süspansiyonunda $1-5 \times 10^5$ hücre/ml bulunması sağlanmıştır.

3.3.6 Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu ve Değerlendirme

Daha önce hazırlanıp dondurulan plaklar, oda sıcaklığında eritilmiştir. Her bir suştan hazırlanan süspansiyon her bir satırdaki ilk 11 kuyucuğa dağıtılmıştır. 12. kuyucuk besiyeri kontrolü olarak kullanıldığından bu kuyucuklara inokulum eklenmemiştir. İnokülasyonu tamamlanan plaklar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar spektrofotometrik mikropalak okuyucu (BioTek Epoch, USA) ile 530 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir. Kontrol kuyucuğundaki üremeye göre $>50\%$ oranında inhibisyonun gerçekleştiği en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak alınmıştır. MİK sonuçları EUCAST'in mayalar için belirlediği klinik eşik değer standartları dokümanına göre değerlendirilmiştir (103).

3.3.7. Kalite kontrol

Antifungal duyarlılık testlerinde her antifungal için her çalışma gününde *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parasilosis* ATCC 22019 suşları çalışmaya dahil edilmiştir.

3.4 Test Edilen Azollere Artmış Dozda Duyarlı ve Dirençli İzolatlarda Direncin Moleküler Mekanizmalarının Belirlenmesi

Azol duyarlılık sınırını aştığı belirlenen izolatlarda direncin moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak amacıyla *ERG11* ve *MRR1* gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve baz dizilimleri belirlenmiştir(10). Bu amaçla kullanılan primerler ve özellikleri Tablo 3.6'da verilmiştir. Elde edilen diziler referans genler ile karşılaştırılarak mutasyonlar taranmış, tespit edilen mutasyonların aminoasit dizilimine etkisi belirlenmiştir. Aminoasit dizilimini değiştiği durumlarda, suşun azol MİK değerleri kontrol edilmiş ve ilgili mutasyonun literatürde azol direnci ile ilişkilendirilip ilişkilendirilmediği araştırılmıştır.

Tablo 3.6 *ERG11* ve *MRR1* gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer Adı	Primer Dizisi	Çoğalttığı Gen Bölgesi	Bağlanma Sıcaklığı (Tm)	Amplikon Uzunluğu (bp)
ERG11-F1F	5_TAGTGGGATCGGTGG ATCTT-3	<i>ERG11</i>	60	768
ERG11-F2R	5_CTTTATCTAAATCAGC ATACAATT GAG-3	<i>ERG11</i>	60	
ERG11-F3F	5_TCTAGATCCTTATTAG GAGAAGCATG-3	<i>ERG11</i>	60	982
ERG11-F4R	5_ACTGACTCCTGCCCTC AGATT-3	<i>ERG11</i>	60	
MRR1- F1F	5_CTGTATGGAGAGTGA GATTTTAGGTT-3	<i>MRR1</i>	60	1700
MRR1-F3R	5_TCCTTGTTACCTCAT TGCTC-3	<i>MRR1</i>	60	
MRR1-F4F	5_ATGGAGACCATTAATT TTTTTGACA-3	<i>MRR1</i>	60	1798
MRR1-F6R	5_GAATGACTTCATTGAA ATGTAATGCT-3	<i>MRR1</i>	60	
MRR1-F7F	5_AAGAAAATTCTTAGCT TAACTGGA-3	<i>MRR1</i>	53	1811
MRR1-F9R	5_AGAAAATCTAATTGG TAAAGAAGAAAGGA-3	<i>MRR1</i>	53	

3.4.1. *ERG11* Geninin PZR ile Çoğaltılması

ERG11 gen bölgesi 1569 baz çiftinden meydana gelmektedir. Bu gen, sekans sonuçları birleştirilerek değerlendirmek üzere, sırasıyla 768 ve 982 baz çiftlik iki parça halinde iki farklı primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Kullanılan

primerler Tablo 3.6’da verilmiştir(10). PZR için kullanılan bileşenler Tablo 3.1’de, termal döngü koşulları Tablo 3.5’te verilmiştir.

3.4.2. *MRR1* Geninin PZR İle Çoğaltılması

MRR1 gen bölgesi 3387 baz çiftinden oluşmaktadır Nükleik asit dizisini belirlemek için PZR ile üç farklı primer çifti kullanılarak 1700, 1798 ve 1811 baz çiftlik üç parça halinde çoğaltılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3.6’da verilmiştir(10). PZR için kullanılan bileşenler Tablo 3.1’de verilmiştir. PZR için kullanılan sıcaklık döngüleri “annealing” sıcaklığı 53°C olan 3. reaksiyon dışında Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7 *MRR1* geni amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngüleri.

Döngüler	Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk	İlk denatürasyon	94°C	7 dakika
35 tekrar	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Bağlanma (“Annealing”)	60°C	75 saniye
	Elongasyon	72°C	90 saniye
Son	Son elongasyon	72°C	5 dakika
	Saklama	4°C	Sonsuz

3.4.3 DNA Dizi Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

ERG11 ve *MRR1* genlerinin baz dizilimleri Sanger dizileme yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, *ITS* geni dizisinin belirlenmesindeki gibi, elde edilen PZR ürünleri PureLink PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile saflaştırılmış, ilgili primer çifti kullanılarak BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile AB Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Kromatogramlar kontrol edilerek baz dizilerinin kalitesi doğrulanmış, gerektiğinde yeni PZR ürünü ile işlemler tekrarlanmıştır.

Her izolat için *ERG11* ve *MRR1* genlerine ait PZR ürünlerine ait baz dizileri Bioedit 7.2.5 Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics, ABD) programı

kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmıştır. Bunun için ilgili gen bölgesine ait diziler birleştirilerek, *ERG11* geni için referans dizi olarak *C. parapsilosis* ATCC 22019 sitokrom P450 lanosterol 14 α -demetilaz (*ERG11*) geni, WT (GenBank Accession No: GQ302972.1) ve *C. parapsilosis* BC014 transkripsiyon faktörü *MRR1* geni, WT (GenBank Accession No: KT160017.1) ile karşılaştırılmıştır. Referans diziye göre farklı olan nükleotidlerin bulundukları pozisyonlar belirlenmiştir. Bu pozisyonlardaki baz değişimlerinin aminoasit değişikliği olarak yansımalarının olup olmadığı da yine Bioedit 7.2.5 Sequence Alignment Editor programında baz diziliminin oluşturduğu kodonlar aminoasitlere çevrilerek tespit edilmiştir.



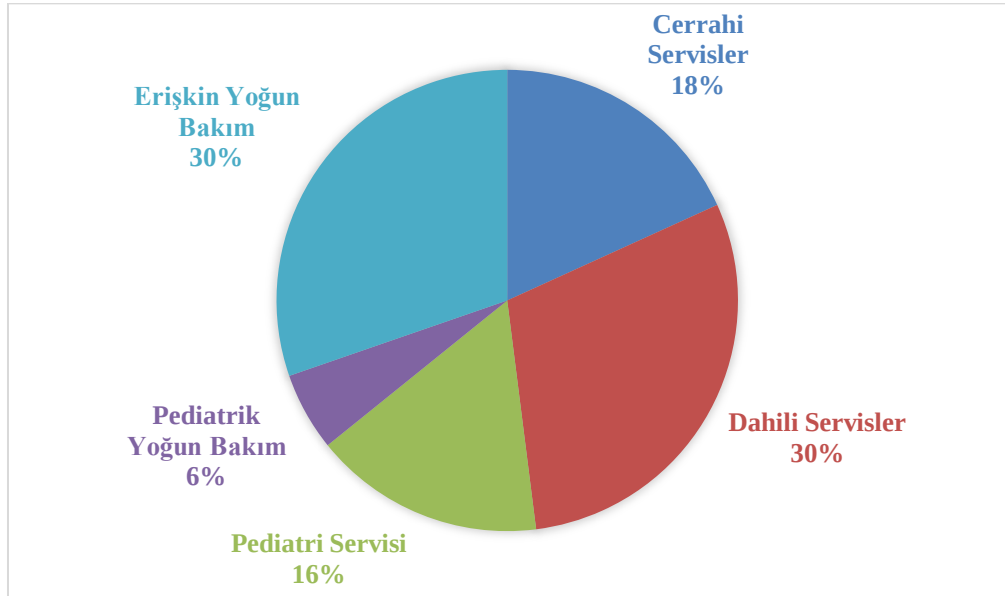
4.BULGULAR

4.1 İzolatlara Ait Genel Özellikler

Çalışmaya 181 hastaya ait izolatlar dahil edilmiştir. Hastalardan 109'unun (%60,2) erkek 72'sinin (%37,8) kadın olduğu görülmüştür. Hastaların 142'sinin (%78,5) erişkin, 39'unun (%21,5) çocuk olduğu saptanmıştır. Bu hastalara ait 181 izolatların 110'u (%60,8) kan kültürü örneklerinden, 71'i (%39,2) ise kateter örneklerinden elde edilmiştir. Bu hastalara ait ardışık üremeler dahil 283 izolata azol duyarlık testi yapılmıştır. Ardışık izolatlarda azol MİK değerlerinde değişim saptanandört hastanın tümizolatları direnç mekanizması araştırma çalışmalarına dahil edilmiştir.

Hastaların yattıkları servislere göre dağılımıŞekil 4.1'de verilmiştir.

