



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
NORVEGENSIS İZOLATLARININ MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ, VİRÜLANS FAKTÖRLERİ VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. OSMAN KÜÇÜKOĞLU

KAYSERİ-2022



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
NORVEGENSIS İZOLATLARININ MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ, VİRÜLANS FAKTÖRLERİ VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. OSMAN KÜÇÜKOĞLU

Bu Uzmanlık Tezi Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi Tarafından TTU-2020-10445 Kodlu Proje ile Desteklenmiştir.

Danışman
Doç. Dr. FATMA MUTLU SARIGÜZEL

KAYSERİ-2022

TEŞEKKÜR

Öncelikle asistanlık dönemim boyunca bana güvenen, hiçbir durumda destek ve emeklerini esirgemeyen rahmetli hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin Kılıç'a; tez çalışmaları süresince tecrübelerinden çokça yararlandığım, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. A. Nedret Koç ve Doç. Dr. Fatma Mutlu Sarıgözel'e; Mikrobiyoloji Bölümü'nde isminden sıkça bahsedilen; fakat kendisini tanıma fırsatına asistanlığımın üçüncü yılında eriştiğim, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Viroloji Bilim Dalı'nda yan dal uzmanlığı eğitimi sonucu edindiği bilgilerle Temel Mikrobiyoloji alanında önceden edinmiş olduğu bilgileri başarılı bir şekilde sentez eden ve sahip olduğu geniş bilgi repertuarından her vakit istifade ettiğim Sayın Öğr. Gör. Dr. Ömür Mustafa Parkan'a teşekkür ederim.

TTU-2020-10445 kodlu bu tez projesinin yürütülmesinde bütçe olanağı sağlayan ve fikri yardımlarda bulunan Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim sırasında her an yanımda olan biricik eşime, bana yaşam enerjisi veren çocuklarıma, en zor anlarda maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli anne-babama, bütün aşamalarda fikir alışverişi yaptığım sevgili kardeşime ve tez çalışmasından elde edilen verilerin istatistiksel analizinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların yorumlanmasında katkı sağlayan Uzm. Dr. Seçkin Özsaydı'ya teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvardaki yoğun iş akışına rağmen tezimin her bir aşamasında büyük yardımları olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı çalışanlarına da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Candida norvegensis</i>	5
2.1.1. <i>Candida norvegensis</i> 'in tarihçesi.....	5
2.1.2. <i>Candida norvegensis</i> 'in taksonomisi	7
2.1.3. <i>C. norvegensis</i> 'in epidemiyolojisi.....	9
2.1.4. <i>C. norvegensis</i> 'in patogenezi	11
2.1.5. <i>Candida norvegensis</i> 'in potansiyel virölans faktörleri	12
2.1.5.1. Adezyon.....	12
2.1.5.2. Ekstraselüler hidrolitik enzim üretimi.....	13
2.1.5.3. Biyofilm formasyonu	16
2.1.5.4. Fenotipik değişim (Phenotypic switching).....	18
2.1.5.5. Maya-hif dimorfizmi (Morfogenez).....	19
2.2. <i>Candida norvegensis</i> 'te Antifungal İlaçlara Direnç Mekanizmaları.....	20
2.3. <i>Candida norvegensis</i> 'in Klinik Önemi.....	24
2.4. İnvaziv Kandidoz için Risk Faktörleri	26
2.5. <i>Candida norvegensis</i> Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısında Kullanılan Yöntemler	28
2.5.1. Direkt mikroskopik inceleme	28

2.5.2. Boyalı mikroskopik inceleme	29
2.5.3. Kültür temelli tanı yöntemleri.....	30
2.5.3.1. Kültürde makroskopik morfolojinin değerlendirilmesi.....	30
2.5.3.2. Mikroskopik tanımlama	30
2.5.3.2.1. Germ tüp testi.....	30
2.5.3.2.2. Blastokonidi, hif/psödohif ve klamidospore oluşumu.....	31
2.5.3.3. Biyokimyasal özelliklerin incelenmesi	32
2.5.3.4. Kültür dışı tanı yöntemleri	34
2.5.3.4.1. Serolojik testler	34
2.5.3.4.2. Moleküler yöntemler.....	36
2.6. Antifungal Duyarlılık Testleri	40
2.6.1. Standart sıvı dilüsyon test yöntemleri	40
2.6.2. Alternatif antifungal duyarlılık test yöntemleri.....	41
2.6.2.1. Kolorimetrik temelli dilüsyon yöntemleri	41
2.6.2.2. Vitek 2 YST ID (BioMérieux) otomatize maya duyarlılık test yöntemi	42
2.6.2.3. Gradient strip (E [®] test, BioMérieux) test yöntemi	42
2.7. <i>Candida norvegensis</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar	43
2.7.1. Polyen makrolid sınıfı antifungal ilaçlar.....	43
2.7.2. Azol grubu antifungal ilaçlar	44
2.7.3. Ekinokandinler	45
2.7.4. Hücre döngüsü ve nükleik asit sentezinde inhibisyona neden olan diğer antifungaller	47
2.8. Moleküler Epidemiyolojide Temel Prensipler	47
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Klinik Örnek Türleri.....	49
3.2. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi (Direkt/Boyalı)	49
3.3. Primer İzolasyon.....	50
3.4. İzolatların Rutinde Kullanılan Konvansiyonel Yöntemlerle Tanımlanması ...	50

3.4.1. Kùltür için genel kullanım besiyerleri	51
3.4.2. Germ tûp testi	52
3.4.3. Mısıır unlu-Tween 80 agarda mikroskopik morfolojinin değerlendirilmesi	53
3.4.4. İzolatların CHROMagar <i>Candida</i> (CHROMagar Company, Paris, France) kromojenik besiyeri kullanılarak tanımlanması.....	54
3.4.5. API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari tanımlama kiti kullanılarak karbonhidrat fermentasyon/asimilasyon özelliklerinin değerlendirilmesi	54
3.4.6. Üreaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi.....	56
3.4.7. Eskülin hidrolaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi.....	56
3.5. İzolatların Saklanması	57
3.6. Konvansiyonel Yöntemlerle <i>C. norvegensis</i> Olarak Tanımlanan Suşların Moleküler Yöntemlerle Yeniden Tanımlanması	58
3.6.1. DNA ekstraksiyonu (izolasyonu).....	58
3.6.2. PCR reaksiyonu.....	58
3.6.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	59
3.6.4. Sekans PCR reaksiyonu	60
3.6.5. DNA dizileme ürünlerinin saflaştırılması	61
3.6.6. DNA dizi analizi	61
3.7. Filogenetik Analiz	62
3.8. Virölans Faktörlerinin Belirlenmesi	62
3.8.1. Fosfolipaz aktivitesinin değerlendirilmesi	62
3.8.2. Salgısal aspartil proteinaz aktivitesinin değerlendirilmesi.....	63
3.8.3. Esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi	64
3.8.4. Biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi	65
3.9. Antifungal Duyarlılık Testleri	67
3.9.1. Sıvı mikrodilüsyon test yöntemi	67
3.9.1.1. RPMI 1640 sıvı besiyerinin hazırlanması	67
3.9.1.2. Antifungal ilaçların stok solüsyonlarının hazırlanması.....	67
3.9.1.3. Standart maya inokulumunun hazırlanması ve dilüsyonu.....	68

3.9.1.4. Testin yapılması	68
3.9.1.5. Sonuçların yorumlanması.....	70
3.9.2. Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) test yöntemi.....	70
3.9.2.1. Maya inokulumunun hazırlanması ve sulandırılması.....	70
3.9.2.2. Testin uygulanması.....	71
3.9.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	71
3.10. İstatiksel Analiz	71
4.BULGULAR	72
4.1. Suşların İzole Edildiği Hastaların Demografik Özelliklerinin İncelenmesi....	72
4.2. Suşların Elde Edildiği Vücut Bölümleri ve Klinik Örnek Türleri.....	77
4.3. Suşların Rutinde Kullanılan Konvansiyonel Yöntemlerle Tanımlanması	79
4.4. <i>C. norvegensis</i> Olarak Tanımlanan Suşların Eskülin Hidroliz Aktivitesi ve Moleküler Yöntemlerle Yeniden Tanımlanması	79
4.5. <i>Candida inconspicua</i> Suşlarının Filogenetik Analizi.....	82
4.6. Suşların Çeşitli Virülans Faktörlerinin Değerlendirilmesi	84
4.7. Suşların Çeşitli Antifungal Ajanlara Duyarlılıklarının Farklı Yöntemlerle Test Edilmesi.....	87
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	100
TEZ ONAY SAYFASI.....	120

KISALTMALAR

ABC	: ATP-binding cassette
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Acquired immune deficiency sendrome
AML	: Akut myeloblastik lösemi
BAL	: Bronkoalveoler lavaj
BHIB	: Brain heart infusion broth
BLAST	: Basic Local Alignment Search Toll
CBP	: Clinical breakpoint
CDR	: <i>Candida</i> drug resistance
CFU	: Colony-forming unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institue
dH₂O	: Deiyonize (distile) su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
ECV	: Epidemiological cutoff value
EF-1	: Elongation factor-1
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETA	: Endotrakeal aspirat
EUCAST	: European Commitee on Antimicrobial Suspectibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
GO	: Geometrik ortalama
HIV	: Human immunodeficiency virus
IGS	: Intergenic spacer
ITS	: Internal transcribed spacer
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MDR	: Multi-drug resistance

MFS	: Major facilitator super-family
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MLST	: Multi-Locus Sequence Typing
MMP	: Modifiye mikroplak
MOPS	: 3-N-morpholinopropane sulfonic acid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NWT	: Non-Wild Type
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PNA FISH	: Peptide Nucleic Acid Fluorescence In-Situ Hybridization
RAPD	: Randomly Amplification Polymorphic DNA
RAT	: Rice agar tween
rDNA	: Ribozomal deoksiribonükleik asit
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	: Radioimmunoassay
RNA	: Ribonükleik asit
SAP	: Salgısal aspartil proteinaz
SDA	: Sabouraud dekstroza agar
SF	: Serum fizyolojik
WGD	: Whole genome duplication
WT	: Wild Type
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi
YSA	: Yumurta sarılı agar

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. PCR reaksiyonundaki bileşenler ve reaksiyon karışımındaki miktarları	59
Tablo 3.2. Antifungal ilaç tozlarının jenerik isimleri ve potensleri.....	67
Tablo 3.3. Antifungal ilaç tozlarının çözücü ve sulandırıcıları	68
Tablo 4.1. Çalışmadaki hastaların demografik özelliklerinin incelenmesi.....	73
Tablo 4.2. Çalışmadaki suşların elde edildiği hastaların bölümlere göre dağılımı	74
Tablo 4.3. Suşların elde edildiği hastaların yaş ve cinsiyet durumları	74
Tablo 4.4. Hastaların ortalama±standart sapma ve ortanca (Min-Max) yaş değerleri.....	75
Tablo 4.5. <i>C. inconspicua</i> izole edilen hastaların karakteristik özellikleri.....	76
Tablo 4.6. <i>C. inconspicua</i> izole edilen hastalardaki klinik seyrin; yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi uygulaması gibi özelliklere göre karşılaştırılması	77
Tablo 4.7. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre çeşitli virülans faktörlerinin incelenmesi	85
Tablo 4.8. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre çeşitli virülans faktörlerinin incelenmesi (devamı).....	86
Tablo 4.9. <i>Candida inconspicua</i> suşlarındaki çeşitli virülans faktörlerinin dağılım sıklığı	87
Tablo 4.10. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre biyofilm formasyonu varlığı açısından karşılaştırılması	87
Tablo 4.11. Suşların test edilen antifungal ajanlar için sıvı mikrodilüsyon ve Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemleriyle saptanan MİK aralıkları, MİK ₅₀ /MİK ₉₀ değerleri ve geometrik ortalamaları (GO)	88
Tablo 4.12. Antifungal ajanların her iki yöntemle 24 ve 48. saatlerde tespit edilen MİK değerlerinin karşılaştırılması	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1.	Agar blok yöntemiyle hazırlanan lam kültür düzeneği (Çalışmadan)	53
Şekil 3.2.	İzolatların mısır unlu-Tween 80 agardaki mikroskopik görünümü (Çalışmadan, 40X)	53
Şekil 3.3.	Çalışmadaki izolatlara ait CHROMagar <i>Candida</i> besiyerindeki yassı, soluk kenarlı ve beyaz, pembe-lavanta renkli kolonilerin görünümü	54
Şekil 3.4.	Çalışmadaki izolatların API 20C AUX test stribindeki sadece glukoz ve gliserol asimilasyon reaksiyonu.....	55
Şekil 3.5.	Çalışmadaki izolatlara ait negatif üreaz aktivitesi.....	56
Şekil 3.6.	Safra eskülin agarda test edilen izolatlara ait negatif eskülin hidroliz aktivitesi (Çalışmadan).....	57
Şekil 3.7.	Safra eskülin agarda <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 referans suşuna ait pozitif eskülin hidroliz reaksiyonu (Çalışmadan).....	57
Şekil 3.8.	PCR reaksiyonunda kullanılan forward/reverse primer dizileri (33) .	59
Şekil 3.9.	PCR reaksiyonu koşulları	59
Şekil 3.10.	PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	
Şekil 3.11.	PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan reaksiyon koşulları	60
Şekil 3.12.	Sekans PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve hacimleri	60
Şekil 3.13.	Sekans PCR reaksiyonu koşulları.....	61
Şekil 3.14.	YSA besiyerinde a) <i>C. albicans</i> ATCC 90028 suşunun kuvvetli pozitif fosfolipaz aktivitesi, b) Suşların orta düzey fosfolipaz aktivitesi (Çalışmadan).....	63
Şekil 3.15.	Sığır serum albümin agarda a: Pozitif proteinaz aktivitesi (<i>C. albicans</i> ATCC 90028), b: Negatif proteinaz aktivitesi (Çalışmadan).....	64
Şekil 3.16.	Tween-80 agardaki pozitif esteraz aktiviteleri (Çalışmadan)	65
Şekil 3.17.	MMP yöntemiyle <i>C. inconspicua</i> suşlarının biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi.	66
Şekil 3.18.	Flukonazol ve 5-florositozin için mikropalak kuyucuklarında elde edilen nihai ilaç konsantrasyonları	69

Şekil 3.19.	Amfoterisin B, itrakonazol ve ketokonazol için mikropalak kuyucuklarında elde edilen nihai ilaç konsantrasyonları.....	69
Şekil 3.20.	Sıvı mikrodilüsyon testi (Çalışmadan)	70
Şekil 3.21.	Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemi (Çalışmadan)	71
Şekil 4.1.	Suşların elde edildiği vücut bölümlerine göre dağılımları	78
Şekil 4.2.	Suşların elde edildiği örnek türlerinin sayısı ve yüzdeleri (n: Örnek sayısı).....	78
Şekil 4.3.	1'den 30'a kadar numaralandırılan klinik izolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	79
Şekil 4.4.	1'den 30'a kadar numaralandırılan klinik izolatların EF-1 alfa gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	80
Şekil 4.5.	İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları.....	80
Şekil 4.6.	İzolatların EF-1 alfa gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları	81
Şekil 4.7.	İzolatların D1/D2 gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları	81
Şekil 4.8.	Çalışmadaki <i>C. inconspicua</i> suşları, Genbank veri tabanındaki <i>Pichia captophilia</i> kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve <i>Candida krusei</i> (Sinonim: <i>Pichia kudriavzevii</i>) referans suşuna ait ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü.....	82
Şekil 4.9.	Çalışmadaki <i>C. inconspicua</i> suşları, Genbank veri tabanındaki <i>Pichia captophilia</i> kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve <i>Candida krusei</i> (Sinonim: <i>Pichia kudriavzevii</i>) referans suşuna ait EF-1 alfa gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü	83
Şekil 4.10.	Çalışmadaki <i>C. inconspicua</i> suşları, Genbank veri tabanındaki <i>Pichia captophilia</i> kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve <i>Candida krusei</i> (Sinonim: <i>Pichia kudriavzevii</i>) referans suşuna ait D1/D2 gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü	84

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA NORVEGENSIS*
İZOLATLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ, VİRÜLANS
FAKTÖRLERİ VE ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Amaç: *Candida norvegensis* özellikle immunsuprese bireylerde, başta solunum yolu enfeksiyonları olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Flukonazole karşı azalmış duyarlılık göstermesiyle son zamanlarda önemi gittikçe artan bu patojen, fenotipik açıdan *Candida inconspicua* ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği için konvansiyonel tanı yöntemleriyle bu iki türün ayırımında çoğunlukla hatalı tanımlamalar olmaktadır.