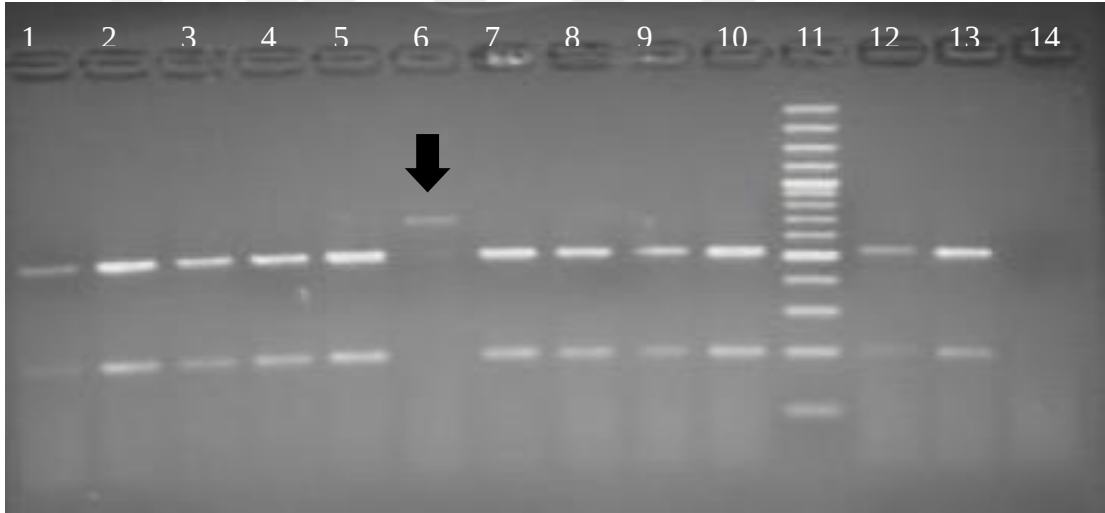
Şekil 4.1Çalışmaya dahil edilen hastaların yattıkları servislere göre dağılımı



4.2 İzolatlarda Tür Düzeyinde Tanımlama

Her bir hastadan ilk izole edilen izolatlar (n=181) ve ek olarak ardışık izolatlarında farklı azol duyarlılık paterni gözlenen dört hastaya ait diğer izolatlar (n=7) moleküler yöntemler ile tür tanımlaması yapılmıştır. Bu amaçla RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile teknik sorunlar yaşanan izolatlarda (n=8) ve *C.orthopsilosis* olarak tanımlanan bir izolatta ITS geni baz dizilimi incelenerek tür tanısı doğrulanmıştır. Bunun sonucunda, *C.orthopsilosis* olarak tanımlanan bir izolat hariç test edilen tüm izolatlar, *C. parapsilosissensu stricto* olarak tanımlanmıştır. RFLP yöntemi ile tanımlanan izolatlar ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir.

Şekil 4.2 RFLP yöntemi sonrası jel elektroforezi görüntüsü. (Sütun 1-5, 7-10 ve 12-13 *Candida parapsilosissensu stricto*, sütun 6 *Candida orthopsilosis* siyah ok ile işaretli, sütun 11 DNA büyüklük belirteci, sütun 14 negatif kontrol)



4.3. İzolatlar Ait in vitro Azol Duyarlılık Testi Sonuçları

Çalışmaya alınan 181 hastaya ait 283 izolata antifungal duyarlılık testi yapılmıştır. Test edilen tüm izolatların % 75,3’ünde (213/283) ve hastalardan %74,6’sında (135/181) suşlar test edilen her üç azole de duyarlı bulunmuştur. *C.orthopsilosis* olarak tanımlanan izolat (n=1) da, bu duyarlı izolatlar arasında yer almaktadır. Test edilen izolatların azol duyarlılık kategorilerine göre dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmiştir.



Tablo 4.1 Test edilen izolatların azol duyarlılık kategorilerine göre dağılımları.S: duyarlı (“susceptible”), I artmış dozda duyarlı (“susceptible, increased exposure”) ve R: dirençli (“resistant”).

	Flukonazol			Vorikonazol		Posakonazol		
	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	I n (%)	R n (%)	S n (%)	R n (%)
Tüm izolatlar (n=283)	212 (%74,9)	26 (%9,2)	45 (%15,9)	248 (%87,6)	21 (%7,4)	14 (%5,0)	272 (%96,1)	11 (%3,9)
Hasta bazında (n=181)*	135 (%74,6)	22 (%12,2)	24 (%13,2)	160 (%88,4)	12 (%6,6)	9 (%5,0)	174 (%96,1)	7 (%3,9)

*Her hastadan ilk izolat alınmıştır.

Antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre azol MİK değerlerinin dağılımı, MİK50 ve MİK90 değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Azol MİK değerlerinin dağılımı, MİK50 ve MİK90 değerleri.

Test Edilen Azol*	MİK Dağılım Aralığı	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Flukonazol	≤0,125 - >64	1	8
Vorikonazol	≤0,008 -2	0,015	0,25
Posakonazol	≤0,008 – 0,5	0,03	0,06

*Her hastadan ilk izolat alınmıştır.

Çalışmaya alınan suşlar arasında, azollere duyarlılığı azalan tüm izolatların flukonazole artmış dozda duyarlı veya dirençli olduğu gözlenmiştir. Hasta izolatlarında farklı azollere direnç durumu incelenmiş, test edilen tüm azollere dirençli dört, flukonazol ve vorikonazole dirençli beş, flukonazol ve posakonazole dirençli üç izolat saptanmıştır. Birden fazla azole dirençli olan bu izolatların MİK değerleri ve izole edildikleri yıllar Tablo 4.3’te verilmiştir.

Tablo 4.3 Birden fazla azoledirençli olan izolatların azol MİK değerleri ve izoleedildikleri yıl.

İzolatlar*	İzole Edildiği Yıl	Flukonazol MİK (µg/ml)	Vorikonazol MİK (µg/ml)	Posakonazol MİK (µg/ml)
FVPD 1	2004	16	0,5	0,5
FVPD 2	2013	32	1	0,125
FVPD 3	2013	32	0,5	0,125
FVPD 4	2016	64	2	0,5
FVD 1	2011	32	1	0,03
FVD 2	2015	32	0,5	0,03
FVD 3	2016	64	0,5	0,03
FVD 4	2017	16	0,5	0,03
FVD 5	2017	32	0,5	0,015
FPD 1	2015	8	0,03	0,125
FPD 2	2015	16	0,25	0,125
FPD 3	2016	32	0,125	0,5

*FVPD: Flukonazol, vorikonazol ve posakonazole dirençli

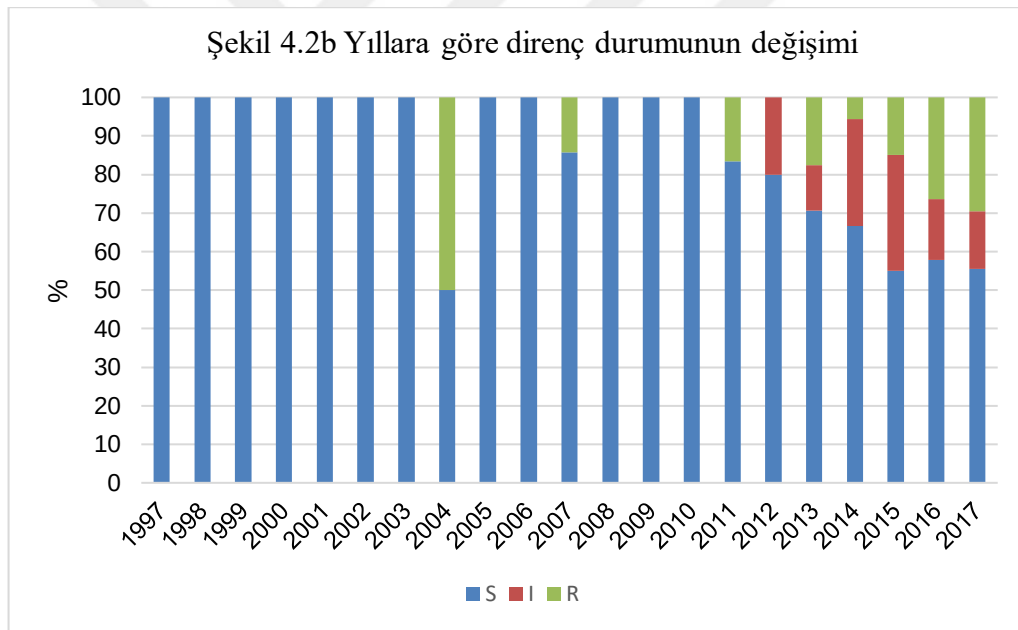
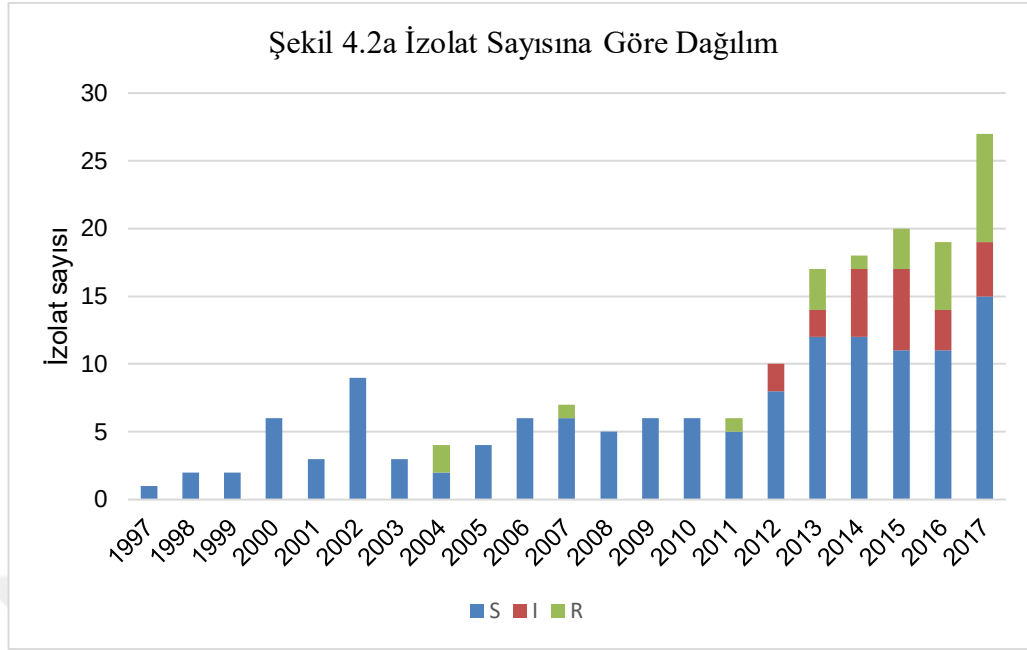
*FVD: Flukonazol ve vorikonazole dirençli

*FPD: Flukonazol ve posakonazole dirençli. FPD2 vorikonazole artmış dozda duyarlı

Çalışmaya alınan izolatlar arasında ilk azol dirençli suş 2004 yılında izole edilmiştir. Özellikle 2011 yılı ve sonrasında giderek artan dirençli suş oranları dikkati çekmiştir. Flukonazol direnç durumunun yıllara göre dağılımı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Şekil 4.2 Yıllara göre flukonazol duyarlılık durumunun a) izolat sayısına, b) yüzde olarak değişimi. (Her hastadan ilk izolat alınmıştır.)

S: duyarlı (“susceptible”), I artmış dozda duyarlı (“susceptible, increased exposure”) ve R: dirençli (“resistant”)



Ardışık izolatlarında farklı azol duyarlılık paterni gözlenen dört hastaya tüm izolatların ait duyarlılık sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir. Her hastadan ilk izolat alındığında flukonazol direnç oranı %13,2 (24/181) olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). İki hastada (H82 ve H90) eşzamanlı kan ve kateter kültürü izolatlarından kan izolatu duyarlı iken kateter izolatının dirençli olduğu saptanmıştır. H72 ve H80 no'lu hastalardan izole edilen suşlar ise, ilk olarak artmış dozda duyarlı iken zaman içinde dirençli olmuş ve direnç oranı %14,3'e (26/181) yükselmiştir. Azol direnci saptanan bu izolatlarda da direnç mekanizmaları araştırılmıştır.

Tablo 4.4 Ardışık üremelerinde azol duyarlılık paterninde farklılıklar olan hastalardan (n=4) izole edilen suşların özellikleri.

Hasta no .	Suş no.	Örnek Alma Tarihi	Örnek Türü	Flukonazol MİK (µg/ml)	Vorikonazol MİK (µg/ml)	Posakonazol MİK (µg/ml)
H90	S1	17.11.2011	Kateter	32	1	0,03
	S2	17.11.2011	Kan	4	0,015	0,03
H80	S1	2.10.2015	Kateter	4	0,06	0,03
	S2	14.10.2015	Kan	16	0,25	0,125
H72	S1	9.04.2017	Kateter	4	0,125	0,03
	S2	12.04.2017	Kateter	4	0,06	0,03
	S3	13.04.2017	Kateter	64	0,25	0,03
	S4	16.04.2017	Kateter	32	0,125	0,03
H82	S1	4.06.2017	Kateter	16	0,25	0,03
	S2	4.06.2017	Kan	0,06	0,03	2
	S3	13.06.2017	Kan	0,25	0,015	0,03

4.4 Azollere Artmış Dozda Duyarlı ve Dirençli İzolatlar Ait Direncin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması

Azol direnç mekanizmalarını araştırmak amacıyla duyarlılığı test edilen ve flukonazole dirençli veya artmış dozda duyarlı olduğu tespit edilen izolatlarda *ERG11* ve *MRR1* genlerinde mutasyon analizi yapılmıştır. Bu amaçla, her hastadan üreyen ilk izolatlar içinde flukonazol dirençli (n=24) ve artmış dozda duyarlı (n=22) izolatlar ve ardışık üremelerinde MİK değerlerinde farklılık gözlenen dört hastaya ait diğer izolatlar da (n=7) dahil edilerek toplam 53 izolatta bu gen bölgeleri incelenmiştir.

4.4.1 *ERG11* ve *MRR1* Gen Bölgelerinin Baz Diziliminde Gözlenen Farklar

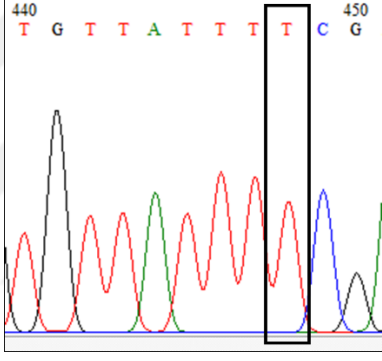
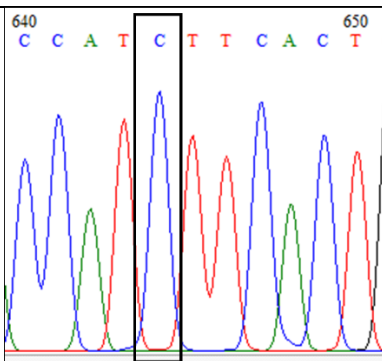
ERG11 ve *MRR1* genleri baz dizilimi incelenen izolatlarda saptanan tek nokta mutasyonları Tablo 4.5'te özetlenmiş ve örnek kromatogramlar Şekil 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.5 *ERG11* ve *MRR1* genleri baz dizilimi incelenen izolatlarda (n=53) belirlenen değişiklikler

İlgili gen	Baz değişikliği	Aminoasit değişikliği	n	%
<i>ERG11</i>	A395T	Y132F	37	69,8
	T591C	Sessiz, I197I	52	98,1
	G1261A*	D421N	2	3,8
	G1372A	G458S	6	11,3
<i>MRR1</i>	G1214A	R405K	29	54,7
	G2779T	G927C	4	7,5

*: Bu değişiklik 11 izolatta çift pik olarak gözlenmiştir (%20,8).

Şekil 4.3. *ERG11* ve *MRR1* genlerinde görülen mutasyonlara ait örnek kromatogramlar.

İlgili gen	Mutasyonu	Örnek Kromatogram	Örnek kromatogramda çift pik
<i>ERG11</i>	A395T		
	T591C		

<i>MRR1</i>	G1261A		
	G1372A		
	G1214A		
	G2779T		

Tablo 4.6 Azollere azalmış duyarlılık saptanan izolatlarda azol minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve gözlenen mutasyonlar

Hasta No	Yıl	Flukonazol MİK (µg/ml)	Vorikonazol MİK (µg/ml)	Posakonazol MİK (µg/ml)	ERG11 mutasyonları				MRR1 polimorfizmleri	
					A395T (Y132F)	T591C (I197I)	G1372A (G458S)	G1261A (D421N)	G1214A (R405K)	G2779T (G927C)
H71	2004	8	0,25	0,03	+	+			+	
H23	2004	16	0,5	0,5		+				+
H115	2007	8	0,125	0,03	+	+			+	
H90	2011	32	1	0,03		+	+			
H90	2011	4	0,015	0,03		+	+			
H9	2012	4	0,125	0,03		+	+			
H47	2012	4	0,06	0,03		+				
H174	2013	4	0,06	0,03		+				
H173	2013	4	0,5	0,125						+
H170	2013	32	1	0,25		+		++		+
H105	2013	8	0,25	0,03		+	+	++		
H150	2013	4	0,06	0,03	+	+			+	
H92	2014	4	0,03	0,03		+	+	++		
H142	2014	4	0,25	0,03		+				
H131	2014	4	0,06	0,03	+	+			+	
H4	2014	8	0,25	0,03	+	+			+	
H137	2014	4	0,25	0,03	+	+			+	
H14	2014	4	0,06	0,03	+	+			+	
H77	2015	8	0,125	0,03	+	+			+	
H130	2015	4	0,125	0,03	+	+		++	+	
H40	2015	4	0,03	0,03	+	+		+	+	
H140	2015	4	0,06	0,06	+	+			+	
H135	2015	4	0,06	0,03	+	+			+	
H28	2015	4	0,06	0,03	+	+			+	
H80	2015	4	0,06	0,03	+	+			+	
H80	2015	16	0,25	0,125	+	+			+	
H87	2015	8	0,03	0,125	+	+			+	
H144	2015	32	0,5	0,03	+	+		+	+	
H61	2016	4	0,03	0,03	+	+		++	+	
H120	2016	4	0,06	0,03	+	+		++	+	
H139	2016	8	0,03	0,015	+	+			+	
H29	2016	4	0,06	0,03	+	+		++	+	
H55	2016	64	0,5	0,03	+	+		++	+	
H128	2016	32	0,125	0,5		+				
H78	2016	8	0,125	0,015	+	+				

H48	2016	64	2	0,5		+				+
H145	2017	16	0,125	0,03	+	+				
H16	2017	32	0,25	0,06		+				
H85	2017	4	0,06	0,03	+	+		+	+	
H72	2017	4	0,125	0,03	+	+			+	
H72	2017	64	0,25	0,03	+	+			+	
H72	2017	32	0,125	0,03	+					
H72	2017	4	0,06	0,03	+				+	
H42	2017	16	0,25	0,06	+	+	+	+		
H66	2017	16	0,5	0,03	+	+				
H82	2017	2	0,06	0,03		+				
H82	2017	16	0,25	0,03	+	+				
H82	2017	0,25	0,015	0,03		+				
H125	2017	32	0,25	0,03	+	+				
H33	2017	32	0,5	0,015	+	+			+	
H133	2017	16	0,25	0,03	+	+			+	
H30	2017	4	0,06	0,03	+	+		+	+	
H110	2017	4	0,03	0,03	+	+				

*: Çift pik gözlenen izolatlar

5.TARTIŞMA

C. parapsilosis, tüm dünyada sıklığı giderek artan oldukça önemli bir hastane ilişkili enfeksiyon etkenidir (1). Bu tür, neonatal hasta gruplarında, kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda ve hiperalimentasyon sıvılarının intravenöz kullanımı sırasında gelişen enfeksiyonlarda, özellikle de fungemiler açısından önemli bir rol oynamaktadır (1, 25, 84). Çeşitli moleküler çalışmalar ile bu türün aslında içerisinde *C. parapsilosissensu stricto*, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* türlerini barındıran bir tür kompleksi olduğu ortaya konulmuştur (3). Fenotipik olarak ayırt edilemeyen bu türler, birbirlerinden farklı virülans, enfeksiyon prognozu ve antifungal duyarlılık özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle türlerin birbirlerinden ayrılması, farklı coğrafi bölgelerdeki prevalanslarının ve antifungal duyarlılık paternlerinin ortaya konması;epidemiyojik veri eksikliklerini tamamlamaya yardımcı olması ve bu türlerle gelişen enfeksiyonların tanı ve tedavisinde yol gösterici bilgiler edinilmesi açısından önemlidir(6, 58, 117).