Bu çalışmada, çeşitli örneklerden izole edilen *Candida norvegensis* suşlarının moleküler epidemiyolojisi, Virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde Ocak 2015-Temmuz 2021 tarihleri arasında takip edilen 40 hastadan alınan klinik örnekler çalışmaya dahil edildi. Klinik örneklerden soyutlanan izolatlar, rutin konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı. Ayrıca, rutin tanımlamada bulunmayan eskülin hidroliz aktivitesi de değerlendirildi. Otuz izolatin, konvansiyonel yöntemlerle birlikte ribozomal DNA'daki üç gen bölgesi kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Evrimsel yakınlığın belirlenmesi için çalışmadaki suşlarla birlikte Genbank veri tabanında kayıtlı *Pichia captophilia* kladındaki bazı referans suşlar ve dış grup olarak *Candida krusei* referans suşu kullanılarak neighbour-joining yöntemiyle filogenetik ağaç oluşturuldu. Virülans faktörleri fenotipik olarak araştırıldı. Suşların MİK (Minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri, CLSI M60-Ed2 rehberinin önerdiği sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik temelli Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™, ABD) ticari mikrodilüsyon yöntemleriyle belirlendi. Verilerin analizinde SPSS v28.0 (IBM Co, New York, ABD) programı kullanıldı. Değişkenlerin ortalama, ortanca ve yüzde değerleri hesaplandı. Kategorik değişkenler için “Fisher

exact ki kare” ve “ki kare” testleri; parametrik olmayan sayısal değişkenler için ise “Wilcoxon T” testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Konvansiyonel yöntemlerle *Candida norvegensis* olarak tanımlanan suşlar, ITS1-5,8S-ITS2 (Internal transcribed spacer1-2), EF-1 (Elongation factor-1) alfa ve D1/D2 gen bölgeleri kullanılarak yapılan dizi analizi sonucunda *Candida inconspicua* olarak tanımlandı. Evrimsel yakınlığın değerlendirilmesinde kullanılan gen bölgelerinin tür içi nükleotid varyasyonları göstermediği ve suşların tamamında benzer olduğu görüldü. Çalışmadaki suşların izole edildiği klinik örneklerin gönderildiği bölümler ve gönderilme zamanları dikkate alındığında, salgın olasılığını düşündürecek bir klonal ilişki bulunmadı. Suşların tamamında esteraz aktivitesi, %97,5 (39/40)’inde fosfolipaz aktivitesi ve %37,5 (15/40)’inde biyofilm formasyonu pozitif olarak bulundu. Bütün suşlarda proteinaz aktivitesi negatifti. Sıvı mikrodilüsyon ve Sensititre™ Yeastone™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemleriyle en yüksek MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinin sırasıyla flukonazol ve 5-florositozine ait olduğu saptandı. Her bir yöntem için 24 ve 48. saatteki MİK değerleri karşılaştırıldığında, MİK ortanca ve minimum-maksimum değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$).

Sonuç: *Candida norvegensis* ve *Candida inconspicua* ayırımında konvansiyonel yöntemlerin yetersiz olduğu; ITS1-5,8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri hedeflenerek gerçekleştirilen dizi analizinin tür düzeyinde kesin ayırım gösterdiği belirlenmiştir. Bu gen bölgelerinin filogenetik analizinin suşlar arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymada yeterli olmadığı; bu nedenle MLST (Multi-Locus Sequence Typing), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) gibi farklı moleküler yaklaşımlara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Eskülin hidroliz reaksiyonunun diğer konvansiyonel yöntemlere kıyasla yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ve moleküler tanı olanaklarının bulunmadığı durumlarda başvurulabilecek alternatif bir test olduğu belirlenmiştir. Esteraz, fosfolipaz enzim aktiviteleri ve biyofilm formasyonunun bu türün virülansında rol oynayabileceği düşünülmüştür. *C. inconspicua*’da flukonazole karşı invitro saptanan yüksek MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinin tedaviye yönelik antifungal ajan seçiminde göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antifungal duyarlılık, *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua*, Filogenetik analiz, Ribozomal DNA analizi, Virülans

**INVESTIGATION OF THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, VIRULANCE
FACTORS AND ANTIFUNGAL SENSITIVITY PATTERNS OF *CANDIDA*
NORVEGENSIS ISOLATES ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES**

SUMMARY

Objective: *Candida norvegensis* causes various infections, especially respiratory tract infections, especially in immunosuppressed individuals. This pathogen, which has become increasingly important recently due to its decreased susceptibility to fluconazole, has a high level of similarity with *Candida inconspicua* in terms of phenotypic, so there are often erroneous definitions in the distinction of these two species by conventional diagnostic methods.

In this study, it was aimed to evaluate the molecular epidemiology, virulence factors and antifungal susceptibility patterns of *Candida norvegensis* strains isolated from various samples.

Materials and methods: Clinical samples taken from 40 patients followed in various departments of Erciyes University Medical Faculty Hospitals between January 2015 and July 2021 were included in the study. After isolation from clinical specimens, isolates were identified by conventional methods in the routine diagnostic process. In addition, esculin hydrolysis activity, which is not included in the routine identification, was also evaluated. Sequence analysis of thirty isolates was performed using three gene regions in ribosomal DNA together with conventional methods. In order to determine evolutionary closeness a phylogenetic tree was created using the Neighbor-joining method, using some reference strains from the clade *Pichia captophilia* registered in the Genbank database, together with the strains in the study, and the *Candida krusei* reference strain as the outgroup. Virulence factors were investigated by standard procedures. The antifungal susceptibility of the strains was evaluated using gradient strip, Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (ThermoFisher Scientific™, USA) and broth microdilution test methods recommended by the CLSI M60-Ed2 guideline, and MIC (Minimum inhibitory concentration) values were determined. SPSS program was used in the analysis of the data. Mean, median and percentage values were

calculated for the variables. “Fisher exact chi-square” and “chi-square” tests for categorical variables; “Wilcoxon T” test was used for non-parametric numerical variables. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Results: Strains defined as *Candida norvegensis* by conventional methods were defined as *Candida inconspicua* as a result of sequence analysis using ITS1-5.8S-ITS2 (Internal transcribed spacer1-2), EF-1 (Elongation factor-1) alpha and D1/D2 gene regions. It was observed that the gene regions used in the evaluation of evolutionary closeness did not show intraspecies nucleotide variations and were similar in all strains. No clonal association was found to suggest the possibility of an outbreak, considering the departments where the strains in the study were isolated from and the time of sending the clinical samples. Esterase activity was positive and secretory aspartyl proteinase activity was negative in all of the strains. In addition, biofilm formation was positive in 37.5% (15/40) and phospholipase activity was positive in 97.5% (39/40). High MIC₅₀/MIC₉₀ values were determined for fluconazole by all three methods, for 5-fluorocytosine by broth microdilution and Sensititre™ Yeastone™ AST Plate methods. When the MIC values determined at 24 and 48 hours for each method were compared, a statistically significant difference was found between the median and minimum-maximum values of the MIC ($p<0.05$).

Conclusion: Conventional methods are insufficient for the differentiation of *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*; It was determined that the sequence analysis performed by targeting the ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alpha and D1/D2 gene regions showed definite discrimination at the species level. The phylogenetic analysis of these gene regions is not sufficient to reveal the molecular epidemiological relationship between the strains; For this purpose, it is thought that different molecular approaches such as MLST (Multi-Locus Sequence Typing) and PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) are needed. It has been determined that the esculin hydrolysis reaction has a high discrimination power compared to other conventional methods and is an alternative test that can be applied in cases where molecular diagnostic facilities are not available. Esterase, phospholipase enzyme activities and biofilm formation were thought to play a role in the virulence of this species. It was emphasized that the high MIC₅₀/MIC₉₀ values detected in vitro against fluconazole in *C. inconspicua* should be considered in the selection of antifungal agents for treatment.

Keywords: Antifungal susceptibility, *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua*, Phylogenetic analysis, Ribosomal DNA analysis, Virulence.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Candida türleri lokal ve sistemik fungal enfeksiyonlardan en sık izole edilen türler olup son yıllarda *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin sayısında ve klinik örneklerden izole edilme sıklığında artış olmaktadır. *Candida* türlerinin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar için risk faktörleri; immun yetmezlik, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, hematopoetik kök hücre ve solid organ transplantasyonu, agresif invaziv prosedürlerin kullanımı, uzun dönem immunsupresif tedavi, intravenöz kateterler, total parenteral beslenme, kemoterapi-radyoterapi ve retransplantasyon uygulamaları vb. olup; teknoloji ve antifungal profilaksi uygulamalarındaki gelişmelere rağmen hala önemli bir sorun teşkil etmektedir. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir epidemiyolojik çalışmada 1000 yoğun bakım hastası başına kandidemi insidansı 6,9 olarak rapor edilmekte ve bu hastaların %7,5'i de antifungal tedavi almaktadır (1, 2).

Candida norvegensis, insanların vajen florasında kommensal olarak bulunabilen; genellikle immunsuprese bireylerde nadiren de normal immun sisteme sahip bireylerde başta solunum yolu enfeksiyonları olmak üzere fungal sepsis, kataterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve peritonit gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olan ve yüksek flukonazol direnci ile son zamanlarda önemi gittikçe artan fırsatçı bir patojendir. Bu zamana kadar az sayıda olguda ve balgam, dışkı, idrar ve vajinal sekresyon gibi farklı klinik örnek türlerinde tespit edildiği bildirilmiştir (3-6). Literatürde bildirilen vakaların çoğunluğu sıklıkla Danimarka ve Norveç'ten olmakla beraber Türkiye'den de özellikle nötropenik hastalarda olmak üzere *C. norvegensis* ile ilişkili fungemi olgu bildirimleri bulunmaktadır (7) .

C. norvegensis ile fenotipik açıdan yüksek düzeyde benzerlik gösteren ve benzer klinik örnek türlerinden soyutlanan *C. inconspicua*, insanlarda orofarenks ve solunum sisteminin normal mikrobiyal florasında bulunan endojen kökenli saprofit bir maya türüdür. Klinik örneklerden Gram negatif basil morfolojisindeki bakteriler ve *Enterococcus* türleriyle birlikte izolasyonu, endojen kaynaklı bir habitat içerisinde varlığını sürdürdüğünü düşündürmektedir. İlk olarak 1952 yılında Lodder ve Kreger-van Rij tarafından nadir ilkel (rudimenter) psödohif varlığı nedeniyle *Torulopsis inconspicua* olarak tanımlanmış; klinik hastalıklarla ilişkisi, antifungal direnç paternlerinin *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi patojen türlerle benzerliği nedeniyle Yarrow ve Meyer tarafından 1978 yılında *Candida* cinsi içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır. Sıklıkla hematolojik ve solid organ maligniteli bireylerle HIV ile enfekte bireylerin oral kavite ve özofagus lezyonları, balgam, karaciğer biyopsi örneği ve kan gibi farklı klinik örnek türlerinden izole edilmektedir (5, 6).

Flukonazole karşı azalmış duyarlılık sergileyen ve son zamanlarda klinik önemi ortaya çıkan bu nadir fırsatçı patojenlerin doğal yaşam alanlarına ilişkin bilgiler net bir şekilde ortaya konulmadığı için bu türlerle kontaminasyonun kaynağı bilinmemektedir. Bununla birlikte, *C. norvegensis*'in Tanzanya'da yetişen ve yerel dilde "togwa" (Doğu Afrika'da mısır unu ve filizlenmiş parmak darısından üretilen, süt veya buzla beraber tüketilen geleneksel alkolsüz içecek) olarak adlandırılan bir ürün ile nekrotik kaktüs köklerinden izole edildiği; *C. inconspicua*'nın ise mastit enfeksiyonlu inekler ile günlük süt ürünlerinden izole edildiği bildirilmiş (8-10). Kontamine süt ve süt ürünlerinin potansiyel enfeksiyon kaynağı olabileceğini, bu nedenle pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin fungal enfeksiyonlar açısından risk altındaki hastalar tarafından tüketilmemesi düşüncesini desteklemektedir (11).

Antifungal ajanların profilaksi amacıyla özellikle kritik cerrahi ve yoğun bakım hastaları gibi çeşitli riskli popülasyonlarda yaygın kullanımı ile dirençli mantarların ortaya çıkması, maliyet etkin olsa bile bir endişe kaynağı olmakla beraber bazı klinik deneysel çalışmalarda profilaktik flukonazol kullanımının flukonazole dirençli mantarlarla kolonizasyon veya enfeksiyon riskinde bir artış göstermediği ortaya çıkmaktadır (12). Flukonazol profilaksi rejiminin, flukonazole dirençli mantarların uzun vadede ortaya çıkmasında bir artışa sebep olup olmadığı konusunda halen tartışmalar sürmekte ve rutin uygulamaya alınmadan önce flukonazole dirençli mantarların ortaya çıkma riskinde artışa yol açıp açmadığını değerlendirmek için büyük ölçekli, randomize kontrollü çalışmalara olan ihtiyaç önemli bir husus olmaya

devam etmektedir (13, 14). *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'da görülen flukonazol direncinin kazanılmış (sekonder) direnç yerine doğal (primer) direnç olduğu düşünülmektedir (15).

Candida türlerinin mikrobiyolojik identifikasyonunda kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur: kolonilerin makroskobik morfolojisi, lam kültürde mikroskobik görünüm, üre ve eskülin hidrolizi, kromojenik besiyerlerinde oluşan koloni morfolojisi ve rengi, karbonhidrat fermentasyon/asimilasyon testleri gibi rutin laboratuvar koşullarında sıklıkla uygulanan fakat; türler arası ayırmada sınırlı kapasiteye sahip olan konvansiyonel yöntemlerle ITS1-ITS2, 28S rDNA genomik alt ünitesindeki D1/D2 ile EF-1 alfa gen bölgelerindeki nükleotid dizilerinin Sanger metoduyla sekanslanmasına dayanan birinci nesil dizileme yöntemleri; birkaç yıl önce mikrobiyolojik tanı prosedürlerinin kalitesini artırmak için güçlü bir tanı aracı olarak ortaya çıkan ve tespit için gereken süreyi büyük ölçüde azaltan, proteomik temele dayanan MALDI-TOF MS (Matriks-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry); yakın zamanda ortaya çıkan, mikroorganizmaların tür düzeyinde hızlı ve kesin olarak tanımlanmasında kullanılan, önemli ölçüde deneyimli personel gerektiren, rutin mikrobiyolojik tanı laboratuvarları yerine henüz referans laboratuvarlarda araştırma amaçlı kullanılan ve yüksek maliyete sahip yeni nesil dizileme yöntemleri bunlardan birkaçıdır (16, 17). Mantar enfeksiyonları hastanede yatış süresini etkilerken aynı zamanda tedavi maliyetlerini de artırmaktadır. Bu açıdan etkenin doğru bir şekilde tanımlanması, hızlı ve etkin tedaviye öncülük etmesi açısından oldukça önemlidir. Bu yeni yaklaşım, zamandan tasarruf ederek, hastanede yatış süresini azaltmakta ve etkin ampirik tedavi yönetimiyle antifungallere dirençli fungal patojenlerin seleksiyonunu en aza indirerek bu enfeksiyonlardaki süreci iyileştirmektedir (18). *C. norvegensis*'in insanlarda görülen çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu etkenler arasında nadiren saptanması nedeniyle bu tür ile ilişkili fungal enfeksiyonların tedavisinde kanıt düzeyi düşük olmasına rağmen amfoterisin B'nin kullanılabileceği bildirilmiştir (19). Bununla birlikte amfoterisin B ile ilişkili nefrotoksisite, bu ajanın özellikle solid organ nakli alıcılarında kullanımını kısıtlamaktadır (20, 21). Ekinokandinler, invaziv kandidoz başta olmak üzere hayatı tehdit eden sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde çoğunlukla ilk tercih edilen antifungal ajanlardandır. Literatürde bildirilen raporlar, ekinokandinler sınıfı antifungal ajanların *Candida* türlerinin çoğuna karşı benzer in vitro MİK değerlerine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Kaspofunginin *C. norvegensis* de dahil olmak

üzere azol türevlerine dirençli çeşitli mikroorganizmalara karşı umut verici bir antifungal ajan olduğu ve *C. norvegensis*'e bağlı gelişen ciddi kan dolaşımı enfeksiyonlarında yüksek in vitro aktivite sergilediği tespit edilmiştir(19, 22).