Mantarların moleküler tanımlanmasında, evrensel olarak kabul gören barkod bölgesi olan *ITS* gen bölgesininPZR ile çoğaltılıp dizilemesi altın standarttır (121).Bu çalışmada, tür tanısı için,doğru sonuç veren, ekonomik ve hızlı bir yöntem seçmek amaçlanmıştır. *SADH* genine RFLP uygulanması, *ITS* dizilemesi ile uyumlu sonuçlar veren, hızlı, daha az maliyet ve işgücü gerektiren ve sık kullanılmış bir yöntem olduğundan tercih edilmiştir (3, 30, 63, 83, 84).Bununla birlikte RFLP yönteminde çoğaltılan hedef gen bölgesindeki genetik varyasyonların restriksiyon enzimi kesim bölgesini etkilemesi durumundatur tanımlamada sorun yaşanabilmekte ve RFLP metodu yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle şüpheli durumlarda tür ayrımı için *ITS* veya 26S rRNA bölgesinin dizi analizi ile doğrulama önerilmektedir(84, 117). Ayrıca,RFLP yönteminin *C. parapsilosissensu stricto*'yu diğer ki türden ayırmada başarılı olduğunu; ancak,*C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'in ayırımında yetersiz kalabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (84). Bizim çalışmamızda da,*SADH* geninin BanIenzimi ile kesimi sonrası elde edilen RFLP ile teknik sorundan şüphelenildiğinde ve *C. parapsilosissensu stricto* dışındaki tür tanılarında *ITS* gen bölgesi dizilemesi ile tür tanısı doğrulanması planlanmıştır. Buna uygun olarak RFLP

ile *C. orthopsilosis* olarak tanımlanan izolatın *ITS* geni dizilemesiyle de aynı türe ait olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *SADH* geni PZR ile çoğaltıldığında beklenenden daha uzun bir ampikon oluşan ve *BanI* ile kesim gerçekleşmeyen bir izolat, *ITS* sekans analizi ile *C. parapsilosissensu stricto* olarak tanımlanmıştır. Bu durumun *SADH* genindeki bir polimorfizmden ileri gelmiş olabileceği düşünülmüştür. Aynı hastadan izole edilen ve zaman içerisinde direnç gelişimi gözlenen ardışık izolatlarda da, altın standart olan *ITS* geni dizi analizi yapılmış ve hepsinin *C. parapsilosissensu stricto* olduğu belirlenmiştir.

Literatürde klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* komplekse ait suşların tür ayrımını yapan çalışmalar, *C. parapsilosissensu stricto*'nun baskın tür olduğunu göstermiştir. *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* ise klinik örneklerde daha az gözlenmiştir. SENTRY programı için 1997-2016 arasında dünya çapında 135 merkezden gönderilen 2548 invaziv *C. parapsilosis* kompleks izolatının, 2433'ü *C. parapsilosissensu stricto* (%95,5), 82'si *C. orthopsilosis* (%3,2) ve 33'ü (%1,3) *C. metapsilosis* olarak tanımlanmıştır (122). ARTEMIS antifungal sürveyans programında 2001-2006 yıllarında toplanan 1,929 *C. parapsilosis* kompleks izolatında da *SADH* geni RFLP metoduyla incelenmiş ve 117 (6.1%) izolat *C. orthopsilosis* ve 34 (1.8%) *C. metapsilosis* olarak tanımlanmıştır (117).

C. parapsilosissensu stricto, dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda kompleks içindeki baskın tür olarak bildirilmiştir. Ancak, diğer iki türün dağılımı, coğrafi bölgelere göre değişken olabilmektedir (83, 117, 123). ARTEMIS antifungal sürveyans programında *C. orthopsilosis* en fazla Güney Amerika'da en az ise Afrika'da görülmüştür (117). Bu çalışmaya ülkemizden giden 72 izolatın ise ikisi *C. orthopsilosis*, biri *C. metapsilosis* olarak tanımlanmıştır. Farklı coğrafi bölgelerde, *C. parapsilosis* komplekste türlerin dağılımı ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar bildirilmeye devam etmektedir. Brezilya'da 1997-2011 yıllarında kandan izole edilen 152 *C. parapsilosis* kompleks izolatı *SADH* geni RFLP ile incelenmiş, %90,8'inin *C. parapsilosissensu stricto*, %8,5'inin *C. orthopsilosis* ve %0,7'sinin *C. metapsilosis* olduğu bildirilmiştir (124). Arjantin'de 2009-2014 yıllarında neonatal ve pediatrik hastalarına ait kandidemi izolatlarında *FKS1* geni RFLP ile 59 izolat *C. parapsilosissensu stricto* (%98,3) ve bir izolat *C. orthopsilosis* (%1,7) olarak

tanımlanmıştır (53). *C. parapsilosis* Avrupa’da da, özellikle Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde, sık görülen bir kandidemi etkenidir (1). Danimarka’da 2004-2008 yıllarına ait 79 kandidemi etkeni *C. parapsilosis* kompleks izolatının, SADH RFLP incelemesi ITS geni dizi analizi ile de doğrulanmış, sadece iki *C. orthopsilosis* ve iki *C. metapsilosis* tespit edilmiştir (84). İspanya’da 2009-2010 yıllarına ait 364 fungemi etkeni *C. parapsilosis* kompleks izolatının %90,7’si *C. parapsilosis sensu stricto*, %8,2’si *C. orthopsilosis* ve %1,1’i ise *C. metapsilosis* olarak bulunmuştur (5). Portekiz’de 175 klinik ve çevresel *C. parapsilosis* kompleks izolatının %91,4’ü *C. parapsilosis sensu stricto*, %2,3’ü *C. orthopsilosis* ve %2,9’u *C. metapsilosis* olarak tanımlanmış, kan kültüründen elde edilen tüm izolatların ise *C. parapsilosis sensu stricto* olduğu gösterilmiştir (118). Asya’dan da *C. parapsilosis* kompleks içerisinde bulunan türlerin dağılımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Malezya’da 2004-2007 yılları arasında toplanan 42 fungemi etkeni *C. parapsilosis* izolatında tür ayrımı rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) analizi ile yapılmış ve ITS dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmaya alınan izolatların %23,8’inin *C. orthopsilosis* ve %4,8’inin ise *C. metapsilosis* olduğu tespit edilmiştir. Bu iki türün, Avrupa ve Amerika’dan bildirilen oranlara göre daha yüksek oranlarda görüldüğü dikkat çekmiştir (83).

Ülkemizde *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tür düzeyinde tanımlandığı çalışmalar sınırlıdır. Tosun ve ark., farklı klinik örneklerden elde edilen 42 *C. parapsilosis* kompleks izolatının sadece üçünü *C. metapsilosis* ve birini *C. orthopsilosis* olarak tanımlamışlardır (57). Kan kültürü izolatlarını (n=118) araştıran başka bir çalışmada, *C. parapsilosis sensu stricto* dışında türe rastlanmamıştır (125). Bizim çalışmamızda ise, 20 yıllık bir süreçte toplanan 181 hastaya ait izolatlardan sadece biri (%0,6) *C. orthopsilosis* olarak tanımlanmış ve izolatlar arasında *C. metapsilosis*’e rastlanmamıştır. Bu veriler, literatür ile uyumlu olarak ülkemizde de baskın olan türün *C. parapsilosis sensu stricto* olduğunu göstermektedir. Ancak, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* sıklıklarının karşılaştırılması için henüz elimizdeki sayılar yeterli değildir.

Son dönemde dikkati çeken bir durum da birden fazla fungal etkenin gözleendiğini bildiren çalışmalardır. Merkezimizde, 18 yıllık veriler değerlendirilmiş

ve bir tür komplekse ait türler ayırt edilmediğinde bile fungemilerde birden fazla fungal etkenin saptanma oranı %3,7 olarak bildirilmiştir (126). Tür düzeyinde tanımlama yapılabildiğinde bu oranların artacağı düşünülmektedir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada, kan ve kateter ucu örneklerinden izole edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatları incelenmiş, örneklerin %9,5’inde *C. parapsilosis sensu stricto* ile *C. orthopsilosis*’in birlikte bulundukları gösterilmiştir (127). Bu konuda çalışmaların artması, türlerin virülans ve patogeneze araştırmalarına da katkıda bulunabilecektir. Bizim çalışmamızda tek koloni pasajlarından yapılan stok kültürleri kullanıldığı için bir örnekte birden fazla tür varlığı araştırılmamıştır.

C. parapsilosis komplekse ait izolatlar ile nozokomiyal salgınlar bildirilmiş olması nedeniyle farklı türlerin salgın yapabilme özelliğinin araştırılması önem kazanmıştır. Örneğin, Latin Amerika ülkelerinde invaziv klinik örneklerde *C. parapsilosis* komplekse ait türlerin sık görülmesinin yanı sıra, *C. orthopsilosis* ile gerçekleşen bazı salgınlar da bildirilmiştir (117, 122, 128). Bu nozokomiyal salgınların çoğunda santral venöz kateter varlığı veya hiperalimentasyon sıvılarının intravenöz kullanımı ile ilişki gözlenmiştir (127). Bu çalışmada, salgın araştırması yapılmamış, izolatların genetik düzeyde ilişkisi incelenmemiştir. Ancak; örnek alım tarihleri, hastaların bulunduğu servisler ve antifungal duyarlılık paternleri incelenerek elde edilen sınırlı veri ile nozokomiyal yayılımı destekleyecek bir bulguya ulaşılamamıştır.