Bu çalışmada; çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida norvegensis* suşlarının konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması, moleküler epidemiyolojik özellikleri, Virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık paternlerinin belirlenmesi amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Candida norvegensis*

2.1.1. *Candida norvegensis*'in tarihçesi

Mantarları ve mantarların neden oldukları hastalıkları inceleyen bilim dalı “mikoloji”, eski Yunan dilinde mantar anlamına gelen “mykes” kelimesinden türetilmiştir. Mantarların saç, deri ve tırnağı enfekte ettikleri ilk çağlardan bu yana hekimlerin dikkatini çekmiş olsa da mantarlarla ilgili detaylı bilgilere 19. yüzyıldan itibaren ulaşılmaktadır (23). Kandidozin tarihçesi M.Ö 4. yüzyılda Hippocrates’a kadar uzanmaktadır. “Epidemics” adlı eserinde Hippocrates’ın altta yatan ağır hastalığı olan kişilerde oral aft ve pamukçuğu tanımladığı kaydedilmiştir. Pamukçuk hastalığının gerçek manada tanımının tıp alanındaki modern gelişmeler sonucu 1771 yılında Rosen ve Rosenstein ile 1784 yılında Underwood tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Veron isimli bir araştırmacı, ilk kez 1835 yılında özofagus kandidiyazisini tarif etmiş ve hastalığın yenidoğana normal spontan vajinal doğum sırasında bulaştığını belirtmiştir.

Bütün bu gelişmelere rağmen, etken ilk defa Langenbeck tarafından 1839 yılında tifüslü bir hastanın ağzındaki pamukçuk lezyonundan alınan kazıntı örneğinde gösterilmiş fakat; bunun tifüs etkeni olduğu düşünülmüştür. Daha sonra bu organizmaya sırasıyla Rubin (1843) *Oidium albicans*, Zopf (1890) *Monilia albicans* ve Berkhout (1923) *Candida albicans* adını vermiştir. Bugüne kadar yüzün üzerinde isimlendirme önerilmiş olan *C. albicans*’ın isimlendirilmesindeki karışıklığı sona erdirmek amacıyla Berkhout tarafından “*Monilia*” yerine kullanılan “*Candida*”

kelimesi, 1954 yılında Paris'te düzenlenen sekizinci Botanik Kongresi'nde onaylanmış, böylece bu etkenin yaptığı hastalıklar için önceden kullanılan "moniliyazis" terimi yerine "kandidoz" terimi tercih edilmiştir (24).

Önceden *Candida* cinsi içerisinde yalnızca *C. albicans*'ın patojen olduğu düşünülmesine rağmen, klinik tecrübeler ve çeşitli deneysel modellerin sonuçlarına dayanılarak 1960'lı yıllardan sonra *C. stellatoidea*, *C. catenulata*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* gibi çeşitli *Candida* türlerinin de patojen olduğu kabul edilmiştir. Günümüzde ise; artan ilaç kullanımı, cerrahi girişimler, hematopoetik/solid organ nakilleri ve AIDS gibi immünsüpresif hasta popülasyonunda artışa yol açan durumların patojen *Candida* türlerinin sayısını daha da arttıracığı düşünülmektedir.

Candida inconspicua ve *Candida norvegensis*, invaziv enfeksiyonlardan nadiren soyutlanan, fenotipik özellikler açısından birbirleriyle yakından ilişkili ve flukonazole azalmış duyarlılık gösteren iki türdür. Tıbbi literatürde bu türlere ilişkin bildirilen raporların sayısı çok azdır. Moleküler tanı olanaklarının olmadığı durumlarda sıklıkla hatalı tanımlamalar görülebileceği için laboratuvar verileri dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. Bu türlerin ortaya çıkmasına yol açan nedenler belirsizliğini korumakta ancak; özellikle malignite ve transplant alıcıları gibi yüksek riskli hasta popülasyonlarındaki fungal enfeksiyonların önlenmesinde kullanılan flukonazol profilaksisinin selektif baskısının rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Önceden *Pichia norvegensis* olarak bilinen *Candida norvegensis*, ilk defa 1954 yılında pulmoner tüberkülozu olan Norveçli bir hastanın balgamından izolasyon sonrası olası tanımlanmış, daha sonra Lodder tarafından kesin olarak tanımlanmıştır (25, 26).

Candida inconspicua ilk olarak 1952 yılında Lodder ve Kreger-van Rij tarafından nadir ilkel (rudimenter) psödohif varlığı nedeniyle *Torulopsis inconspicua* olarak tanımlanmış; klinik hastalıklarla ilişkisi, antifungal direnç paternlerinin *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi patojen türlerle benzerliği nedeniyle Yarrow ve Meyer tarafından 1978 yılında *Candida* cinsi içerisinde yeniden sınıflandırılmıştır. İnsanlarda orofarenks ve solunum sisteminin normal mikrobiyal florasında bulunan endojen kökenli saprofit bir maya türüdür. Klinik örneklerden Gram negatif basil morfolojisindeki bakteriler ve *Enterococcus* türleriyle birlikte saptanması endojen kaynaklı olabileceğini açıklamaktadır.

2.1.2. *Candida norvegensis*'in taksonomisi

Candida cinsi maya mantarları, eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığıyla çoğalmakta ve bu farklı sporulasyon formları cinsin sınıflandırılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Başlangıçta, hif veya psödohif oluşturabilen ve herhangi bir eşeyli spor oluşumu gözlemlenmeyen maya türlerine atfedilen bu cins adının, son zamanlarda yapılan filogenetik analizler sonucunda *Saccharomycotina* alt bölümü içerisinde bulunan polifiletik bir grubu temsil ettiği ortaya konulmuştur (27, 28). Taksonomik olarak heterojen tür içeriğine sahip olan *Candida* cinsi; *Ascomycota* şubesi, *Saccharomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımı, *Saccharomycetaceae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. *Candida* cinsi içerisinde iki yüzden fazla sayıda tür bulunmakta; ancak moleküler tanı ve filogenetik analiz yöntemlerindeki gelişmeler sonucunda bu cins içerisinde yeniden düzenlenmeler meydana gelmektedir.

C. albicans, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. rugosa* ve *C. dubliniensis* gibi lösün yerine serin aminoasitine çevrilen CUG kodonuna sahip türlerin *Candida* CTG kladı içerisinde; *Saccharomycetes cerevisiae* ile birlikte WGD (Whole genom duplication) kladında bulunan *C. glabrata* ve *C. kefyr* türlerinin ise *Saccharomyceaceae* ailesi içerisinde yer aldığı saptanmıştır. Azol türevi antifungallere karşı direnç saptanan ve fenotipik olarak *C. glabrata*'ya benzer özellikler sergileyen *C. krusei*, *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* gibi yakın zamanda klinik önemi artan nadir türlerin de muhtemelen *Saccharomycetaceae* ailesiyle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (29).

Diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi maya taksonomisi de sürekli olarak değişmekte ve güncellenmektedir. DNA sekans analizleri ve evrimsel yakınlıkların gelişmiş moleküler tekniklerle araştırılması sonucu önceden tanımlanmış türler farklı taksonomik kategorilere yerleştirilmektedir. Son zamanlarda fenotipik ve morfolojik özellikler yönünden ayırt edilemeyen ancak spesifik gen bölgeleri hedeflenerek gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda birbirlerinden ayırt edilebilen “şifreli türler” veya “tür kompleksleri” gibi çeşitli mikroorganizma grupları tanımlanmıştır (30). *C. parapsilosis* kompleks (*C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*), *C. haemulonii* kompleks (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* ve *C. haemulonii* var. *vulnera*) ve *C. glabrata* kompleks (*C. glabrata* sensu stricto, *C. nivariensis* ve *C. bracarensis*) gibi klinik önemi olan çeşitli *Candida* türlerinin taksonomisinde önemli değişiklikler olmuştur; bu türler artık “tür kompleksleri” olarak kabul edilmektedir (31).

Pichia cinsi, çeşitli *Candida* türlerinin askospor üreten teleomorf formu olup; spesifik *Candida* türlerinin *Pichia* cinsine ait teleomorfları ile bağlantısı, askospor morfolojisine veya daha spesifik olarak 28S rDNA genomik alt ünitesinin sekans analizine dayanmaktadır. *C. glabrata* kladı üyeleriyle benzer fenotipik özellikler gösteren ve önceden *C. krusei* ve *P. fermentans* türleriyle birlikte *Pichia membranifaciens*/*P. fermentans* kladı içerisinde yer aldığı belirtilen *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın son taksonomik çalışmalar sonucu *P. cactophila* kladında *P. cactophila*, *P. insulana* ve *P. pseudocactophila* türleriyle birlikte yer aldığı tespit edilmiştir (32, 33). MALDI-TOF MS yönteminin, tür kompleksleri içindeki yakından ilişkili türlerin ayırt edilmesindeki başarısı iyi bilinmektedir (34). Bununla birlikte, *C. inconspicua* ve *P. cactophila* türleri arasında ayırım yapmada başarısız olması, ayrıca ITS 1-ITS 2 gen bölgeleriyle 28 S rDNA'da bulunan D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen dizi analizi sonucunda bu iki tür arasındaki sınırlı nükleotid dizi farklılığının tür içi düzeyde görülen değişkenlikle daha uyumlu olması ve bahsedilen üç gen bölgesinden herhangi birini kullanılarak yapılan filogenetik analiz sonucu bu türlerin her zaman tek bir küme içerisinde toplanması nedeniyle *C. inconspicua*'nın genotipik ve fenotipik olarak *P. cactophila* ile yüksek benzerlik gösterdiği, bu nedenle aynı türün farklı cinsel evrelerini temsil ettiği öne sürülmüştür (33).

Candida norvegensis, fenotipik olarak *Candida inconspicua* ile yüksek benzerlik göstermekte ve konvansiyonel tanı yöntemleriyle bu iki tür arasında sıklıkla doğru ayırım yapılamamaktadır. Bu türler arasındaki nükleotid dizi benzerliği %70 civarındadır (35). Filogenetik açıdan yakından ilişkili bu iki türün ayırımında çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Türlerin kesin olarak ayırımında rDNA'da bulunan ITS1-ITS2 ile 28 S rDNA ya ait D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgelerinin dizi analizi gibi genotipik yöntemlerle birlikte MALDI-TOF MS gibi proteomik temelli yöntemler kullanılmaktadır. Evrimsel süreç boyunca rDNA'daki diğer bölgelere nazaran daha sık varyasyonların saptandığı; 5S ve 26S rDNA genomik alt birimleri arasında yer alan IGS1 (Intergenic spacer1) bölgesi ile 18S ve 26S rDNA genomik alt birimleri arasında yer alan ITS1-ITS2 gen bölgelerinin yakın akrabalık gösteren bu türlerin doğru bir şekilde ayırımında kullanılabilecek genetik belirteçler olduğu bildirilmiştir (36). Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada ITS1-ITS2 ve D1/D2 gen bölgelerinin insersiyon/delesyon nedeniyle çok sayıda allelik varyant göstermesi nedeniyle *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın ayırımında kullanılmaması gerektiği;

bunun yerine EF-1 alfa gen bölgesinin dizi analizi ve MALDI-TOF MS proteomik profil tekniğinin bu türlerin ayrımında kullanılabilecek en etkili yaklaşımlar olduğu vurgulanmıştır (33). Ayrıca RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de morfolojik ve biyokimyasal testlere dayalı rutin tanımlama sırasında sıklıkla ortaya çıkan hatalı sonuçların konfirmasyonunda başvurulabilecek bir moleküler tanı yöntemidir.

2.1.3. *C. norvegensis*'in epidemiyolojisi

Avrupa'da 13 farklı ülkenin katılımıyla gerçekleşen SENTRY çalışmasında, *Candida* türleriyle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının büyük bir kısmından *Candida albicans*'ın (%53) sorumlu olduğu; bunu sırasıyla *C. parapsilosis* (%21), *C. glabrata* (%12), *C. tropicalis* (%6), *C. famata* (%2), *C. krusei* (%1) ve *C. inconspicua* (%1) gibi *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin izlediği saptanmıştır. *C. parapsilosis*'in daha önceden Kanada ve Güney Amerika'da yapılan çalışmalarda gözlemlendiği gibi Avrupa'da da fungal kan dolaşımı enfeksiyonlarından en sık sorumlu *Candida albicans* dışı *Candida* türü olduğu belirlenmiştir (37).

Klinik örneklerden daha nadir izole edilen ve flukonazole karşı azalmış duyarlılık gösteren *C. rugosa*, *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* gibi türlerin izolasyon sıklığında ise 1997-2007 yılları arasında 5-10 kat artış görüldüğü bildirilmiştir (38). İnsanlarda on yediden fazla *Candida* türünün invaziv kandidiyazisten sorumlu etiyolojik ajanlar olduğu bildirilmiştir. Bu enfeksiyonların büyük bir kısmına *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türleri neden olmakla beraber *Candida* türleriyle ilişkili enfeksiyonların optimal tedavisinde büyük bir önem arz eden tür düzeyinde tanımlama gereksinimi, her geçen gün bu listeye yeni türlerin eklenmesine neden olmaktadır (39). *Candida* türlerinin coğrafik bölgelere göre dağılımının araştırıldığı ARTEMIS DISK çalışmasında klinik örneklerden elde edilen *Candida* türlerinin izolasyon sıklığında yıllara göre değişimler meydana gelmiştir. Çalışmanın 1997-2000 yılları arasında tüm *Candida* türlerinin %70,9'unu *C. albicans* oluştururken; sonraki zamanlarda izolasyon oranlarında düşüş görülmüştür (2001-2004, %62,9; 2005-2007, %65,0). Bununla birlikte, (1997-2000) ile (2005-2007) arasındaki periyotlarda saptanan çeşitli *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin izolasyon sıklığı karşılaştırıldığında; *C. glabrata* (%10,2-%11,7), *C. tropicalis* (%5,4-%8,0) ve *C. parapsilosis* (%4,8-%5,6)'in prevalansında artış saptandığı; *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* ve *C. famata* türlerinin prevalansında önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Klinik örneklerden nadiren izole edilen, azollere ve

diğer antifungal ajanlara karşı azalmış duyarlılıklarından dolayı önem arz eden ve invaziv kandidiyazise neden olan etkenler arasında görülme sıklığında son zamanlarda belirgin bir artış saptanan *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* ve *C. norvegensis* türlerinden, Latin Amerika'da *C. guilliermondii* ve *C. rugosa* türleri; Avrupa'da ise *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türleri daha belirgin olarak görülmektedir (40, 41).

C. norvegensis ve *C. inconspicua* türleri klinik örneklerden nadiren izole fırsatçı fungal patojenlerdir. Majoros ve ark. (42), Macaristan'da Debrecen Üniversitesi Bakteriyolojik Tanı Laboratuvarı'nda tanımlanan maya türlerinin beş yıllık süre boyunca görülme sıklığındaki değişimleri araştırdığı çalışmada, tüm maya türlerinin izolasyon sıklığında sadece üç katlık bir artış saptanırken, *C. norvegensis* ve *C. inconspicua* türlerinin izolasyon sıklığında (3-4 olgu/yıl → 29 olgu/yıl) ise belirgin bir artış saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise, bu türlerin klinik örneklerden ve kandidemili olgulardan izolasyon sıklığı sırasıyla (%0–0.8) ve (%0–1.5) olarak bulunmuştur (38). *Pichia norvegensis*'in eşeysiz üreyen formu (anamorph) olan *C. norvegensis*'in doğal yaşam alanı iyi bir şekilde karakterize edilmemiştir. İnsan patojeni olarak yeterince fark edilmeyen *C. norvegensis*'in klinik örneklerden izolasyon sıklığındaki azlık, mikroorganizmanın düşük virulansı veya doğada nadir olarak görülmesiyle ilişkilendirilmektedir (43). Bu zamana kadar az sayıda olguda ve balgam, dışkı, idrar ve vajinal sekresyon gibi farklı klinik örnek türlerinde tespit edildiği bildirilmiştir (3, 44). Danimarka'da 25 yıllık süre boyunca çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Statens Serum Institut araştırma enstitüsü Mikoloji Referans Laboratuvarı'ndaki kültür koleksiyonunda arşivlenen toplam 35 klinik *C. norvegensis* izolatının çoğunlukla solunum yolu, orofarenks ve vajenden alınan örneklerde saptandığı belirlenmiştir (43). Bununla birlikte literatürde; son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle 2,5 yıl boyunca sürekli ayaktan periton diyaliz tedavisi uygulanan, iki kez renal transplantasyon yapılan ve sonrasında immünsüpresif tedavi uygulanan 35 yaşındaki Danimarkalı erkek hastada intraabdominal mayi, trakeal aspirat ve ardışık kan kültürü örneklerinden izole edilen ve ölümcül seyreden *Candida norvegensis* ile ilişkili invaziv kandidoz olgusu da bildirilmiştir (4).