Antifungal duyarlılık durumunun test edilebilmesi ve raporlanması için üzerinde en çok çalışılmış referans yöntemler sıvı mikrodilüsyon temellidir. Bu yöntemlerin uygulanması ve elde edilen MİK sonuçlarının değerlendirilebilmesi için EUCAST ve CLSI’a ait rehberlerden faydalanılmaktadır. Bu rehberler sürekli olarak artan laboratuvar ve klinik verileri ışığında güncellenmektedirler. Bu iki rehber arasındaki farklar Tablo 2.1’de verilmiştir. *C. parapsilosis* kompleksin azol duyarlılığı test edildiğinde, her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar uyumlu bulunmuştur (129). Çalışmamızdagüncel rehberlere herkese açık erişim sağlaması, 24 saatte ve spektrofotometrik olarak değerlendirenin deneyiminden etkilenmeden okunabilmesi nedeniyle EUCAST yöntemi tercih edilmiştir (102, 103).

Candida türleri ile direnç gelişim oranları genel olarak düşük seyretmektedir. Ancak; antifungal profilaksi/tedavi sırasında gelişen enfeksiyonların varlığı, sık kullanılan antifungal ilaçlara dirençli izolatların ortaya çıkması, duyarlılığına ilişkin yeterli veri olmayan nadir türlerin görülmeye başlanması antifungal duyarlılık ile ilgili epidemiyolojik verilerin değerini artırmıştır(122). *C. parapsilosis* komplekse ait türlerin klinik örneklerde sık izole edilmeleri ve çoğu merkezde invaziv enfeksiyonlarda sık etken olabilmeleri nedeniyle, bu türlere ait duyarlılık durumunun bilinmesi ve dirence neden olan mekanizmaların açığa çıkarılması ayrı bir önem taşımaktadır(1, 53). *C. parapsilosis* komplekse ait antifungal duyarlılık ile ilgili literatüre bakıldığında, azollere ve ekinokandinlere olan azalmış duyarlılık oranları endişe verici görünmektedir (1, 32, 105, 106). Tüm dünyada invaziv *Candida* enfeksiyonlarında azoller ilk seçenek ilaçlar arasında önerilmekte ve kullanılmaktadır (89, 98). Flukonazole karşı gelişen direnç, gelişmekte olan ülkelerde ucuz ve güvenilir bir antifungal grubu olarak sıklıkla kullanılması sebebiyle özellikle önemlidir (128). Son yıllarda, *C. parapsilosis* kompleksi ile gelişen enfeksiyonların sık görüldüğü Avrupa, Güney Amerika ve bazı Asya ülkelerinde flukonazole karşı direnç bildirimleri artmıştır. Dikkati çeken bir nokta da, azol direncindeki artışın *C. parapsilosis* komplekste, *C. albicans* ve *C. glabrata* gibi diğer sık görülen invaziv enfeksiyon etkeni *Candida* türlerinden daha fazla olmasıdır(1, 11, 106). *C. parapsilosis* kompleksin medikal aletler ve eller aracılığı ile horizontal olarak taşınabilmesi, bu tür içinde gelişen flukonazol dirençli izolatlarla meydana gelebilecek hastane salgınları açısından da oldukça endişe vericidir (62, 128). Bu sebeplerle, *C. parapsilosis sensu lato* olarak raporlanan izolatlara ait verilerin yanı sıra, kompleks içerisinde yer alan türlerin sıklıkları ve antifungal duyarlılıklarına ilişkin veriler de, bu tür kompleksinin etken olduğu enfeksiyonlara yaklaşımda yol gösterici olacaktır (118).

Literatürde *C. parapsilosis* komplekste flukonazol direnç oranlarının genellikle %2 ile %5 aralığında seyrettiği görülmektedir (1). Çok daha yüksek oranların bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Güney Afrika'dan çok merkezli bir çalışmada sadece %38 flukonazol duyarlılığı bildirilmiştir (130). Ülkemizden çok merkezli bir çalışma kandidemi etkeni 575 *C. parapsilosis* kompleks izolatında, CLSI mikrodilüsyon yöntemiyle %7,7 flukonazol direnci bildirmiştir.

Flukonazoldirencinin merkezler arasında büyük değişkenlik göstermesi (%0-%47,1) dikkati çekmiştir(131). Kompleks içindeki türlere ait direnç oranlarını araştıran çalışmalar sınırlıdır ve bir kısmı türe özgü sınır değerlerinin kabul edilmesinden önceki yıllara ait oldukları için MİK değerleri rapor edilmediği sürece verdikleri direnç oranlarının sağlıklı bir karşılaştırma için kullanılması mümkün olamamaktadır. SENTRYprogramında2006-2016 arasında izole edilen 2433*C. parapsilosis* kompleks izolatında CLSI yöntemi ile %3,9 direnç gösterilmiştir.*C. orthopsilosis* için flukonazol MİK₉₀deęeri 2 µg/ml olmakla birlikte, >128µg/ml MİK değerine ulaşan izolatlar rapor edilmiştir. Ayrıca, *C. metapsilosis* için MİK₉₀deęeri 8µg/mlbulunmuştur(122).ARTEMIS programında da CLSI önerilerince invaziv 1929 *C. parapsilosis* kompleks izolatının antifungal duyarlılık durumu belirlenmiş,*C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatlarında *C. parapsilosis sensu stricto*'ya göre MİK dağılımları, flukonazol için daha yüksek, diğer antifungaller için daha düşük değerlerde bulunmuştur. (117). Brezilya'da 154 kandidemi etkeni *C. parapsilosis* kompleks izolatı ile yapılan bir çalışmada, *C. parapsilosis sensu stricto*olarak tanımlanan izolatların flukonazol için MİK₉₀ değerleri diğer iki türe oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(124).İspanya'dan çok merkezli bir çalışma 364 *C. parapsilosis* kompleks izolatını CLSI yöntemiyle test etmiş,*C. parapsilosis sensu stricto*'da (n=330) %4,8,*C. orthopsilosis*'te(n=30) %0,3 flukonazol direnci saptamış,*C. metapsilosis*'te (n=4) azollere direnç gözlememiştir(5).Bizim çalışmamızda*C. parapsilosis sensu stricto*'nun tür kompleksi içinde çok baskın olması nedeniyle farklı türlere ait duyarlılık durumunun karşılaştırılması mümkün olmamıştır. *C. parapsilosis sensu stricto* izolatlarında flukonazole %13,4 direnç bulunmuş, *C. orthopsilosis* izolatındaise tüm test edilen azollere karşı düşük MİK değerleri gözlenmiştir.Genellikle, dünyanın farklı bölgelerinden çalışmalarda *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'te azol direnci *C. parapsilosis sensu stricto*'ya göre daha düşük olarak rapor edilmiştir. Ancak, bu kriptik türlerin sayısı daha azdır ve yüksek MİK değerleri de gözlenmiştir.

Candida türleri azollere çapraz direnç geliştirebilmektedir. *C. parapsilosis* komplekste flukonazol ve vorikonazole çapraz direnç gelişimi bildirilmiştir(130, 132). SENTRY sürveyans programında flukonazol dirençli*C. parapsilosis* kompleks izolatlarının sadece %32,7'si vorikonazole duyarlı bulunmuştur (122). Bizim

çalışmamızda da birden fazla azole azalmış duyarlılık gösteren izolatlara ait azol MİK değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Bu izolatların tümünde flukonazole azalmış duyarlılık bulunmuş ve vorikonazol ile posakonazol MİK değerlerinde yükselme gözlenmiştir.

C. parapsilosis komplekse ait türler ile gelişen invaziv enfeksiyonların giderek artmasına ek olarak, bu türlerde azollere direnç gelişiminin de son yıllarda arttığı literatürde gösterilmiştir (1, 11, 108). Çalışmamızda ilk dirençli izolatlar 2004 yılında izole edilmiş olsa da (n=2), dirençli izolatların 2011 yılı ve sonrasında artmaya başladığı gözlenmiştir. Bu durum, daha önce ülkemiz için bildirilen direnç oranlarının da yükselebileceğine işaret etmesi nedeniyle önemlidir ve aktif sürveyans çalışmalarının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Candida türlerinde azollere karşı gelişen direncin moleküler mekanizmalarında hücre içindeki ilaç konsantrasyonunu azaltan dışa atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* gibi genlerin aşırı ifade edilmesi ve ilaç hedef molekülünü değiştiren *ERG11* ve *ERG3* gen mutasyonları ön plandadır (133). *C. parapsilosis*'te azol direncinde *ERG11* geninde doğrudan meydana gelen tek nokta mutasyonlarına, *ERG11* geni transkripsiyonel regülatörlerinin aşırı ekspresyonundan daha sık rastlanmıştır (111, 134). *CDR1* ve *MDR1* pompa genlerinin transkripsiyon faktörleri olan *TAC1* ve *MRR1*'deki mutasyonlara sekonder gelişen aşırı ekspresyonun, azol direncine orta derecede katkı sağladığı ortaya konmuştur (1). *MRR1*'deki mutasyonların ayrıca, flukonazol ve vorikonazolde çapraz direnç ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar da yapılmıştır (132, 135). Literatüre bakıldığında, *C. parapsilosis* komplekste azol direnci için, *ERG11* ve *MRR1* genlerindeki değişikliklere yoğunlaşıldığı gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda da bu iki gen bölgesindeki tek nokta mutasyonlarının varlığı araştırılmıştır (10, 113, 122, 132, 133). *TAC1* genindeki mutasyonlar ile *TAC1* ve *MRR1* genlerinin ekspresyonlarının araştırılmamış olması çalışmamızın eksik bir yönüdür.

Literatürde, azol duyarlı ve dirençli *C. albicans* izolatlarında *ERG11* geninde birçok izolatta tek nükleotid polimorfizmleri ("single nucleotide polymorphism", SNP) bildirilmiştir. Bu durum, lanosterol demetilazın yapısal değişikliklere uygun olduğunu düşündürmektedir. Bu SNP'lerin bazılarının sekonder gelişen aminoasit

değişikliklerinin azol direnci ile ilişkisi gösterilmiştir (136). *C. parapsilosis*'te azol direnci ile ilişkilendirilmiş *ERG11* değişiklikleri bulunmaktadır. Örneğin, A395T mutasyonunun neden olduğu Y132F aminoasit değişikliği, lanosterol demetilaz enzimin katalitik bölgesini etkilemektedir. Bu değişiklik flukonazol MİK değerlerinde belirgin artışa sebep olmakta, membrandaki sterol kompozisyonunu değiştirmekte ve sadece dirençli izolatlarda görülmektedir (10, 111, 113). Amerika Birleşik Devletleri'nde çok merkezli bir çalışmada, klinik *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında *ERG11* geni dizilerini incelenmiş ve 5 farklı SNP belirlenmiştir. A395T (Y132F) nokta mutasyonu 30 flukonazol dirençli izolatın 17'sinde gösterilmiş, artmış dozda duyarlı veya duyarlı izolatlarda gözlenmemiştir. Ayrıca azol direnci ile ilişkisi kanıtlanamayan SNP'ler de saptanmıştır [C-111T ile G1193T (R398I), T533C (M178T) ve A847T (N283Y)] (10). Brezilya'dan bir çalışmada da, dokuz flukonazol dirençli *C. parapsilosis sensu stricto* izolatında A395T (Y132F) ve aminoasit değişikliğine neden olmayan T519C sessiz mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca, dirençli tüm izolatlarda flukonazol baskısı altında *ERG11* geni ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır (113). Brezilya'dan bir başka çalışmada, 10 salgın sırasında izole edilen azole dirençli ve dört azole duyarlı *C. parapsilosis sensu stricto* izolatında, *ERG11* gen bölgesi incelenmiştir. Hepsinde T519C sessiz mutasyonu gösterilmiştir. Yedi flukonazol ve vorikonazol dirençli salgın izolatında A395T (Y132F) mutasyonu tespit edilmiş ve bu mutasyona duyarlı suşlarda rastlanmamıştır. Ayrıca, duyarlı izolatlardan birinde G1197T (R398I) bulunmuştur (128). Güney Kore'den bir çalışmada da dirençli *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının %63,8'inde duyarlı olanlarda gözlenmeyen A395T (Y132F) gösterilmiştir (137). Kuveyt'te, flukonazol duyarlılık durumu değişen 29 izolatın hepsinde T519C sessiz mutasyonu gözlenmiştir. Bunun dışında 12 izolatta beş farklı homozigot mutasyon daha tespit edilmiştir. İki duyarlı ve beş dirençli izolatta C-111T mutasyonu ve G1193T (R398I) mutasyonu bulunmuştur. Bunlara ek olarak beş dirençli izolatta A395T (Y132F) mutasyonu da belirlenmiştir (138). Flukonazol dirençli (n=35) ve duyarlı (n=4) izolatlarda S216L, Y132F, and R398I aminoasit değişiklikleri bildiren bir çalışmada Y132F sadece 10 dirençli izolatta görülmüş, diğerleri hem duyarlı hem de dirençli izolatlarda

gösterilmiştir. Bu çalışmada *C. parapsilosis* izolatlarında *ERG11* bölgesindeki tek nokta mutasyonu çeşitliliğinin fazla olmadığı da bildirilmiştir (111).

Tartışılan bütün bu çalışmalarda dirençli *C. parapsilosis* komplekse ait izolatlarının çoğunda Y132F aminoasit değişimi tespit edilmiştir ve hiçbir duyarlı izolatta bu mutasyona rastlanmamıştır. Bu durum, bu aminoasit değişimine sebep olan A395T mutasyonunun, *C. parapsilosis* izolatlarındaki en önemli moleküler azol direnç mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu mutasyonun özellikle klonal geçiş ve dirençli salgınlar ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Bununla beraber, yine *ERG11* geninde tespit edilen 5' ucunda translasyona uğramayan C-111T mutasyonu, T591C sessiz mutasyonu ve G1197T (R398I) mutasyonu gibi mutasyonlar hem duyarlı hem de dirençli izolatlarda gösterilmiştir (10, 111, 113, 137, 138). Bu çalışmada da test edilen 53 izolatın 37'sinde A395T (Y132F) mutasyonu bulunmuş, hepsinde flukonazol MİK değerinin ≥ 4 µg/ml olduğu görülmüştür. Ardışık izolatları incelenen H82 no'lu hastanın duyarlı izolatlarında bu mutasyon görülmezken dirençli izolatta pozitif bulunmuştur (Tablo 4.6). Ayrıca azol direnci ile ilişkilendirilen G1372A (G458S) mutasyonu da altı izolatta saptanmıştır. Sessiz T591C (I197I) mutasyonun da merkezimizde sık olduğu (52/53) belirlenmiştir. Test edilen 53 izolatın duyarlı olan ikisinde de bu mutasyon görülmüştür. Daha önce literatürde bildirilmeyen G1261A (D421N) mutasyonu, iki izolatta homozigot olarak saptanmıştır. Farklı 11 izolatta ise A pikinin altında küçük G piki gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu mutasyonun direnç ile ilişkisinin araştırılması uygun olacaktır.

C. parapsilosis komplekste, dışa atım pompalarını kodlayan genlerin transkripsiyon faktörlerinde meydana gelen değişiklikler de azol direncinde rol oynamaktadır. MFS ailesindeki MDR1 pompa geni transkripsiyon faktörü olan *MRR1* geninde ekspresyonu artıran mutasyonlar tespit edilmişlerdir (132, 135). Bununla beraber, literatürde bu gen bölgesindeki değişikliklerin azol duyarlılığına etkisini inceleyen çalışmalar henüz sınırlıdır ve yorumlamada zorluklar yaşanmaktadır. Silva ve ark. flukonazol, vorikonazol ve posakonazol altında *C. parapsilosis*'te deneysel olarak gelişen azol direncini incelemişlerdir (135). Flukonazol/vorikonazol maruziyeti sonrasında bu azollere

direnç ve posakonazole azalmış duyarlılık gelişmiş, bu durum *MRR1* geninde gözlenen *MDR* geni ekspresyonunun artıran mutasyonlara [G1747A (G583R) ve A2619C (K873N)] bağlanmıştır. Posakonazol maruziyeti ise *UPC2* ve *NDT80* transkripsiyon faktörü genlerindeki mutasyonlar ile ergosterol biyosentez genlerinde ekspresyon artışına neden olmuş ve her üç azole de direnç gelişmiştir. Aynı ekip, daha sonraki bir çalışmalarında G1747A (G583R) ve A2619C (K873N) mutasyonlarının azol direnci için işlev kazandıran (“gain-of-function”) mutasyonlar olduklarını, tespit edilen üçüncü mutasyonun [A3191C (Q1064P)] ise etkisiz olduğunu belirtmişlerdir (132). Amerika Birleşik Devletleri’nde çok merkezli bir çalışma, farklı duyarlılık paternine sahip klinik *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında *MRR1* geni dizisindeki değişiklikler ve *MDR1* geninin ekspresyonu araştırılmıştır. (10). Birden fazla izolatta gözlenen *MRR1* geni mutasyonlarından G-53A ve C1856T (A619V), sadece duyarlı olmayan, G1214A (R405K) ise duyarlı ve duyarlı olmayan izolatlarda tespit edilmiştir. Birer dirençli izolatta G2337T (L779F), G2575A (A859T) ve -101insT (101. pozisyonda timin insersiyonu) saptanmış, bir artmış dozda duyarlı izolatta da G1436A (R478K) bulunmuştur. En az beş kat *MDR1* ekspresyon artışı gözlenen suşlardan altısında *MRR1* geninde C1856T (A619V), G1436A (R478K), G2337T (L779F), G2575A (A859T) ve -101insT görüldüğü, üç izolatta ise değişiklik saptanmadığı bildirilmiştir. Duyarlı, artmış dozda duyarlı ve dirençli izolatlarda *MRR1* mutasyonlarının varlığı karşılaştırılmış ve duyarlılık azaldıkça mutasyonların arttığı gösterilmiştir. Farklı olarak Güney Kore’den bir çalışmada *ERG11* geninde Y132F mutasyonu bulunmayan flukonazol dirençli bir izolatta *MRR1* geninde G927D mutasyonu gözlenmiştir (137). Bizim çalışmamızda da 29 izolatta G1214A (R405K) ve dört izolatta G2779T (G927D) mutasyonları belirlenmiştir. Ancak, bu mutasyonların azol duyarlılığına etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir.

MRR1 genindeki homozigot SNP’lerinin, azol MİK değerlerini heterozigot olanlara göre daha fazla artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Çin’de aynı hastaya ait ardışık kan kültürü izolatlarında *ERG11*, *MRR1*, *TAC1*, *UPC2* genlerine ait nükleotit dizileri incelenmiştir. *MRR1* geninde altı izolatta saptanan T2957C (L986P) mutasyonu hastanın ilk dört izolatında heterozigot iken, son ikisinde homozigot olmuş, diğer genlerde mutasyon saptanmamıştır. Flukonazol MİK değeri

mutasyon saptanmayan izolatlarda 0,5µg/ml iken heterozigotlarda 2µg/ml'ye, homozigotlarda ise 32µg/ml'ye yükselmiştir(139).Bizim çalışmamızda dört hastaya ait farklı azol MİK değerlerine sahip ardışık izolatlar değerlendirilmiş ve *MRR1* geninde farklılık tespit edilememiştir.