Literatürde 1990 yılından günümüze kadar *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türlerine bağlı gelişen kandidemi olgularının incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (4, 6, 45). Bu çalışmalarda kandidemi epizodunun saptandığı hastaların tamamının altta yatan hastalıklar veya immünsüpresif tedaviler nedeniyle bağışıklığı baskılanmış

bireyler olduğu belirlenmiş. Olgular bir arada değerlendirildiğinde, *C. inconspicua*'nın izolasyon sıklığının *C. norvegensis*'in iki katı olduğu tespit edilmiş, kandidemi epizodu öncesinde hastalarda solunum sistemi ve gastrointestinal sistem gibi vücut bölümleri başta olmak üzere *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türleriyle bir veya daha fazla vücut bölümünde kolonizasyon görüldüğü, bu izolatlardan bazılarının aynı zamanda intravenöz kataterler üzerinde de kolonize olduğu saptanmış ve her iki türün benzer vücut bölümlerini tercih ettiği gözlenmiştir.

2.1.4. *C. norvegensis*'in patogenezi

Candida türleri ökaryotik yapıli fırsatçı patojenlerdir. Çoğunlukla çevresel örnekler ve ilkel yapıli hayvanlardan izole edilmekle birlikte, immünsüpresif tedavi uygulamaları ve immünsüpresif hasta popülasyonlarındaki artışa paralel *Candida* türlerinin klinik örneklerden izolasyon sıklığında da önemli bir artış olmuştur. Sağlıklı kişilerde mukokütanöz yüzeylerde *Candida* türleriyle kolonizasyon nadir olup, endojen floradaki değişiklikler sonucunda normalde kommensal olarak bulunan bu mikroorganizmalar cilt ve mukozal yüzeylerde çoğalmaktadır (46). Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, çeşitli vücut bölgelerine medikal enstrümantasyon uygulamaları ve hospitalizasyon, *Candida* türleriyle kolonizasyon ihtimalini artırarak invaziv enfeksiyon gelişimine sebep olmaktadır. Brillowska-Dąbrowska ve arkadaşları, kandidemi saptanan hastaların muhtemel enfeksiyon kaynağına yönelik kolonizasyon bölgelerinden elde edilen izolatlar ile invaziv izolatlar arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ve MLST (Multi Locus Sequence Typing) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen moleküler tiplendirme sonucunda kandidiyazisten sorumlu etkenlerin esas olarak endojen izolatlar olduğunu belirlemişlerdir (47).

C. norvegensis ile *C. inconspicua* türlerinin doğal yaşam alanlarına ilişkin bilgiler net bir şekilde ortaya konulmadığı için bu türlerle kontaminasyonun kaynağı bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada, *C. inconspicua*'ya bağlı kandidemi gelişen iki hematolojik maligniteli hastadaki enfeksiyon kaynağının santral venöz katater ile ilişkili olmadığı; kemoterapi nedeniyle oluşan mukozit ve GİS'ten translokasyona bağlı olduğu öne sürülmüştür (48). Yapılan bir literatür derlemesinde; nötropeni, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ve intravasküler kateter yerleştirilmesinin bu türlere bağlı gelişen enfeksiyonlar açısından predispozan faktörler olduğu bildirilmektedir. Fakat; bu etkenlere bağlı gelişen enfeksiyonlar için spesifik bir klinik özellik fark edilmemiştir (11). Bununla birlikte, *C. norvegensis*'in Tanzanya'da yetişen ve yerel

dilde “*togwa*” (Doğu Afrika'da mısır unu ve filizlenmiş parmak darısından üretilen, süt veya buzla beraber tüketilen geleneksel alkolsüz içecek) olarak adlandırılan bir ürün ile nekrotik kaktüs köklerinden izole edildiği; *C. inconspicua*'nın ineklerdeki mastit enfeksiyonu ile günlük süt ürünlerinden izole edildiği bildirilmiştir (8-10). Bu bulgular potansiyel enfeksiyon kaynağının kontamine süt ve süt ürünleri olabileceğini, bu nedenle pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin fungal enfeksiyonlar açısından risk altındaki hastalar tarafından tüketilmemesi düşüncesini desteklemektedir (11).

2.1.5. *Candida norvegensis*'in potansiyel Virülans faktörleri

2.1.5.1. Adezyon

Patojen mikroorganizmaların konak dokuya tutunması enfeksiyonun birincil basamağı olup konak üzerindeki kalıcı kolonizasyon açısından çok önemlidir (49). Bu antite, mikroorganizmaların konak dokusuna bağlanmasında rol oynayan adezinler adı verilen hücre yüzey molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Tanımlanmış adezin moleküllerinin çoğu, spesifik peptit-peptit, peptit-şeker ve peptit-ligand etkileşimlerine aracılık eden nispeten kompleks yapıları bir N-terminal bölgesine sahip proteinlerdir. Hücre duvarındaki GPI (Glycosylphosphatidylinositol) çapa (anchor) molekülleriyle bağlantılı olan adezin molekülleri, granüllü endoplazmik retikulum membranında N-terminal bölgede yer alan sinyal peptit dizisi ve GPI çapasıyla bağlanmayı sağlayan C-terminal peptit dizisinin protein yapısına katılması sonrasında mantar hücre yüzeyinde konumlanmaktadır. Adezinlerin yapısında ayrıca N-terminal bölgesinin aşağı kısımlarında yer alan ve kompleks yapıya sahip olmayan değişken sayıda serin/treonin tandem tekrarlarından oluşan bir bölge bulunmaktadır. Bu bölgede daha uzun tekrar dizileri bulunduran türlerin güçlü bir adezyon göstereceği, daha kısa tekrar dizileri bulunduran türlerin ise muhtemelen tutunmadan esas sorumlu N-terminal bölgesinin uzun tekrar dizileri bulunduran türlere nazaran hücre duvarında daha iç kısımlarda bulunmasından dolayı daha zayıf bir adezyon kabiliyetiyle sonuçlanacağı düşünülmektedir (50).

Candida türleri, diğer birçok patojen mantar türünde olduğu gibi deri, endotel hücreleri, platelet-fibrin tıkaçları, fibronektin, mukozal epitel hücreleri gibi çeşitli canlı yüzeylerle birlikte takma diş protezleri, üriner kataterler, intravasküler kataterler ve yapay kalp kapakçıkları gibi cansız yüzeylere de tutunmaktadır. *Candida* türleriyle konak dokusunun etkileşiminde ilk önce non-spesifik bağlanma (Hidrofobik etkileşim, Van der Waals bağları vb.) süreci meydana gelmekte; bu süreci protein, fibrinojen ve fibronektin gibi konağa ait yüzey belirteçlerini tanıyan mantar hücre duvarındaki

spesifik adezyon molekülleriyle etkileşim izlemektedir (51). Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), ALS (Agglutinin-like sequence; ALS1p-ALS9p), HWP1 (Hyphal Wall Protein1), INT1 (Integrin1), EPA (Epitelyal adezin) ve GPI ile bağlantılı hücre duvar proteinleri vb. çeşitli adezyon molekülleri laminin, fibronektin, ekstraselüler matriks, memeli transglutaminazı ve epitel hücreleri gibi konağa ait farklı ligandlara bağlanmada rol oynamaktadır.

Adezyondan sorumlu diğer bir gen INT1 olup, integrin benzeri protein kodlamaktadır. Bu gende meydana gelen delesyon, epitel hücreye adezyon kabiliyetinde %40 azalmaya yol açarak virulansta azalmaya neden olmakla birlikte hifa oluşumunda da defekte neden olmuştur (52).

Bakteriyel adezin molekülleriyle karşılaştırıldığında mantar türlerindeki adezin moleküllerine ilişkin sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Adezyon moleküllerinin tanımlaması proteom analizine dayalı birkaç çalışma dışında, çoğunlukla bu yapıların bireysel olarak karakterizasyonuna dayanmaktadır. Son zamanlarda adezin moleküllerinin karakteristik özelliklerine dayanan biyoinformatik algoritmalar kullanılarak birçok temsili yeni fungal adezin molekülü belirlenmiştir. Bunların bazıları in-vitro çalışmalarla doğrulanmasına karşın, çoğunun henüz deneysel çalışmalarla tanımlanması devam etmektedir.

2.1.5.2. Ekstraselüler hidrolitik enzim üretimi

Candida türleri, konakçı dokuların invazyonuna yardımcı olan yapısal hidrolitik enzimlere sahiptir. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının artan insidansı, bu enfeksiyonların önlenmesi ve kontrolünde yeni stratejiler oluşturmak ve hedefe yönelik farklı terapötik yaklaşımlar geliştirmek için bu türlerin sahip olduğu çeşitli Virülans faktörlerinin ilgi odağı haline gelmesine sebep olmuştur (53, 54).

Fosfolipaz aktivitesi: Ekstraselüler fosfolipazların salgılanması, konağın mukozal epitel hücrelerinin invazyonuna aracılık eden önemli bir özellik olarak kabul edilmektedir. Ekstraselüler fosfolipaz enzimi, adezyon ve doku penetrasyonunu kolaylaştırmak için konakçı hücre zarlarındaki fosfolipidleri parçalayarak doğrudan konakçı hücre hasarına neden olmaktadır.

Kandidiyasis ile ilgili deneysel hayvan modelleri, dört çeşit fosfolipaz enzimi (Fosfolipaz A, B, C ve D) bulunmasına rağmen, Virülans için sadece fosfolipaz B enzim tipinin gerekli olduğunu; bu enzimi kodlayan gen bölgesinde delesyon bulunan suşların in vitro koşullarda daha az fosfolipaz enzimi salgılayacağı ve bu nedenle daha az virulan özellik göstereceğini bildirmiştir. *Candida albicans*'ın enfeksiyon

patogenezine katkıda bulunan çeşitli Virölans faktörlerinin varlığı iyi bir biçimde karakterize edilmesine rağmen, *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinde bu konuya ilişkin sınırlı sayıda bilgi mevcuttur (35, 55).

Literatürde Avrupa ve Japonya'dan elde edilen 22 adet *C. inconspicua* ve 16 adet *C. norvegensis* suşunda ekstraselüler hidrolitik enzimlerden fosfolipaz B'nin patogenezdeki önemi araştırılmış. Suşların hiçbirinde de fosfolipaz B enzim aktivitesi gözlenmemiştir (35). Gıda ürünleri ve içeceklerde bulunan çeşitli *Candida* türlerinin sindirim yoluyla vücuda alındıktan sonra kan dolaşımına geçerek sistemik fungal enfeksiyonlara neden olup olmadığı hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Bu konuya ilişkin yapılan bir araştırmada, palm yağı şarabı ile geleneksel bir alkollü içecek "tchapalo" gibi ürünlerden izole edilen potansiyel patojen maya türlerindeki klinik önemi olduğu düşünülen Virölans faktörlerinin varlığı incelenmiş. Elde edilen 37 izolatın yedisinin *C. inconspicua* olduğu belirlenmiş ve hiçbirinde fosfolipaz enzim aktivitesi bulunmadığı bildirilmiştir (56).

Salgisal aspartil proteinaz aktivitesi: Bu zamana dek *Candida* türlerinde tanımlanan ekstraselüler endopeptidazların neredeyse tamamı aspartil proteinaz sınıfında yer almaktadır. Aspartil proteinaz sınıfının mantarlarda bulunan üyeleri penisillopepsin, rhizopuspepsin, aspergillopepsin I, kandidapepsin ve yapsin proteinaz aileleridir. Kandidal aspartil proteinazlar iki farklı ailede gruplandırılabilir. En yaygın olanı "Salgisal Aspartil Proteinazlar" olarak bilinen kandidapepsinlerdir. SAP enzimi, düşük pH'da ve tek nitrojen kaynağı olarak protein varlığında salgılanmaktadır (57-59).

Candida türlerinin SAP enzimleri aracılığıyla konak dokulara penetrasyon yeteneğini artırarak bağ dokusu bariyerlerini geçtiği; immünoglobulinler, kompleman ve sitokinler gibi konak savunmasında önemli role sahip bir dizi proteini parçalayarak konak immün sisteminden kaçtığı düşünülmektedir. *C. norvegensis* ve *C. inconspicua* türlerinde SAP enzimi varlığı gösterilememiştir (35, 56).

Esteraz aktivitesi:

Esterazlar, ester gruplarının hidrolizinden sorumlu enzimlerdir. Bununla birlikte, literatürde bildirilen esteraz enzimlerinin önemi hakkında farklı bilgiler yer almaktadır. Patojen mayaların virulansında önemli rol oynayan ve lipolitik aktivite sergileyen esteraz enziminin varlığına ilişkin yapılan bir çalışmada, test edilen bütün *C. inconspicua* izolatlarının esteraz aktivitesine sahip olduğu bildirilirken; deneysel

bir hayvan modeli çalışmasında ise *C. inconspicua*'da esteraz aktivitesinin varlığı gösterilememiştir (56, 60).

Lipaz aktivitesi: Lipazlar, fungal hücre membranındaki triaçilgliserollerin hidrolizinde görev almaktadır. Bu enzimlerin; besin alımı, konakçı hücrelere adezyon ve rekabetçi mikroflorayı elimine ederek inflamatuvar süreç üzerinde rol oynadığı belirtilmiştir (61). *C. albicans*'ta lipazları kodlayan 10 gen tanımlanmıştır. Murin sistemik enfeksiyon modeli kullanılarak yapılan bir hayvan çalışmasında, *C. albicans* CaLIP8 mutant suşlarının virülansında önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir. Lipaz enzim inhibitörünün, yeniden organize edilen (re-modelling) bir insan dokusunun *C. parapsilosis* ile enfeksiyonu sırasında doku hasarını önemli ölçüde azalttığı ve CpLIP1/CpLIP2 mutant suşlarının daha ince ve daha basit yapılı biyofilmler oluşturduğu gösterilmiştir (62). Fildişi Sahilleri'nde tüketilen popüler alkollü içeceklerden izole edilen çeşitli *Candida* türlerinin dağılımıyla bu türlerle ilgili patojenitede rol oynayan mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmada, elde edilen üç *Candida* türü (*C. tropicalis*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*) içerisindeki izolatların hiçbirinde lipaz enzim aktivitesinin varlığına rastlanmamıştır.

Hemolizin aktivitesi: Patojen mikroorganizmalar, demir gereksinimlerinin karşılanmasında konakçıda bulunan hemin veya hemoglobin moleküllerini kullanmaktadır. Hemolizinler, *Candida* türleri tarafından hemoglobini parçalamak ve konakçı hücrelerden elementer demirin geri kazanılmasında rol oynamaktadır. Bundan dolayı, hemolizinler patojenin konakta hayatta kalmasını sağlayan anahtar virülans faktörleri olarak kabul edilmektedir.

Candida albicans'ın hemoglobin molekülündeki elementel demiri kullanmak amacıyla eritrositlerin parçalanmasına neden olan hemolitik bir faktör ürettiği bilinmektedir. Bu hemolitik faktörün üretimi, ortamda bulunan glikoz miktarına bağlı olarak düzenlenmektedir. Hemolizinlerin *Candida* türlerinde patojeniteye katkıda bulunan muhtemel virülans faktörleri olduğu bilinmesine rağmen, bu aktivitenin genetik olarak düzenlenmesine ilişkin bilgiler henüz tam olarak anlaşılamamıştır (63). *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), fungal enfeksiyonların patojenezine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda Virülans mekanizmasının moleküler temelinin incelemek amacıyla son zamanlarda popüler olarak kullanılan ve kelebeklere benzeyen fakat antenleri olmayan bir gece böceği türüdür. Farklı türlerdeki (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. inconspicua* ve *C. palmioleophila*) 25 adet *Candida* izolatu ile deneysel olarak enfekte edilen *G. mellonella* larvalarıyla yapılan

bir araştırmada, altı gün sonunda sağ kalan larva yüzdelere göre izolatların virülans düzeyleri tespit edilmiş. Yüksek düzey virülans gösteren (10 adet *C. albicans* ve 1 adet *C. glabrata*) izolatların dokuzunda, orta düzey virülans gösteren (5 adet *C. albicans*, 2 adet *C. palmioleophila*, birer adet *C. parapsilosis* ve *C. inconspicua*) izolatların ise beşinde yüksek hemolitik aktivite varlığı saptanmıştır (60).