MRR1 geninde değişiklik olmayan izolatlarda da *MDR1* ekspresyonunda artış gözlenmesi ve mutasyonların her zaman *MDR1* geninde artmış ekspresyon ile sonuçlanmaması, mutasyonların etkisinin ortaya konmasını zorlaştırmaktadır. *MRR1* gen polimorfizmlerinin dirençli izolatlarda daha sık ve daha fazla sayıda görülmesi bunların azol direncine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Ancak, *C. parapsilosis* komplekste azol direncinin gelişmesinde genellikle sterol sentezi ve dışa atım pompaları dahil birden fazla mekanizmanın rol alıyor olması olasıdır (1, 10, 137). Bu çalışmada *C. parapsilosis* komplekste azol direnci ile en sık ilişkilendirilmiş olan *ERG11* ve *MRR1* genleri incelenmiş; ancak, bazı dirençli izolatlarda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu durum, *Candida* türlerinde azol duyarlılığına etkisi bilinen diğer genlerin de araştırılmasının gerektiğine işaret etmektedir.

6. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada merkezimizde kandidemi etkeni *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında tür dağılımı belirlenmiş ve literatür ile uyumlu olarak *C. parapsilosis sensu stricto*'nun baskın olduğu görülmüştür. İnvaziv enfeksiyon etkeni olan bu izolatlarda yıllar içinde azol duyarlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, aktif süveyans çalışmalarının gerekliliğine işaret etmiştir. Ülkemizde ilk defa *C. parapsilosis* komplekste azol direncine neden olan moleküler mekanizmalar araştırılmış, *ERG11* ve *MRR1* genlerinde azol direncine neden olan olduğu bilinen mutasyonların yanı sıra daha önce bildirilmemiş bazı gen değişimleri de saptanmıştır. Belirlenen mutasyonların azol direnci ile ilişkisinin netleştirilmesi için ek çalışmalar gerekmektedir. Ayrıca, bu genlerde farklılık gözlenmeyen dirençli izolatların da bulunması diğer direnç mekanizmalarının da araştırılmasının uygun olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, Turner SA, Butler G, Vágvölgyi C, Gácsér A. 2019. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical microbiology reviews* 32:e00111-18.
2. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. 2012. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 73:293-300.
3. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology* 43:284-292.
4. Pfaller M, Diekema D, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov A, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs D. 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *Journal of clinical microbiology* 43:5848-5859.
5. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, Gomez-de-la-Pedrosa EG. 2011. Epidemiology, Molecular identification and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Isolated from patients with candidemia: prospective multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy: AAC*. 00466-11.
6. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, Tóth R, Papp C, Hamari Z, Vágvölgyi C. 2013. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PloS one* 8.
7. Treviño-Rangel RdJ, González JG, González GM. 2013. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Sabouraudia* 51:331-335.
8. Cornely O, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg B, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup M, Arikan-Akdagli S. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clinical Microbiology and Infection* 18:19-37.
9. Ullmann A, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup M, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clinical Microbiology and Infection* 18:53-67.
10. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. 2015. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a US surveillance system. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:1030-1037.
11. Pristov KE, Ghannoum MA. 2019. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* 25:792-798.
12. Homei A, Worboys M. 2013. *Fungal disease in Britain and the United States 1850-2000: Mycoses and modernity*. Springer.
13. Sáez-Gómez J, Romero-Maroto M. 2010. Scientific ideas on muguet (Thrush) in the XVIII century. *Journal of dental research* 89:571-574.
14. Barnett JA. 1998. A history of research on yeasts 1: work by chemists and biologists 1789–1850. *Yeast* 14:1439-1451.

15. Barnett JA.2003. A history of research on yeasts 6: the main respiratory pathway. *Yeast* 20:1015-1044.
16. Barnett JA.2007. A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics1. *Yeast* 24:799-845.
17. Barnett JA.2008. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast* 25:385-417.
18. Gaynes R.2017. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases* 23:849.
19. Seelig MS.1966. The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infections. *The American journal of medicine* 40:887-917.
20. Kozinn PJ, Taschdjian CL.1966. *Candida albicans*: Saprophyte or Pathogen?: A Diagnostic Guideline. *Jama* 198:170-172.
21. McCarthy GM.1992. Host factors associated with HIV-related oral candidiasis: a review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 73:181-186.
22. Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Giannini MM.2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology* 62:10-24.
23. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW.2017. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of fungi* 3:57.
24. Köhler JR, Casadevall A, Perfect J.2015. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5:a019273.
25. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM.2013. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal* 32:e206.
26. Howell SA, Hazen KC. 2011. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance, p 1793-1821, *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. American Society of Microbiology.
27. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G.2011. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryotic cell* 10:578-587.
28. Bennett RJ, Turgeon BG.2017. Fungal sex: the Ascomycota. *The Fungal Kingdom*:115-145.
29. Scherer S, Stevens DA.1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 25:675-679.
30. Lin D, Wu L-C, Rinaldi MG, Lehmann PF.1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology* 33:1815-1821.
31. Kosa P, Valach M, Tomaska L, Wolfe KH, Nosek J.2006. Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic acids research* 34:2472-2481.
32. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA.2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical reviews in microbiology* 35:283-309.
33. Brooks GF. 2010. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology/Geo. F. Brooks...[et al.]. New York; Chicago: McGraw Hill Medical.
34. Bowman SM, Free SJ.2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28:799-808.
35. Gow NA, Latge J-P, Munro CA.2017. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *The fungal kingdom*:267-292.

36. de Nobel H, van den Ende H, Klis FM.2000. Cell wall maintenance in fungi. Trends in microbiology 8:344-345.
37. Hopke A, Brown AJ, Hall RA, Wheeler RT.2018. Dynamic fungal cell wall architecture in stress adaptation and immune evasion. Trends in microbiology 26:284-295.
38. Sant D, Tupe S, Ramana C, Deshpande M.2016. Fungal cell membrane—Promising drug target for antifungal therapy. Journal of applied microbiology 121:1498-1510.
39. Rodrigues ML.2018. The multifunctional fungal ergosterol. MBio 9:e01755-18.
40. Rella A, Farnoud AM, Del Poeta M.2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. Progress in lipid research 61:63-72.
41. Koselny K, Mutlu N, Minard AY, Kumar A, Krysan DJ, Wellington M.2018. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. MBio 9:e01204-18.
42. Prasad R, Shah AH, Rawal MK. 2016. Antifungals: mechanism of action and drug resistance, p 327-349, Yeast Membrane Transport. Springer.
43. Liu J-F, Xia J-J, Nie K-L, Wang F, Deng L.2019. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35:98.
44. Burg JS, Espenshade PJ.2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. Progress in lipid research 50:403-410.
45. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J.2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS microbiology reviews 36:288-305.
46. Sharma J, Rosiana S, Razzaq I, Shapiro RS.2019. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. Journal of Fungi 5:17.
47. Walsh TJ, Hayden RT, Larone DH. 2018. Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification. John Wiley & Sons.
48. Kim S-K, El Bissati K, Mamoun CB.2006. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. Microbiology 152:2885-2894.
49. Wickes BL, Wiederhold NP.2018. Molecular diagnostics in medical mycology. Nature communications 9:1-13.
50. Hilmioğlu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, Denning DW.2019. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. Mycoses 62:22-31.
51. Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Karhu J, Koskela M, Laurila J, Ohtonen P, Syrjälä H.2012. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment. Critical Care 16:R62.
52. Klingspor L, Tortorano A, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegaki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R.2015. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)(2006–2008). Clinical Microbiology and Infection 21:87. e1-87. e10.
53. Cattana ME, Dudiuk C, Fernández M, Rojas F, Alegre L, Córdoba S, Garcia-Effron G, Giusiano G.2017. Identification of *Candida parapsilosis sensu lato* in pediatric patients and antifungal susceptibility testing. Antimicrobial agents and chemotherapy 61:e02754-16.

54. D G, AK S, N A, S D, S A-A.2019. P242 : Changing trends in genus and species distributions of clinical fungal strains: An evaluation of ten-year data from a tertiary care center in Turkey. *Journal of Fungi* 5:95.
55. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL.2006. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research* 6:979-986.
56. Kozik A, Karkowska-Kuleta J, Zajac D, Bochenska O, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Rapala-Kozik M.2015. Fibronectin-, vitronectin-and laminin-binding proteins at the cell walls of Candida parapsilosis and Candida tropicalis pathogenic yeasts. *BMC microbiology* 15:197.
57. Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N, Arikan-Akdagli S, Aydin F.2013. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of Candida parapsilosis complex strains isolated from clinical samples. *Medical Mycology* 51:483-492.
58. Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, Ayadi A.2017. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of biomedical science* 24:67.
59. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2015. *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences.
60. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2014. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26*. AMGH Editora.
61. Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ.1996. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clinical Infectious Diseases* 22:S73-S88.
62. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD.2008. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews* 21:606-625.
63. Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz MdM, Zancopé-Oliveira RM.2016. The identification and differentiation of the Candida parapsilosis complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 111:267-270.
64. Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD.2007. Virulence of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology* 44:1336-1341.
65. Constante C, Monteiro A, Alves S, Carneiro L, Machado M, Severo L, Park S, Perlin D, Pasqualotto A.2014. Different risk factors for candidemia occur for Candida species belonging to the C. parapsilosis complex. *Sabouraudia* 52:403-406.
66. Baron E, Weinstein M, Dunne W, Yagupsky P, Welch D, Wilson D.2005. *Cumitech 1C, blood cultures IV*. Baron EJ, co-ordinating editor ASM Press, Washington, DC.
67. Cuenca-Estrella M, Verweij P, Arendrup M, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly J, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson M, Akova M.2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 18:9-18.
68. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C.2010. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Critical care* 14:R222.
69. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, Groeger JS, Judson MA, Vinagre Y-M, Heard SO.2015. T2 magnetic resonance assay