2.1.5.3. Biyofilm formasyonu

Son yıllarda modern teknoloji sayesinde daha fazla sayıda ve değişik nitelikteki kateter, kalp pili, yapay kalp kapakçığı ve eklem protezleri gibi tıbbi gereçlerin kullanımında artış gözlenmektedir. Bu artış, özellikle vücuda implante edilebilen gereçler başta olmak üzere tıbbi gereçlerle ilgili enfeksiyonların görülmesine yol açmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonların en azından yarısının tıbbi gereçlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (64). Bu gereçler, bakteriyel enfeksiyonlar yanında fungal enfeksiyonlara da aracılık etmekte ve hayatı tehdit eden ciddi sistemik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisi oldukça zor ve maliyetlidir.

Tıbbi gereçlerin vücuda implantasyonundan sonra meydana gelen ilk olay; tükürük, mukus, serum, kan gibi farklı vücut sıvıları ve sekresyonlarında bulunan fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin gibi çeşitli makromoleküllerin gereç yüzeyinde birikmesi sonucu hazırlayıcı film tabakası oluşumudur. Mikroorganizmalar genellikle gereç yüzeyine bu film tabakası aracılığıyla tutunmaktadır. İlk adezyon geri dönüşümlü bir süreç olup, bunu mikroorganizmalar tarafından ekstraselüler ortama salınan ve makromoleküllerden oluşan film tabakasının etrafını saran ekzopolimerik matriks üretimi izlemektedir. Başlangıçta gereç yüzeyine gevşek tarzda tutunan mikroorganizmalar, glikokaliks (slime) olarak adlandırılan bu tabaka sayesinde daha güçlü tutunma kabiliyeti elde etmektedir.

Bazı *Candida* türlerinin slime benzeri yapılar oluşturduğu bildirilmektedir. Güdücüoğlu ve ark. (65) yenidoğan bebekler ve yetişkin yaş grubundaki kişilerin ağız florasındaki *Candida* türleriyle ilgili yaptıkları bir çalışmada, her bir gruba ait örnek türlerinden elde edilen 18 izolat biyofilm üretimi açısından incelendiğinde, izolatların sırasıyla %22 (4/18) ve %11 (2/18) oranında potent biyofilm oluşumu gösterdiği belirlenmiştir.

Yabancı cisim ile ilişkili enfeksiyonların patogeneğinde önemli bir role sahip olan biyofilm formasyonu, çeşitli *Candida* türlerindeki Virülans faktörlerinden biri olup; bu tabaka içerisinde çoğalan mikroorganizma toplulukları kalın bir film tabakası oluşturmakta; bu durum hem kalıcı bir enfeksiyon odağının varlığına hem de fungal

patojenin konakçı savunma mekanizmaları ile antifungal ajanların etkisinden kurtulmasına yardımcı olarak nozokomiyal fungal enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (66). *Candida* türleri nozokomiyal pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmektedir. Bu enfeksiyonlar çoğunlukla intravasküler kateter, üriner kateter ve endotrakeal tüp gibi biyofilm formasyonuna yatkınlığın olduğu implante cihazlara bağlı olarak görülmektedir. Cerrahi işlemler sonucu vücut içine tamamen implante edilen yapay kalp kapakçığı, kalp pili ve eklem protezi (kalça, diz vb.) gibi cihazlarla ilişkili *Candida* enfeksiyonları da genellikle implantasyon işlemi sırasında görülen kontaminasyon nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tıbbi gereçler ile ilişkili maya enfeksiyonları çoğunlukla *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ve *Candida parapsilosis* gibi biyofilm oluşturabilen patojen *Candida* türlerine bağlı olarak görülmektedir. *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinde *C. albicans* ile karşılaştırıldığında daha az biyofilm formasyonu gözlenmektedir. *Candida* türlerindeki biyofilm formasyonu ve kompozisyonu; sıklıkla ortam şartlarına (canlı/cansız yüzey yapısı, ortamdaki glukoz, galaktoz vb. miktarı gibi), izole edilen türlere ve suşların tomurcuklanan blastokonidi veya filamentöz morfolojide olup olmadığına göre değişkenlik göstermektedir (67). *Candida* türlerinin kateter veya protez materyalleri gibi cansız yüzeylere adezyonu sağlandıktan sonra besiyeri ortamında inkübasyona bırakıldığı deneysel modellerde; PVC (polivinil klorür) disk materyali üzerinde *C. albicans* tarafından oluşturulan biyofilm tabakası içerisindeki hücrelerin planktonik (serbest halde) hücrelerle karşılaştırıldığında flukonazole 100 kat ve üzeri, amfoterisin B'ye 20-30 kat dirençli olduğu saptanmıştır (68). Başka çalışmalarda selüloz, polistren, silikon elastomer, poliüretan ve akrilik yüzeylerde de biyofilm tabakası içerisindeki *Candida* türlerinin antifungallere direnç gösterdiği bildirilmiştir (69). Ortamdaki glukoz miktarındaki artışın da biyofilm oluşumunu hızlandırdığı, özellikle total parenteral nütrisyon (TPN) alan hastalarda *C. parapsilosis*'e bağlı gelişen kateter enfeksiyonlarında artışa yol açtığı belirtilmiştir (70). Aynı tür içerisindeki suşlar arasında biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmalardan elde edilen uyumsuz sonuçlar, enfeksiyon patogenezi ile ilişkili olabilecek geniş çapta fenotipik değişkenliğin varlığını ortaya koymaktadır (67). Oral kavite ve vajen gibi vücut bölgeleri ile çevresel örneklerden izole edilen 115 *C. albicans* suşunun biyofilm formasyonu açısından incelendiği bir araştırmada, klonlar ve aynı klon içerisindeki soylar arasında belirgin farklılık tespit edilmiştir (71). Biyofilm oluşumunda rol oynayan faktörlerden biri de *Candida* türlerinde görülen

morfogenez süreci olup, yapılan bir çalışmada morfogeneze sinyal yolağında yer alan Efg1p ve Cph1p transkripsiyon faktörlerini bulundurmadığı için hif formuna geçiş defekti olan mutant *C. albicans* suşlarının poliüretan kateterlerde daha zayıf kolonize oldukları gösterilmiştir (72).

Candida türlerindeki biyofilm formasyonu varlığının antifungal ajanlara karşı direnç gelişimindeki muhtemel mekanizmaları; biyofilm içerisindeki mikroorganizmalara ilaç penetrasyonunu engelleyebileceği veya ilacı matriks dışına atabileceği düşüncesiyle ekstrasellüler polimerik matriks miktarı, hücre zarı yapısında bazı fenotipik değişikliklere yol açmasıyla ilişkili yavaş üreme hızı ve sınırlı besin kaynağı, fungal hücre membranında lokalize “Major facilitator transporter” olarak adlandırılan MDR1 ve “ATP-binding cassette” olarak adlandırılan CDR1 ve CDR2 ilaç dışı atım pompa genlerinin artmış ekspresyonu ve biyofilm yapısındaki ergosterol miktarı ile ilişkilendirilmektedir (64, 73).

Candida türlerindeki biyofilm formasyonunun antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıkta azalmaya neden olduğu bilinmesine rağmen, biyofilm oluşumunun mortalite üzerindeki etkisine yönelik yapılan çalışmaların sayısı sınırlı olup; elde edilen sonuçlar arasında bazı tutarsızlıkların bulunduğu belirtilmiştir. Bu duruma, standardize edilen bir test yöntemi olmaması sonucu biyofilm aktivitesine sahip suşlar arasındaki aktivite düzeyine yönelik bir eşik değer ortaya konulamamasının yol açtığı düşünülmektedir. Bu konuya ilişkin *Candida inconspicua* suşlarında gerçekleştirilen çalışmalarda, elde edilen suşlardan bazılarında düşük ve orta düzeyde biyofilm oluşumu gözlenirken; bazılarında da yüksek düzeyde biyofilm oluşumu gözlenmiştir (56, 60, 74).

2.1.5.4. Fenotipik değişim (Phenotypic switching)

Candida türlerinin konaktaki değişen çevresel koşullara adaptasyonunu sağlayan bir mekanizma olan fenotipik değişim, hücre yüzeyi özellikleri, koloni görünümü, metabolik, biyokimyasal ve moleküler özellikler gibi çeşitli yapısal ve fonksiyonel parametreleri etkileyerek mikroorganizmaya bir dizi Virülans özellikler kazandırmaktadır.

Fenotipik değişimin yaşam döngüsü ve patogeneze rolünü, bu süreci kontrol eden genleri ve düzenleyici mekanizmaları incelemek için *C. albicans* model olarak seçilmiştir. *Candida albicans*'taki fenotipik değişim kabiliyeti, ilk olarak 1985 yılında, çevresel stres kaynaklarına yanıt olarak belirli sayıda koloni morfolojisi arasında kendiliğinden ve geri dönüşümlü olan değişimlerin varlığı olarak tanımlanmıştır.

WT (Wild Type-sokak tipi) *C. albicans* suşları arasında birden fazla türde fenotipik değişim modelinin olduğu fark edildikten sonra, yeni fenotipik değişim modellerinin tarif edilmesi için Soll ve arkadaşları yüzden fazla klinik izolat üzerinde büyük bir araştırma yapmışlardır. Bununla birlikte, eşeyli üremedeki rolü nedeniyle beyaz-opak değişimi (WO switching) en fazla ilgi gören ve incelenen fenotipik değişim şekli olmuştur (75). WO değişim sürecinde görev alan gen ekspresyonları araştırıldığı zaman, opak hücrelerde OPA1 (SAP1) ve SAP3; beyaz hücrelerde ise SAP3, WH 11 ve EFG 1 gen ürünlerinde artış saptanmıştır. SAP 1 ve 3 enzimleri üreten opak formdaki hücreler daha az virulan olup, deride kolonize olmaya eğilimlidir. Beyaz forma sahip hücreler ise ürettikleri SAP2 enzimi aracılığıyla hayvan çalışmalarında sistemik infeksiyonlara yol açmaktadır (76).

İn-vivo koşullarda bu mekanizmanın, konak fizyolojisindeki değişimlere hızlı adaptasyon sağlayarak immun sistemin saldırılarından korunma ve antifungal tedaviye karşı erken yanıtla ilişkili olduğu düşünülmektedir. HIV ile enfekte hastaların oral kavitelerindeki lezyonlardan elde edilen izolatlarla gerçekleştirilen bir çalışmada, yüksek frekansta gözlenen fenotipik değişim sonucu izolatların antifungal tedavi öncesinde de 5-florositozin, vorikonazol, flukonazol ve amfoterisin B'ye karşı in vitro direnç geliştirdikleri saptanmıştır. Özellikle de benekli (stipple) fenotipe sahip izolatların, ERG 11 geninin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak flukonazole direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Bu durumun fenotipik değişim sürecinde antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimiyle ilgili gen bölgelerinin de transkripsiyonel regülasyona uğradığını göstermektedir (77).

2.1.5.5. Maya-hif dimorfizmi (Morfogenez)

Genel tanımıyla dimorfizm, çevresel şartlara bağlı olarak mantarların tek hücreli formdan filamentöz forma geçebilmeleridir. Çoğu patojen mantar türünde gözlemlendiği gibi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinde de tek hücreli maya formundan hif ve/veya psödohif olarak adlandırılan filamentöz formlara geçişin görüldüğü bilinmektedir. Bu morfolojik değişim çeşitli koşullara bağlı olarak sırası ile maya (blastokonidi), germ tüp, psödohif ve gerçek hif oluşumunu kapsamaktadır. Bu geçiş; N-asetil glukozamin, serum, bazı aminoasitler ve biyotin varlığı ile nötral pH, 37-40°C, %5,5 CO₂ gibi çevresel koşullarda kolaylaşmaktadır. Hif formundan maya formuna geçiş ise daha düşük sıcaklıklarda, asidik pH'da, serum yokluğunda ve yüksek konsantrasyonda glukoz varlığında gerçekleşmektedir (78).

Hem maya hem de hif formlarına enfeksiyon bölgelerinde rastlanması, her iki durumun da patogeneizde önemli rol oynadığını göstermektedir. Germ tüp olarak adlandırılan özel hif formunun, maya formuna göre adezyon kabiliyetinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Makrofajlar tarafından fagosit edilen mikroorganizmalar, maya-hif dimorfizmi oluşturarak fagolizozom kompleksinde meydana gelen fungisidal oksijen radikallerinin oluşumunu sağlayan proteinleri etkisiz hale getirerek makrofajları lizis etmektedir (79).

C. norvegensis'in RAT ortamında blastokonidi ve psödohif oluşturduğu, *C. inconspicua*'nın ise genellikle blastokonidler oluşturup nadiren ilkel bir psödohif oluşturduğu bildirilmiş olup; her iki türde de gerçek hif oluşumu gözlenmemektedir (80).

Mayadan hif formuna geçişte pek çok genin düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar arasında PHR1, ECE1, HYR1, RBF1, CHS2, CHS3 genleri morfogenez sürecinde farklı zamanlarda eksprese edilmektedir. TUP1 geni, glukoz varlığında veya hif gelişimini indükleyen faktörlerin olmadığı koşullarda hif oluşumunu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür.

2.2. *Candida norvegensis*'te Antifungal İlaçlara Direnç Mekanizmaları

Antifungal ilaç direnci, mikrobiyolojik veya klinik direnç şeklinde kategorize edilebilmektedir. Mikrobiyolojik direnç, mikroorganizmalarda çeşitli antifungal ajanlara karşı in vitro duyarlılık testleriyle saptanan direnç olarak tanımlanmakta; intrensek veya kazanılmış mikrobiyolojik direnç olarak sınıflandırılmaktadır.

İntrensek direnç, ilaçlara önceden maruz kalmayan belirli maya türleri arasında doğal olarak bulunan direnç çeşididir. Kazanılmış direnç ise, önceden ilaca duyarlı olan maya türlerinde ilaca maruziyet sonrasında gelişen ve sıklıkla değişen gen ekspresyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan bir direnç çeşididir. Buna karşılık klinik direnç, uygun tedaviye rağmen fungal enfeksiyon varlığının devam etmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Klinik direncin gelişiminde mikrobiyolojik direncin yanında; immunsupresyon, altta yatan hastalık, düşük ilaç biyoyararlanımı ve artan ilaç metabolizması gibi başka faktörlerin de katkısı bulunmaktadır (81).

Küresel ölçekli ve çok sayıda klinik izolat üzerinde gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalar, *Candida* türlerinin yaygın olarak kullanılan çeşitli antifungal ilaçlara karşı değişen düzeylerde duyarlılık paternlerine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, türler arasındaki ve tür içindeki izolatların farklı antifungal ilaç sınıflarına

karşı direnç sıklığını, direncin takibini ve türlerin intrinsek direnç özelliklerini yansıtmaktadır (82).

Bununla birlikte, aralarında nadir rastlanan türlerin de bulunduğu artan sayıda *Candida* türünde bir veya birkaç antifungale karşı daha düşük duyarlılık varlığı bildirilmektedir. Azol türevi antifungallere karşı intrinsek ve/veya kazanılmış direncin görüldüğü *C. krusei* ve *C. glabrata*'ya ek olarak *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. palmiophila*, *C. rugosa* ve *C. valida* gibi klinik önemi yeni ortaya çıkan nadir *Candida* türlerinde de çeşitli azol türevlerine karşı direnç görüldüğü; ekinokandinlere karşı daha düşük duyarlılık gösteren türler arasında *C. parapsilosis* ile birlikte *C. parapsilosis* kompleks içerisindeki diğer türler (*C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*), *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* ve *C. fermentati*'nin bulunduğu; polyen makrolid yapılı antifungallere karşı daha düşük duyarlılık gösteren *Candida* türlerinin *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* ve *C. krusei* olduğu belirtilmektedir (45, 81, 83)).

Antifungallerin fungisidal veya fungistatik etkilerine karşı, mantarlar üç temel mekanizma ile yanıt vermektedir:

- 1-Hücre içinde ilaç birikimini azaltarak, artmış eflüks etkisi,
 - a- ATP binding cassette (ABC) taşıyıcılar: CDRI, CDR2,
 - b- Major facilitator superfamiliya (MFS) taşıyıcı: MDR,
- 2- Hedef enzimde değişiklik yaparak (enzimin aşırı yapılması ile ilacın hedefine afinitesini azaltarak),
- 3- Metabolizmada değişiklik yaparak (ergosterol biyosentez yolunun değişimi, plazma membran sterol ve/veya fosfolipid bileşiminde değişikliğe yol açarak, geçirgenliği azaltarak, biofilm oluşturarak vb.)

Azol direnci: Azol türevi antifungaller, mantar hücre membranındaki önemli yapısal bileşenlerden biri olan ergosterolün biyosentezinde görev alan lanosterol 14- α -sterol demetilaz enzimini inhibe eder. Bu durum toksik bir ürün olan 14- α -metil-3,6-diol molekülünün hücre içerisinde birikmesine, bu da hücre zarı yapısı ve fonksiyonunda değişikliğe yol açarak mantar büyümesinde inhibisyona sebep olmaktadır.

Azol türevlerinin özellikle de flukonazolün, tedavi ve profilaksi amacıyla gelişigüzel ve sık kullanımı bazı mantar türlerinde direnç gelişimine sebep olmaktadır. Maya türlerindeki azol türevi antifungallere karşı direnç konusunda yapılan çalışmalar sonucu, azol direncine yol açan faktörlerin dört temel kategoride toplandığı belirlenmiştir.

Bunlar:

a-Hedef bölgede azol türevlerine karşı afinitenin azalması

(ERG11 geninde oluşan tek nokta mutasyonu sonucu lanosterol 14- α -sterol demetilaz enziminde görülen yapısal değişim, ERG3 ve ERG6 genlerinde meydana gelen değişikliklerin azol türevlerine düşük afinite gösteren lanosterol üretimine neden olması vb.),

b-Hedef bölgenin kopya sayısında artış görülmesi (ERG11 geninin aşırı ekspresyonu),

c-Azol türevlerine maruziyet sonrası ergosterol biyosentez yolağında değişiklik,

d-Hücre membranında lokalize dışa atım pompalarını kodlayan CDR (*Candida* Drug Resistance) ve MDR (Multiple Drug Resistance) genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki artış sonucu mantar hücresi içerisinde biriken ilaç miktarının azalmasıdır.

Candida türlerinde hücre membranında lokalize dışa atım (efflux) pompaları, ABC (ATP-Binding Cassette) süper ailesinin bir üyesi olan CDR genleri ve MFS (Major Facilitator Super-family) ailesi üyesi MDR genleri tarafından kodlanmaktadır. CDR genleri tarafından kodlanan dışa atım pompalarının indüksiyonu, neredeyse bütün azol türevlerine karşı direnç kazanılmasına; MDR genleri tarafından kodlanan dışa atım pompalarının indüksiyonu ise selektif flukonazol direncine yol açmaktadır (81).

C. ciferrii, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. palmiophila*, *C. rugosa* ve *C. valida* gibi klinik önemi yeni ortaya çıkan nadir *Candida* türlerinde de çeşitli azol türevlerine karşı direnç görüldüğü bildirilmektedir. Klinik örneklerden nadiren izole edilen ve flukonazole karşı azalmış duyarlılık gösteren *C. norvegensis*'teki flukonazol direncine ilişkin mekanizmanın kaynağına yönelik yapılan bir çalışmada, 1960 yılında Norveçli üç astım hastasının balgam örneklerinden izole edilen suşların retrospektif olarak diğer suşlarla filogenetik yakınlığı incelenmiştir. Bu suşların 1940 yılında izole edilen iki suşa genetik açıdan yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu türdeki direncin flukonazol kullanımına sekonder değil, intrinsek (primer) olduğu düşünülmüştür (15).

Ekinokandin direnci: Ekinokandinler, mantar hücre duvarının önemli bir bileşeni olan β (1,3) D-glukanın biyosentezinden sorumlu β (1,3) D-glukan sentaz enzimini non-kompetitif (yarışmalı olmayan) bir şekilde inhibe ederek etki etmektedir. Bu enzimin inhibisyonu, mantar hücre duvarında defekte yol açarak mantar hücresinin ölümüne neden olmaktadır.

Candida türlerinde ekinokandin direncinden sorumlu olan üç temel mekanizma bildirilmiştir:

a- Değişen çevresel koşullara bağlı oluşan stres yanıtı sonucu in vitro paradoksal büyümeye yol açan mantar hücre duvarının kitin içeriğindeki artış,

b- $\beta(1,3)$ D-glukan sentazın FKS alt birimlerini kodlayan genlerin spesifik bölgelerinde görülen kazanılmış nokta mutasyonlarla hedef enzimin duyarlılığında azalma sonucu yüksek MİK değerleri ve klinik başarısızlığa yol açan kazanılmış FKS mutasyonları,

c- *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* gibi bazı *Candida* türlerinde doğal olarak meydana gelen ve kazanılmış FKS mutasyonları ile karşılaştırıldığında $\beta(1,3)$ D-glukan sentaz duyarlılığında daha fazla azalma sonucu daha yüksek MİK değerlerine yol açan intrensek FKS mutasyonlarıdır (84, 85).

Bununla birlikte, WT izolatlarla karşılaştırıldığında bazı FKS mutantlarının adaptasyon yeteneği ve virülans özelliklerinde anlamlı düzeyde azalma görüldüğü; bu durumun da geniş çaplı süveyans çalışmalarında bildirilen ekinokandin direncine ilişkin düşük insidansa katkıda bulunabileceği belirtilmiştir.

FKS genlerinde oluşan spesifik nokta mutasyonlarının “Hot-spot (Sıcak nokta)” bölgeleri olarak adlandırılan ve yüksek oranda korunmuş iki bölge etrafında kümелendiği bulunmuştur (84). Bu sıcak nokta bölgelerinde görülen mutasyonların $\beta(1,3)$ D-glukan sentaz enziminin duyarlılığında azalmaya yol açarak ekinokandinler arasında çapraz direnç gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (86-88). Polonya’da farklı hastanelerden izole edilen toplam 242 *Candida* izolatının ekinokandinlere duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle araştırılmış, izolatların %6,6’sında ekinokandinlere direnç varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bu antifungallerin moleküler hedefi olan $\beta(1,3)$ D-glukan sentazı kodlayan FKS1 geninde meydana gelen mutasyonlarla ilgili moleküler mekanizmaların da incelenmesiyle; ekinokandin direncine katkıda bulunan FKS1 gen mutasyonunun (T4072C), sadece *C. albicans* ve *C. inconspicua* izolatlarında olduğu tanımlanmıştır (60).

Polyen Makrolid direnci: Amfoterisin B, mantar hücre membranının bütünlüğünü bozan polyen makrolid sınıfı antifungallerin bir üyesidir. Bu sınıf içerisinde yer alan antifungaller, mantar hücre membranındaki başlıca sterol bileşiği olan ergosterole bağlanıp, membran üzerinde por formasyonuna ve sonuçta mantar hücresinde parçalanmaya neden olduğu bilinmektedir. Amfoterisin B, fungisidal aktivitesi nedeniyle etkili antifungallerden biridir. Amfoterisin B, patojen *Candida* türlerinin

çoğuna karşı yüksek antifungal aktivite gösterirken, fırsatçı patojen *Candida lusitanae*'nin bu ajana karşı yüksek düzey intrensek ve/veya kazanılmış direnç gösterdiği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalarda *C. norvegensis* ve *C. inconspicua* suşlarının amfoterisin B duyarlılıklarına ilişkin farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun kılavuzlarda bu türler için belirlenmiş bir ECV (Epidemiological cutoff value) değeri ve türlere özgü klinik sınır değerlerin bulunmaması yanında, amfoterisin B için gerçekleştirilen duyarlılık testlerinde farklı yöntemler ve farklı besiyerlerinin kullanımıyla elde edilen MİK değerlerinin farklılığına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, amfoterisin B'ye dirençli *C. inconspicua* suşlarının oranı %56,3 (27/48) olarak tespit edilirken; başka bir çalışmada ise test edilen bütün *C. inconspicua* suşlarının amfoterisin B'ye duyarlı olduğu bildirilmiştir (89, 90).

2.3. *Candida norvegensis*'in Klinik Önemi

Candida türleri, asemptomatik kolonizasyondan hayatı tehdit eden invaziv kandidiyazise varan farklı klinik tablolara yol açabilmektedir. Kandidozin hangi klinik tablo şeklinde prezente olacağı, başlıca konak immün sistemi tarafından belirlenmektedir. Son zamanlarda kandidoz patofizyolojisinde konak immün sistemindeki değişikliklere ek olarak *Candida* türlerinin sahip oldukları çeşitli Virülans faktörlerinin de bu süreçte aktif rol oynadığı belirlenmiştir.

Etkilenen vücut bölgesine göre kandidoz; kutanöz, mukozal (Orofarenks, özofagus ve vulvovajinal) ve sistemik (Kandidemi ve diğer invaziv kandidoz formları) kandidoz şeklinde başlıca üç ana gruba ayrılmaktadır.

Literatürde *C. norvegensis* ve *C. inconspicua* türlerine bağlı gelişen enfeksiyonların genellikle solunum, sindirim ve genitoüriner sistemler gibi belirli vücut bölümlerinde ortaya çıktığı görülmektedir. Bu enfeksiyonların klinik önemine ilişkin yapılan çalışmalarda araştırmacılar tarafından farklı görüşler bildirilmiş ve her iki türün de özellikle çeşitli faktörler sonucu immunsupresyon gelişen bireylerde invaziv kandidiyazise yol açabileceği vurgulanmıştır.

İlk kez Norveç'te 1954 yılında astımlı üç hastanın balgamından izole edilen *Candida norvegensis*, insanlarda klinik önemi yeni ortaya çıkan fırsatçı bir patojendir. İnsanların vajen florasında kommensal olarak bulunabilen *Candida norvegensis*; özellikli konaklarda başta solunum yolu enfeksiyonları olmak üzere fungal sepsis, kateter ile ilişkili enfeksiyonlar, vajinit, idrar yolu enfeksiyonları ve peritonit gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca, AIDS'li hastaların otopsi

örneklerinde perikard, karaciğer, böbrek, lenf nodu ve kemik iliği tutulumlarına da yol açtığı bildirilmiştir (3, 43). Klinik açıdan enfeksiyon ile ilişkisi ilk defa 1990 yılında periton diyalizi ile ilişkili peritonit gelişen renal transplant alıcısında tarif edilmiştir. O zamandan beri *C. norvegensis* enfeksiyonları sınırlı sayıda vakada tanımlanmış olup; bunların çoğu kanser hastaları ve HIV ile enfekte hastalardan oluşmaktadır (3, 4, 15, 91).

Norveç'te 1990-1996 yılları arasında sekiz hastaya ait farklı klinik örnek türlerinden izole edilen *C. norvegensis* izolatlarının karakteristik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, hastaların dördünde saptanan izolatların muhtemel patojen olup, klinik öneme sahip olduğu, diğer izolatların ise sadece kolonizasyona sebep olduğu bildirilmiş. Bu çalışmada yer alan hastaların demografik özellikleri değerlendirildiğinde, altısında altta yatan çeşitli malignitelerin olduğu; diğer ikisinde ise sırasıyla perfore gastrik ve duodenal ülser varlığı belirlenmiş olup *C. norvegensis*'in immunsuprese hastalarda enfeksiyonlara neden olabilen *Candida albicans* dışı *Candida* türleri arasında yer alabileceği vurgulanmıştır. Hastalardan elde edilen klinik örnek türlerinin dağılımı incelendiğinde; kan kültüründen üç, periton boşluğu drenaj sıvısından üç, idrardan iki ve balgam örneğinden de bir izolat saptanmıştır (15). Başka bir çalışmada, ikisi HIV ile enfekte, biri laparoskopik kolesistektomi operasyonu sonrası gelişen ince bağırsak obstrüksiyonu ve ARDS (Acute Respiratory Deficiency Sendrome), diğeri de metastatik akciğer karsinomu olan dört hastanın klinik özellikleri ile bu hastalara ait balgam, ağız yıkama sıvısı, üriner kateter yardımıyla alınan idrar, cerrahi yara yeri ve boğaz gibi çeşitli vücut bölümlerinden elde edilen örneklerden saptanan beş *C. norvegensis* izolatının patojenik önemi araştırılmış. Hastaların hepsi kaybedilmiş olup, sadece iki hastada muhtemel ölüm nedeni *C. norvegensis* ile ilişkili enfeksiyonlar sonucu düşünülürken; diğer hastalarda ise ölüm nedenlerinin altta yatan ölümcül sistemik hastalıklara bağlı olduğu belirtilmiştir (92). *C. norvegensis*'in klinik önemine ilişkin yapılan diğer çalışmalarda, Danimarka'dan bildirilen tüm olgularda; İngiltere'den bildirilen dört olgudan ikisinde elde edilen izolatlar muhtemel klinik öneme haiz olarak kabul edilmiştir. Danimarka'da 25 yıllık süre içerisinde 35 adet klinik *C. norvegensis* izolatı tanımlanmış olup, bu izolatların çoğunlukla solunum yolu, orofarenks ve vajinadan alınan örneklerden izole edildiği bildirilmiştir (43, 92). Ayrıca fungal peritonit gelişen hastalardaki etken türlerin incelendiği bir prospektif çalışmada, 117 hastanın ikisinde enfeksiyon etkeni olarak *C. norvegensis* izole edilmiştir (93).

İlk kez 1952 yılında tanımlanan ve daha önce patojenitesi hakkında net bir bilgi bulunmayan bir organizma olan *Candida inconspicua*, *C. norvegensis* ile fenotipik olarak yakından ilişkili bir tür olup, insanlarda orofarenks ve solunum sisteminin normal mikrobiyal florasında bulunan endojen kökenli saprofit bir maya türüdür. Klinik örneklerde, gram negatif basil morfolojisindeki bakteriler ve *Enterococcus* türleriyle birlikte bulunması endojen habitatını açıklayabilir. Yakın zamanda Hazen ve arkadaşlarının yeni ortaya çıkan patojen maya türlerine ilişkin gerçekleştirdiği kapsamlı bir incelemede, patojen olduğundan bahsedilen 20 *Candida* türü arasında *C. inconspicua*'ya yer verilmemiştir. Bununla birlikte, yapılan çeşitli çalışmalarda HIV ile enfekte bireylerde oral veya özofagus enfeksiyonları, kadınlarda vajinal enfeksiyonlar ve diabetes mellituslu hastalarda da çeşitli enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (94, 95). Uzun dönem uygulanan profilaktik flukonazol rejimi sonucu *Candida* türlerinde görülen selektif baskılanmanın, AIDS'li hastaların üst ve alt solunum yollarında *Candida albicans* dışı *Candida* türleriyle kolonizasyon ve enfeksiyon insidansını artırdığı bilinmektedir. Bu klinik antitenin diğer bir örneği olan *C. inconspicua*'nın da klinik önemi ve yaptığı enfeksiyonlara ilişkin gerçekleştirilen bir çalışmada, yedisinde ileri evre HIV ile ilişkili hastalık ve ikisinde de akut myeloblastik lösemi (AML) olan dokuz hastanın kan ve balgam örneklerinden izole edilen toplam 11 *Candida* izolatından dördü RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) yöntemiyle *C. inconspicua* olarak tanımlanmış. Bu hastaların tümü HIV ile enfekte ve uzun dönem flukonazol profilaksisi uygulanan hastalar olup, elde edilen izolatların ikisi balgamdan, diğer ikisi de oral kavite ve özofagustan izole edilmiştir (5). Başka bir çalışmada, çeşitli hematolojik malignitelere sahip olan üç hastadan ikisinde *C. inconspicua*'ya bağlı intravenöz kateterle ilişkili fungemi, üçüncü hastada aynı türe bağlı gelişen fungal hepatitli üç olgu bildirilmiş. Bu olgular, bir aylık bir sürede yan yana tek kişilik odalarda kalan hastalarda saptandığı ve tüm suşların RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve RAPD yöntemleriyle benzer DNA bant paterni göstermeleri nedeniyle ortak bir kaynaktan yayılan, nozokomiyal bir salgın olasılığını işaret edebileceği belirtilmiştir (6).