- for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clinical Infectious Diseases* 60:892-899.
70. Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J.2015. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert review of anti-infective therapy* 13:787-798.
 71. Stone N, Gorton R, Barker K, Ramnarain P, Kibbler C.2013. Evaluation of PNA-FISH yeast traffic light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact. *Journal of clinical microbiology* 51:1301-1302.
 72. Abdelhamed AM, Zhang SX, Watkins T, Morgan MA, Wu F, Buckner RJ, Fuller DD, Davis TE, Salimnia H, Fairfax MR.2015. Multicenter evaluation of Candida QuickFISH BC for identification of Candida species directly from blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology* 53:1672-1676.
 73. Kidd SE, Chen SC-A, Meyer W, Halliday CL.2020. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Frontiers in Microbiology* 10:2903.
 74. Procop GW, Church D, Hall G, Janda W. 2017. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Wolters Kluwer.
 75. Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R.2007. *Descriptions of medical fungi*. 2nd edi. Australia: Adelaide Medical Centre for Women and Children.
 76. Haas M, Grenouillet F, Loubersac S, Ariza B, Pepin-Puget L, Alvarez-Moreno CA, Valderrama-Beltrán SL, Lavergne R-A, Le Pape P, Morio F.2016. Identification of cryptic Candida species by MALDI-TOF mass spectrometry, not all MALDI-TOF systems are the same: focus on the C. parapsilosis species complex. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 86:385-386.
 77. Carolis ED, Hensgens LA, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S, Tavanti A.2014. Identification and typing of the Candida parapsilosis complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Sabouraudia* 52:123-130.
 78. Asadzadeh M, Ahmad S, Hagen F, Meis JF, Al-Sweih N, Khan Z.2015. Simple, low-cost detection of Candida parapsilosis complex isolates and molecular fingerprinting of Candida orthopsilosis strains in Kuwait by ITS region sequencing and amplified fragment length polymorphism analysis. *PLoS One* 10.
 79. Chen JH, Yam W-C, Ngan AH, Fung AM, Woo W-L, Yan M-K, Choi GK, Ho P-L, Cheng VC, Yuen K-Y.2013. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *Journal of clinical microbiology* 51:3981-3987.
 80. Delavy M, Dos Santos AR, Heiman CM, Coste AT.2019. Investigating antifungal susceptibility in candida species with maldi-tof ms-based assays. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 9.
 81. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M.2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert review of proteomics* 10:151-164.
 82. Chao Q-T, Lee T-F, Teng S-H, Peng L-Y, Chen P-H, Teng L-J, Hsueh P-R.2014. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PloS one* 9.
 83. Tay ST, Na SL, Chong J.2009. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of Candida parapsilosis isolated from patients with bloodstream infections. *Journal of medical microbiology* 58:185-191.

84. Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. 2010. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *Journal of medical microbiology* 59:414-420.
85. Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. 2007. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *Journal of clinical microbiology* 45:1455-1462.
86. Lockhart SR, Warnock DW. 2015. Antifungal Agents, p 2223-2235, *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology.
87. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical microbiology reviews* 12:40-79.
88. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen M-H. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases* 50:291-322.
89. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ. 2016. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 62:e1-e50.
90. Pfaller M, Messer S, Hollis R, Jones R. 2001. In Vitro Activities of Posaconazole (Sch 56592) Compared with Those of Itraconazole and Fluconazole against 3,685 Clinical Isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2862-2864.
91. Sabatelli F, Patel R, Mann P, Mendrick C, Norris C, Hare R, Loebenberg D, Black T, McNicholas P. 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50:2009-2015.
92. Heimann SM, Penack O, Heinz WJ, Rachow T, Egerer G, Kessel J, Claßen AY, Vehreschild JJ. 2019. Intravenous and tablet formulation of posaconazole in antifungal therapy and prophylaxis: A retrospective, non-interventional, multicenter analysis of hematological patients treated in tertiary-care hospitals. *International Journal of Infectious Diseases* 83:130-138.
93. Wang J-F, Xue Y, Zhu X-B, Fan H. 2015. Efficacy and safety of echinocandins versus triazoles for the prophylaxis and treatment of fungal infections: a meta-analysis of RCTs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34:651-659.
94. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A. 2000. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44:57-62.
95. Larkin EL, Dharmaiah S, Ghannoum MA. 2018. Biofilms and beyond: expanding echinocandin utility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:i73-i81.
96. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:2305-2312.
97. Baginski M, Czub J. 2009. Amphotericin B and its new derivatives-mode of action. *Current drug metabolism* 10:459-469.

98. Ullmann A, Cornely O, Donnelly JP, Akova M, Arendrup M, Arican-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection* 18:1-8.
99. Pfaller MA. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine* 125:S3-S13.
100. Espinel-Ingroff A. 2003. Susceptibility test methods; yeasts and filamentous fungi. *Manual of clinical microbiology*:1880-1893.
101. Sanguinetti M, Posteraro B. 2017. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* 23:931-934.
102. CLSI. 2017. CLSI Document M60A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, vol

Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

103. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents Version 10.0

<http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>. Accessed

104. Dalhoff A, Ambrose P, Mouton J. 2009. A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints. *Infection* 37:296-305.
105. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Cantón E, Pemán J. 2010. Emerging resistance to azoles and echinocandins: clinical relevance and laboratory detection. *Current Fungal Infection Reports* 4:186-195.
106. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. 2015. Update on antifungal drug resistance. *Current clinical microbiology reports* 2:84-95.
107. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. 2011. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International journal of microbiology* 2012.
108. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. 2017. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in microbiology* 7:2173.
109. Castanheira M, Deshpande LM, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. 2020. 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* 55:105799.
110. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. 2004. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryotic cell* 3:1639-1652.
111. Berkow EL, Manigaba K, Parker JE, Barker KS, Kelly SL, Rogers PD. 2015. Multidrug transporters and alterations in sterol biosynthesis contribute to azole antifungal resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:5942-5950.
112. Xiang M-J, Liu J-Y, Ni P-H, Wang S, Shi C, Wei B, Ni Y-X, Ge H-L. 2013. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS yeast research* 13:386-393.
113. Souza ACR, Fuchs BB, Pinhati HM, Siqueira RA, Hagen F, Meis JF, Mylonakis E, Colombo AL. 2015. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:6581-6587.

114. Rybak JM, Dickens CM, Parker JE, Caudle KE, Manigaba K, Whaley SG, Nishimoto AT, Luna-Tapia A, Roy S, Zhang Q.2017. Loss of C-5 sterol desaturase activity results in increased resistance to azole and echinocandin antifungals in a clinical isolate of *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61:e00651-17.
115. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.
116. Fujita S-i, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T.2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of clinical microbiology* 39:3617-3622.
117. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ.2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology* 46:2659-2664.
118. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG.2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *Journal of clinical microbiology* 47:2392-2397.
119. NCBI. NCBI Bioinformatics Resources: An Introduction: BLAST: Compare & identify sequences. <https://guides.lib.berkeley.edu/ncbi/blast>. Accessed
120. Arendrup M, Meletiadis J, Mouton J, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. EUCAST definitive document E.DEF 7.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.
121. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB.2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:6241-6246.
122. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016, p S79-S94. *In* (ed), Oxford University Press US,
123. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU.2009. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of medical microbiology* 58:745-752.
124. Bonfietti LX, dos Anjos Martins M, Szeszs MW, Pukiskas SBS, Purisco SU, Pimentel FC, Pereira GH, Silva DC, Oliveira L, Melhem MdSC.2012. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *Journal of medical microbiology* 61:1003-1008.
125. Cilo BD, Ağca H, Ener B. Identification of *Candida parapsilosis* Complex Strains Isolated from Blood Samples at Species Level and Determination of Their Antifungal Susceptibilities.
126. Gülmez D, Alp S, Gursoy G, Ayaz CM, Dogan O, Arikan-Akdagli S, Akova M.2020. Mixed fungemia: an 18-year report from a tertiary care university hospital and a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*.
127. Barbedo LS, Vaz C, Pais C, Figueiredo-Carvalho MHG, de Medeiros Muniz M, Zancoppe-Oliveira RM, Sampaio P.2015. Different scenarios for *Candida parapsilosis*

- fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *Journal of medical microbiology* 64:7-17.
128. Thomaz DY, de Almeida Jr JN, Lima GME, Nunes MdO, Camargo CH, Grenfell RdC, Benard G, Del Negro G. 2018. An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. *Frontiers in microbiology* 9:2997.
 129. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. 2014. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 79:198-204.
 130. Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, Coovadia Y, Kularatne R, Govind C, Lockhart SR, Zietsman IL. 2016. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 71:1994-2004.
 131. Arian-Akdagli S, Gülmez D, Doğan Ö, Çerikçioğlu N, Dereli MD, Birinci A, Yıldırım ŞT, Ener B, Öz Y, Metin DY. 2019. First multicentre report of in vitro resistance rates in candidaemia isolates in Turkey. *Journal of global antimicrobial resistance* 18:230-234.
 132. Branco J, Silva AP, Silva RM, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Butler G, Rodrigues AG, Miranda IM. 2015. Fluconazole and voriconazole resistance in *Candida parapsilosis* is conferred by gain-of-function mutations in MRR1 transcription factor gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:6629-6633.
 133. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. 2015. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5:a019752.
 134. Sellam A, Tebbji F, Nantel A. 2009. Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 8:1174-1183.
 135. Silva A, Miranda I, Guida A, Synnott J, Rocha R, Silva R, Amorim A, Pina-Vaz C, Butler G, Rodrigues A. 2011. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:3546-3556.
 136. Alvarez-Rueda N, Fleury A, Morio F, Pagniez F, Gastinel L, Le Pape P. 2011. Amino acid substitutions at the major insertion loop of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase are involved in fluconazole resistance. *PLoS One* 6.
 137. Choi YJ, Kim Y-J, Yong D, Byun J-H, Kim TS, Chang YS, Choi MJ, Byeon SA, Won EJ, Kim SH. 2018. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* bloodstream isolates with Y132F mutation in ERG11 gene, South Korea. *Emerging infectious diseases* 24:1768.
 138. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. 2017. Epidemiology and molecular basis of resistance to fluconazole among clinical *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Microbial Drug Resistance* 23:966-972.
 139. Zhang L, Xiao M, Watts MR, Wang H, Fan X, Kong F, Xu Y-C. 2015. Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. *BMC infectious diseases* 15:340.