2.4. İnvaziv Kandidoz için Risk Faktörleri

Kandidemi dışında, *Candida* türlerine bağlı görülen invaziv enfeksiyonlar; endokardit, endoftalmit, kateterle ilişkili enfeksiyonlar, septik tromboflebit, artrit, osteomyelit, spondilodiskit, menenjit, piyelonefrit, pnömoni ve hepatosplenik kandidoz (kronik dissemine kandidoz) gibi hematojen yayılım gösteren enfeksiyonlardır. *Candida*

enfeksiyonlarının oluşumunda etken mayanın Virülans faktörleri ve konağa ait çeşitli faktörler birlikte rol oynamaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda özellikle immunsupresif hastalarda ve yoğun bakım hastalarında *Candida* enfeksiyonlarının gelişiminin öngörülmesi ve erken dönemde antifungal tedavi başlanması amacıyla farklı skorlama sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunlardan en çok bilinenler “*Candida* kolonizasyon indeksi” ve “*Candida* skoru” skorlama sistemleridir (96).

Pittet ve arkadaşları, bu konu üzerinde yapılmış çeşitli çalışmalardan elde edilen verilerden yola çıkarak 1994 yılında yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *Candida* türleriyle kolonizasyonun derecesini saptamak amacıyla “*Candida* kolonizasyon indeksi” skorlama sistemini geliştirmiştir. Bu çalışmada, *Candida* türleriyle kolonizasyon olmayan hastalarda invaziv kandidoz gelişme riskinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır (96).

İspanyol bir grup araştırmacı tarafından 2006 yılında, nötropenik olmayan, kritik hastalardaki invaziv kandidoz gelişme riskini tahmin etmek amacıyla dört parametre (Total parenteral nütrisyon, cerrahi operasyon, multifokal kolonizasyon ve ciddi sepsis) tanımlanmış ve bu parametreler kullanılarak “*Candida* skoru” olarak adlandırılan yatak başı skorlama sistemi oluşturulmuştur. *Candida* türleriyle ilişkili enfeksiyon şüphesi olan hastalarda erken antifungal tedavi kararının verilmesinde $\geq 2,5$ skor varlığının önemi belirtilmiştir (97, 98).

Ayrıca, yapılan kapsamlı çalışmalar sonucu invaziv kandidoz gelişiminde konağa ait çeşitli risk faktörleri tespit edilmiştir.

Bunlar;

- Diabetes Mellitus
- Nötropeni
- Renal yetmezlik
- Hemodiyaliz
- Geçirilmiş cerrahi (özellikle abdominal cerrahi)
- İmmunsupresif tedavi (Kemoterapi, yüksek doz glukokortikosteroid vb.) kullanımı
- Hematolojik ve solid organ maligniteleri
- Hastaneye yatış nedeni ve hastanede kalış süresi
- Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı
- Ciddi sepsis varlığı
- Mekanik ventilasyon

- Total parenteral n trisy n
- Santral venöz kateter varlığı
- Üriner kateter varlığı
- *Candida* kolonizasyon varlığı
- Organ transplantasyonu
- Kan ürünü replasmanı
- Prematürite

gibi risk faktörleri olup; invaziv kandidoz gelişiminde çeşitli derecelerde etkili olmaktadır (99, 100).

2.5. *Candida norvegensis* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısında Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Direkt mikroskopik inceleme

Klinik örneklerdeki muhtemel etken/etkenlerin öngörülmesinde sıklıkla kullanılan ve boyalı mikroskopik inceleme ile birlikte olası etkene yönelik ampirik antimikrobiyal tedaviye başlama imk nı sağlayan yöntemlerdir. şüpheli maya enfeksiyonu olan olgularda kültür öncesinde tomurcuklanan blastokonidi ve psödohif gibi yapıların varlığını tespit etmek için kullanırken, ayrıca kültürde üreyen kolonilerin tanımlanmasında da kullanılmaktadır.  ncesinde etil alkol veya metil alkole batırılarak ya da Bunzen bek alevinden geçirilerek temizlenen lamaların orta kısımlarına klinik örneklerden veya besiyerinde üreyen maya kolonilerinden hazırlanan süspansiyondan bir damla damlatılır. Damlanın  zerine hava kabarcığı oluşturmadan dikkatlice lamel kapatılarak düşük büyütmeli objektif kullanılarak ışık mikroskopunda maya hücresi büyüklüğü ve şekli, tomurcuklanan hücrelerin ana hücre ile bağlantısı, psödohif varlığı gibi karakteristik mikroskopik özellikler incelenir. İncelenen  rneğin keratin ve mukus tabakasından zengin olması durumunda, mantar elemanlarının görünürlüğünü artırmak için %10-15 konsantrasyonda KOH içeren  z lti kullanılmaktadır. KOH  z ltisi, mantar elemanlarının yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Steril vücut sıvıları (BOS, plevral sıvı, perikard sıvısı, periton sıvısı, eklem sıvısı, idrar vb.) ve yüksek hacimli sıvı örnekler, direkt mikroskopik inceleme öncesi santrifüj edilerek değerlendirme işleminin hassasiyeti artırılmaktadır.

2.5.2. Boyalı mikroskopik inceleme

Birçok mikroorganizmanın sahip olduğu kapsül, hücre duvarı, flajella, spor, intrastoplazmik granüller gibi hücresel yapılar nedeniyle belirli boya çözeltileriyle boyandığı bilinmektedir. Karakteristik boyanma özellikleri; etkenin ön tanısı, hangi besiyerine ekim yapılacağı ve ampirik tedavi uygulaması gibi birçok faktör üzerinde etkilidir. Çini mürekkebi (Nigrosin eriyiği) ve Löffler'in metilen mavisi gibi tek bir boya çözeltilisinin kullanıldığı basit boyama yöntemleri olduğu gibi, mikroorganizmaların yapı ve morfolojileri hakkında daha detaylı bilgiler verebilen çeşitli kompleks (bileşik) boyama yöntemleri de bulunmaktadır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılan bir bileşik boyama yöntemi olan Gram boyamada, hücre duvarı yapısındaki farklılıklara göre ayırım yapılmaktadır. Gram boyamada kristal viyole (2 dk) uygulanması, lugol çözeltisi (mordant solüsyon, 1 dk) eklenerek boya kompleksi oluşumu, aseton/alkol (v/v: 50/50) ile dekolorizasyon (5-10 sn) ve safranin/sulu fuksin ile zıt boya çözeltisi uygulanması (30 sn) gibi dört aşama bulunmaktadır. Mayalardaki blastokonidi ve psödohif yapıları gram pozitif boyanmaktadır.

Calcofluor White® (BBL, BD Diagnostics, ABD); β (1-3) ile β (1-4) bağları içeren çeşitli polisakkaritlere bağlanabilen ve uzun dalga boyunda UV ya da kısa dalga boyuna sahip mavi/mor ışığa maruz bırakıldığında floresan mikroskopta kullanılan filtre sistemine bağlı olarak elma yeşili veya mavimsi-beyaz renkte floresan veren spesifik olmayan florokrom bir boyadır. Mantar hücre duvarı yapısında bulunan kitin tabakası içerisinde bulunan β (1-3) D-glukan molekülüne de bağlanmaktadır. Taze, donmuş, fikse edilmiş, parafine gömülü halde olan çeşitli klinik örnek türlerinin incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır Tavsiye edilen dalga boyunda (300-412 nm) ışığa maruz kaldığında klinik örneklerdeki mantar türleri açık elma yeşili veya mavimsi beyaz renkte floresan ışımaya yayacaktır. Floresan mikroskopta önce düşük büyütmeden başlanarak preparat üzerindeki en az 100 saha gezilmelidir. Bununla birlikte, preparattaki mantarların daha iyi görülebilmesi için Evans mavisi kullanılarak zemin ile diğer hücresel yapıların spesifik olmayan parlak yeşil renk vermesi mavi ışık etkisiyle azaltılabilmektedir.

Bununla birlikte; özellikle küflerde kullanılan ve mantar hücre membranında bulunan ergosterole bağlanan laktofenol pamuk mavisi boyama, hücre içi mantar türlerinin daha iyi gözlenmesine olanak sağlayan, *Pneumocystis jirovecii*'nin intrakistik cisimcikleri ve trofozoitlerinin de incelendiği Giemsa boyama ve mantar hücre

duvarındaki (1-3) ve (1-4) β D-glukan molekülüne bağlanan, monoklonal antikorlar ile işaretlenmiş floresan boyaları kullanılarak yapılan direkt floresan boyama yöntemleri de mantarların tanımlanmasında kullanılmaktadır.

2.5.3. Kültür temelli tanı yöntemleri

2.5.3.1. Kültürde makroskopik morfolojinin değerlendirilmesi

Mikoloji laboratuvarlarında fungal etkenlerin tanımlanmasında kullanılan standart izolasyon besiyeri Sabouraud dekstroza agar (SDA), insan enfeksiyonlarından sorumlu çeşitli *Candida* türlerinin klinik örneklerden izolasyonunda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Besin öğelerinden fakir olan bu besiyeri, sahip olduğu yüksek glukoz içeriği (%4) ve asidik (pH 5.6) ortam nedeniyle bakterilerin üremesini baskılamaktadır. Bununla birlikte, bakteriyel kontaminasyonu en aza indirmek amacıyla besiyerine kloramfenikol, gentamisin veya siprofloksasin gibi antibiyotikler eklenmektedir. Mayalar bu ortamda genellikle 48-72 saat içinde gözle görülebilen koloniler üretmektedir. Patojen *Candida* türleriyle ilişkili invaziv enfeksiyonlar açısından konakçı ortam koşullarının taklit edildiği 37°C sıcaklıkta üreme, önemli bir özelliktir. *C. norvegensis* izolatlarının, Sabouraud Maltoz Agar besiyerine (pH 4.0) ekimi gerçekleştirilip 25 ve 37°C’de inkübe edildikten 48 saat sonra sarımsı gri renkli koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (43).

2.5.3.2. Mikroskopik tanımlama

2.5.3.2.1. Germ tüp testi

Germ tüp testi, mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Candida albicans*/*Candida dubliniensis* ve *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin ayırımında kullanılan genel ve pratik bir yöntemdir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında *C. albicans*’ın klinik örneklerden olası tanımlamasında kullanılan bu yöntemin temeli, *C. albicans* olduğundan şüphelenilen maya kolonilerinin gerçek hif oluşumunu indükleyen uygun koşullara sahip bir ortamda kısa, ince, tüp benzeri yapılar üretme kabiliyetine dayanmaktadır. Standart test ortamı olarak fetal sıgır serumu veya plazma önerilmektedir (101). Rutin pratikte ucuz olması nedeniyle genellikle havuzlanmış insan serumu kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemde, SDA’da üreyen 24-48 saatlik taze kültürden steril bir aplikatör aracılığıyla alınan 2-3 adet saf koloni havuzlanmış insan serumu içeren ependorf tüplerine inoküle edildikten sonra 35-37°C’de 2-3 saat inkübasyon yapılmaktadır. Inkübasyon sonunda süspansiyondan bir miktar alınarak temiz bir lamın üzerine aktarılır ve üzerine lamel kapatılarak 20-40X’lık objektif kullanılarak ışık mikroskopunda incelenir. Germ tüp, ana maya hücresinin tabanından

boğumlanmadan çıkan ve gerçek hif oluşumunun ilk aşamasını temsil eden tübüler bir yapıdır. Direk mikroskopik incelemede tüm preparat boyunca en az beş adet germ tüp görülmesi pozitif, en az 10 kuru, yüksek büyütme alanı incelendiğinde germ tüp varlığının görülmemesi negatif olarak kabul edilmektedir (102).

C. albicans ve *C. dubliniensis* türlerinde germ tüp testi pozitifdir. *Candida norvegensis* ve *Candida inconspicua* türlerinin germ tüp testi negatiftir (103).

2.5.3.2.2. Blastokonidi, hif/psödohif ve klamidospor oluşumu

Mayaların tanımlanmasında makroskopik morfolojik özelliklerle birlikte mikroskopik morfolojik özelliklerden de faydalanılmaktadır. Türler arası ayırmda büyük bir öneme sahip olan bu adım; blastokonidi, artrokonidi, klamidospor, psödohif ve gerçek hif gibi yapıların üretilip üretilmediğinin tespitiyle birlikte birçok *Candida* türü için önceden tanımlanan karakteristik mikroskopik görünümünün değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır. *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden mikroskopik olarak ayırımı, %1 Tween80 ve tripan mavisi içeren mısır unlu agar ekim yapıp 25°C'de 48-72 saat inkübasyon sonrası klamidospor oluşumunun saptanmasına dayanmaktadır. Tween80 ilavesi klamidospor oluşumunu teşvik ederken, tripan mavisi mayaların morfolojik özelliklerini daha net biçimde gözlemlemek için optimal arka plan sağlamaktadır (102).

C. inconspicua, benzer fenotipik ve biyokimyasal özellikler göstermesi nedeniyle *C. krusei* ile karışabilmekte ancak; RAT [Rice (Pirinç) Agar Tween] besiyeri ortamında psödohifa oluşturamama (ya da ilkel bir psödohif varlığı) ve N-asetil glukozamini fermente/asimile edememenin *C. inconspicua* için karakteristik bir özellik olduğu ve ayırmda kullanılabileceği bildirilmektedir.

C. norvegensis'in glukozlu maya ekstratı içeren peptonlu su (glucose-yeast extract-peptone water) besiyerinde 25°C'de 72 saat inkübasyonu sonunda mikroskopik olarak uzun, yuvarlak-oval şekle sahip 2-8 µm ile 8-13 µm boyutlarda blastokonidiler ve psödohif oluşturabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte *C. krusei*, *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türlerine ait klinik izolatlar ile ATCC referans suşlarının RAT ortamında psödohif oluşturma kabiliyetleri araştırılmış; *C. inconspicua* izolatları ve *C. norvegensis* ATCC 20686 referans suşu dışındaki klinik *C. norvegensis* izolatların hiçbirinde psödohif oluşumu saptanmamıştır (104).

2.5.3.3. Biyokimyasal özelliklerin incelenmesi

Karbonhidrat fermentasyon/asimilasyon testleri

Candida türlerinin ayrımında kullanılan geleneksel tanı yöntemleri, morfolojik özelliklerle birlikte fermentasyon/asimilasyon reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu yöntemle, mayaların çeşitli karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanma yetenekleri değerlendirilmektedir. Klinik örneklerden izole edilen fermenter maya türleri, ortamdaki karbonhidratları kullanarak karbondioksit ve etil alkol açığa çıkarmaktadır.

Günümüzde klinik laboratuvarların çoğunda Wickerham tarafından önerilen klasik fermentasyon/asimilasyon test yönteminin yerini hazır ticari test sistemleri almıştır. Bu sistemlerin kurulumu daha az zaman almakta ve yorumlaması daha kolay olmaktadır. Genellikle klasik test yöntemlerine göre daha hızlı tanımlama olanağı sunmaktadır. Bazıları, çok çeşitli organizmaları tanımlayabilen kapsamlı veri tabanları sunar, ancak diğerleri kapsam olarak çok daha sınırlıdır (105). Bu sistemler türbidimetrik ya da kolorimetrik test prensiplerine göre çalışmaktadır. Test edilecek izolatların 24-48 saatlik taze kültürlerden elde edilen kolonilerden olması optimal sonuç açısından önerilmektedir. Test için uygun inkübasyon sıcaklığı genellikle 30 °C olup, inkübasyon süresi 24-72 saat arasında değişebilmektedir. İnokulum konsantrasyonu ise, kullanılan test yöntemine göre 1,5- 3 McFarland arasında değişmektedir. Sonuçların yorumlanması, her bir kuyucukta meydana gelen bulanıklık veya renk değişiminin kontrol kuyucuğundaki bulanıklık veya renk değişimiyle kıyaslanması aracılığıyla gerçekleştirilirken; bazı test yöntemlerinde biyokimyasal reaksiyonlara ek olarak 37 °C'de üreme, psödohip/hif ya da artrokonidi oluşumu, kapsül varlığı gibi tamamlayıcı testlere gereksinim duyulmaktadır.

Şu anda rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerine göre identifikasyonu amacıyla kullanılan çeşitli ticari sistemler bulunmaktadır. Bu sistemlerin tür ayrımındaki duyarlılık ve özgüllükleri değişkenlik göstermektedir. API ID 32C (BioMérieux), API 20C AUX (BioMérieux), Yeast Star (Clarc Laboratories, Netherlands), Auxacolor (Sanofi, Paris), Rapid ID Yeast Plus (REMEL, Thermo Scientific), API *Candida* (BioMérieux) ticari test sistemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; sistemlerin doğru tanımlama oranları %59,6-80,8 arasında değişmektedir (105). API 20C AUX ve API ID 32C sistemlerinde türbiditenin değerlendirilmesinde birtakım güçlüklerle karşılaşılabilirdiği, bazı yakın ilişkili türlerin veri tabanı içerisinde yer almadığı ve tür tanımlanmasında ek testlere gereksinim

olduğu belirtilmektedir. Micronaut-*Candida* ile API ID 32C'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise; test edilen *C. norvegensis*, *C. pulcherrima* ve *C. rugosa* ATCC suşlarının Micronaut-*Candida* sistemiyle ya tanımlanamadığı ya da hatalı bir şekilde tanımlandığı; klinik izolatlarda ise API ID 32C sistemiyle 18 izolatın (12 *C. inconspicua*/*C. norvegensis*; beş *C. lusitaniae*/*C. famata* ve bir *C. tropicalis*/*C. humicolus* olarak tanımlanmıştır), Micronaut-*Candida* sistemiyle ise iki izolatın hatalı olarak tanımlandığı saptanmış. Ayrıca, her iki sistem kullanılarak iki klinik *C. pulcherrima* izolatı tanımlanamamıştır (106).

Hastalık etkeni olarak izole edilen çoğu *Candida* türü birçok karbonhidratı fermente/asimile edebilmesine rağmen *C. norvegensis*, kısıtlı asimilasyon yeteneğine sahiptir. Glukozu fermente edememesine rağmen asimile etmektedir. Ayrıca bazı izolatların selobiyoz, etanol, gliserol, salisin, laktik asit, süksinik asit, galaktoz, sorboz, maltoz, trehaloz, laktoz, melibiyoz, rafinoz, melizitoz, inülin, ksiloz, arabinoz, riboz, ramnoz, eritritol, mannitol ve inozitolü tek karbon kaynağı olarak kullanabildiği belirtilmiştir (3). Benzer fermentasyon paterni sergileyen *C. inconspicua* ve *C. krusei* türleriyle fenotipik ayırmda çeşitli zorluklar yaşanmaktadır (107). API ID 32C (BioMe'rieux) gibi biyokimyasal tanı sistemleri, bu iki türü yalnızca, değişkenliği iyi bilinen bir fenotipik özellik olan eskülin hidroliz aktivitesine göre ayırt etmektedir (11). Ancak bazı durumlarda, API ID 32C (BioMe'rieux) test stribi kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon/asimilasyon testleri *C. norvegensis*'i *C. inconspicua* ve *C. krusei*'den ayırt etmede başarısız olabilmektedir.

Üreaz enzim aktivitesi

Mayalar, besiyerinde bulunan uygun substratların varlığında sahip oldukları üreaz enzimi aracılığıyla bir dikarbamid olan üre molekülünü parçalamaktadır. Sonuçta açığa çıkan amonyak molekülü ortamın pH'sını alkali hale dönüştürmekte ve pH indikatörü fenol kırmızısı ayıracında pembe-kırmızı renk değişikliğine neden olmaktadır. Hızlı üreaz testi, solunum sekresyonları ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen mayaların üreaz aktivitelerinin saptanmasında yararlı bir yöntemdir. Bu yöntem alternatif olarak, yatık halde cam tüplere dökülen Urea Agar Base® (acc. to Christensen, HiMedia, Hindistan) besiyerinin yatık yüzeyine nikrom iğne öze kullanılarak yoğun koloni ekimi gerçekleştirilip, 35-37°C'de inkübasyon yapılmasıdır. Çoğu durumda, birkaç saat içinde pozitif bir reaksiyon meydana gelirken; *Rhodotorula* türleri, bazı *Candida* türleri ve *Trichosporon* türlerinde üre hidroliz reaksiyonu için 1-2 gün inkübasyon gerekebilir. Bu açıdan, tanımlamada kullanılan diğer testler

sonucunda olası tür tayini göz önünde bulundurularak farklı inkübasyon süreleri gerektiren geleneksel üreaz testi ile hızlı üreaz testi arasında bir ayırım yapılmalıdır (102).

C. krusei ve *C. lipolytica*'nın üreaz aktivitesi pozitifdir. *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın üreaz aktivitesi negatiftir.

Kromojenik besiyerleri

Kromojenik besiyerleri, hedef mikroorganizmalar tarafından ortama salınan bazı enzimler (Beta heksosaminidaz vb.) ile reaksiyona giren kromojenik substratlar içeren seçici ve ayırt edici besiyerleridir. Bu substratların türe özgü enzimler ile hidrolizi sonucu farklı renk ve morfolojide koloniler oluşmakta, üreticinin önerileri doğrultusunda tür tayini yapılmaktadır. Son zamanlarda, farklı *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılmak üzere birçok kromojenik besiyeri üretilmiştir: CHROMagar *Candida* (Becton Dickenson); Albicans ID2, *Candida* ID agar, *Candida* ID2 ve ChromID *Candida* agar, (BioMérieux); Candiselect medium ve CandiSelect 4 (Bio-Rad).

CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, ABD) besiyeri, klinik örneklerden *Candida* türlerinin doğrudan izolasyonunda kullanılan ayırt edici bir besiyeri olup, azol türevleri ve amfoterisin B gibi antifungal tedavide sıklıkla kullanılan ajanlara karşı potansiyel dirençli veya azalmış duyarlılığa sahip izolatların hızlı bir şekilde identifikasyonuna yardımcı olmaktadır (108). Bu besiyerinde; *C. albicans* yeşil renkli, S tipi koloni; *C. tropicalis*: koyu metalik mavi renkli, agara difüze pembe halesi olan S tipi koloni ve *C. krusei* ise pembe, pürüklü, R tipi koloni görünümünü sergilemektedir. *C. norvegensis*, CHROMagar *Candida* besiyerinde pembe, lavanta veya fil dişi renginde koloniler oluşturmaktadır. *C. norvegensis* ile yakından ilişkili bir tür olan *C. inconspicua*'nın da bu besiyerinde yassı, pembe-lavanta renkli koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir (108).

2.5.3.4. Kültür dışı tanı yöntemleri

2.5.3.4.1. Serolojik testler

Serolojik testlerin kullanımı invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan bazıları kültür için örnek alınamadığı veya etkenin kültürde üretilmesinin mümkün olmadığı durumlarda pozitif serolojik testlerin yardımcı olması, *Coccidioides* türleri gibi laboratuvar koşullarında aerosol oluşumu riski nedeniyle yüksek bulaş ihtimali olup, dikkatle çalışılması gereken mantarlar için

kültür gereksinimde azalma ve etkenin izolasyonunun gerektiği kültür yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermesidir (109).

Ancak düşük duyarlılık ve özgüllük oranları, bazı prosedürlerin zaman alıcı olması, deneyimli personel gereksinimi, diğer fungal etkenlerle çapraz reaksiyonların varlığı, kolonizasyon/enfeksiyon ayırımında güçlük, immunsupresyon varlığında özgül antikor yanıtının oluşmaması, enfeksiyonun erken safhaları, analitik saptama eşik değerinin yüksek olduğu bazı mikrobiyal antijenlerin tespiti gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. *Candida* türleriyle ilişkili enfeksiyonlar esnasında kan dolaşımında/izole edilen vücut bölgelerinde *Candida* türlerine ait antijenik yapıların ve/veya bu yapılara karşı oluşan özgül antikorların kanda tespit edilmesi esasına dayanan çeşitli serolojik test yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında immünodifüzyon, lateks aglütinasyon, kompleman fiksasyon, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) ve RIA (Radio immunoassay) yer almaktadır (110, 111).

Mannan antijeni ve antimannan antikor

Mannan invaziv kandidiyazisli hastalarda dolaşımda bulunan, polisakkarit yapıda ve yüksek immünojenik özelliğe sahip bir antijendir. Mannana karşı oluşan antikorların tespitinde çeşitli serolojik test yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri, kullanılan yöntem/test edilen maya türüne göre değişkenlik göstermektedir. Ticari olarak mannan antijeninin tespitine yönelik ELISA ve lateks aglütinasyon temelli testler mevcuttur. ELISA testlerinde duyarlılığın 10 kat fazla olduğu bildirilmiştir. ELISA testi olarak Platelia *Candida* Antibody Test (BioRad, Redman, ABD) kullanımda olan bir test olup testin pozitiflik sınır değeri 10 AU/ml'dir. Ancak bu testin nötrojenik olmayan hastalarda duyarlılığının düşük olarak bildirilmiştir (112). Kolonizasyon ve invaziv enfeksiyon ayırımında başarısızlık, mannan antijeninin kısa serum yarılanma ömrü, dolaşımda mannan/anti-mannan antikor kompleksinin oluşması sonucu serbest halde antijen bulunmaması gibi bazı durumlarda yalancı pozitif ve negatif sonuçlar olmaktadır. Mannan antijeniyle kombine edilip çalışıldığında, duyarlılık %80 ve özgüllük %93 civarında olmaktadır (110).

1,3 β -D-glukan

β 1(113) D-glukan (BDG), *Cryptococcus neoformans*, *Zygomycetes* türleri dışında pek çok mantarın hücre duvarında bulunan; nötrofil, makrofaj ve kompleman sisteminin aktivasyonuna yol açan ve invaziv mantar enfeksiyonlarında dolaşımda tespit edilebilen karakteristik bir belirteçtir (111). BDG molekülünün tespitine yönelik çeşitli

ticari kitler kullanıma sunulmuştur: β -D-glucan Test (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japonya) Fungi Tec (Seikagaku Kogyo Corporation, Tokyo, Japonya), BG-Star (Maruha Corporation, Tokyo, Japonya), Glucatell (Fungitell, Associates of Cape Cod, ABD).

İnvaziv kandidoz tanısında BDG tespitine yönelik yapılan bazı çalışmalarda duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %87, %73; %92, %81 olarak bulunmuştur (57, 114). *Candida* türleri ile kolonizasyon, amoksisilin-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktam gibi bazı antibiyotiklerin kullanılması, bakteriyel enfeksiyonlar ve kan ürünlerinin (immunglobulinler veya albümin) kullanımı gibi birçok durumda yanlış pozitiflik bildirilmiştir. Birçok kez negatif saptanan BDG test sonucunun yüksek negatif prediktif değere sahip olduğu ve kandidemi tanısının dışlanmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (115).

2.5.3.4.2. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler, insanlarda çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu olan mantarların tür düzeyinde tanımlanması, antifungal ajanlara karşı direnç varlığının tespit edilmesi, moleküler epidemiyolojik çalışmalar ve fungal enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynayan Virülans faktörlerinin fonksiyonlarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. 1990'lı yılların ikinci yarısından itibaren mantar enfeksiyonlarından sorumlu etkenlerin tanımlanmasına yönelik nükleik asitlerin tespiti yapılmaktadır. Bu yöntemin doğrudan klinik numunelerde uygulanabilmesi, örnekte çok az miktarda bulunan ve/veya kültürde üretilmeyen mikroorganizmaları tespit edebilmesi ve laboratuvar sonuç verme süresinin kısalması gibi birçok avantajı vardır (116).

Mantarlardaki gen bölgelerinin tespitinde genel (pan-fungal) ve türlere özgü primerler kullanılmaktadır. Ribozomal DNA (Deoksiribonükleik asit) gen kompleksi, moleküler çalışmalarda en sık araştırılan hedef bölge olup, bu bölgenin dizi analizi nadir rastlanan veya henüz tanımlanmamış mantar türlerinin kesin tanımlanmasında giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. ITS1-ITS2 ve 28 S rDNA'da bulunan D1/D2 gen bölgelerinin dizi analizi, klinik laboratuvarlarda sıklıkla karşılaşılan maya türlerinin ayırımında kullanılmaktadır (117). ITS; 18S ve 28S rDNA gen bölgeleri arasında, 5.8S rDNA gen bölgesinin ise her iki yanında bulunan gen bölgesidir (118). 18S ve 28S rDNA gen bölgelerindeki nükleotid değişkenliği sınırlı olduğundan daha çok tür dışındaki taksonomik araştırmalarda kullanılırken, tür düzeyinde tanımlama yapmak veya tür içi varyasyonları tespit etmek için ise değişkenliği fazla olan ITS gen bölgelerinin kullanılması önerilmektedir (117). Bununla birlikte, intronlardaki

polimorfizm ve dizi uzunluk farklılıkları nedeniyle mantar türlerinin ayrımı için β -tubulin, kalmodulin, aktin ve EF-1 alfa gibi intron açısından zengin, protein kodlayan genler önerilmektedir (119-121). EF-1 alfa (Bakteriyel bir protein olan EF-Tu'nun analogu) protein sentezinin temel bileşenlerinden biri olup, aminoasit tRNA (Transfer RNA) moleküllerini bağlar ve bunları uzamakta olan polipeptit zincirine bağlı haldeki ribozom kompleksi üzerinde bulunan akseptör (alıcı) bölgeye taşır. Bu gen, *Fusarium* cinsinde yer alan yakın ilişkili türler arasında yüksek düzeyde dizi polimorfizmi göstermekte ve tür tanımlanmasında ITS1-ITS2 ve D1/D2 gen bölgelerine alternatif olarak kullanılabilir. Benzer şekilde, çeşitli patojen mantar türlerinin moleküler identifikasyonunda da kullanılmaktadır (119, 122).

Ülkemizde Kalkancı ve arkadaşları, 49 nötropenik hastanın kan örneklerindeki fungal DNA varlığını PCR yöntemi ile araştırmış, yedi (%14,2) hastada genel (pan-fungal) primerlerle ve beş (%10,2) hastada ise *Candida* cinsine spesifik primerlerle olumlu sonuç bildirmişlerdir (123). Palm yağı şarabı ve “*tchapalo*” gibi alkollü içeceklerden izole edilen, aralarında *C. inconspicua*'nın da bulunduğu 37 maya türü; PCR-RFLP ve ITS1-5.8S-ITS2 ile D1/D2 gen bölgelerinin dizi analizi kullanılarak doğru bir şekilde tanımlanmıştır (56). Mantar hücrelerinden DNA izolasyon işleminin etkin olarak yapılması, kanda saptanabilecek eşik değer üzerinde mantar hücresinin olması, fungal ve insan DNA'sı arasındaki benzerlik ve birçok mantar patojeninin çevrede ve insan florasında bulunması nedeniyle yanlış pozitif sonuçların çıkması gibi başlıca zorluklarıdır. Bu nedenle, kullanılan PCR teknikleri ile saptanan sonuçlar arasında büyük oranda değişkenlikler görülmektedir. PCR-tabanlı testler *Candida* cinsindeki türlerin tanımlanması için henüz resmi kılavuzlara girmemiştir (124).

DNA sekans analizi

Nükleik asit moleküllerinin sekans analizi, belirli bir DNA veya RNA molekülünde bulunan nükleotid dizilerinin kesin sırasını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Çok sayıda nükleotid dizilerine sahip olan nükleik asit moleküllerindeki dizi konfigürasyonu, canlıların kalıtsal özelliklerine ilişkin önemli bilgiler içermektedir. Bu nedenle yıllar boyunca araştırmacılar DNA dizilerini belirlemek için birçok çalışma yapmıştır. İlk dizileme çalışmaları, tamamlayıcı (komplementer) bir ipliğe sahip olmaması ve ökaryotik genomlara göre çok daha kısa olması nedeniyle tek iplikli RNA yapısındaki bakteriyofajların genomları üzerine yoğunlaşmıştır. Holley ve ark. 1965 yılında mayalardaki alanin tRNA'sına ait 77 baz uzunluğundaki ilk polinükleotid

dizisini belirlemiş fakat; kullanılan yöntemin zaman alması ve zahmetli olması nedeniyle analiz süreci yıllar almıştır.

DNA dizi analizi için 1977 yılında “Maxam-Gilbert” ve “Sanger” olmak üzere iki yöntem ortaya çıkmıştır. Maxam-Gilbert yöntemi, çeşitli kimyasallar kullanılarak farklı boyutlarda DNA parçalarının oluşturulması esasına dayanmaktadır. Elde edilen DNA parçaları jelde yürütüldükten sonra büyüklüklerine göre DNA dizisi belirlenmektedir. Fakat tehlikeli kimyasallar kullanılması ve Sanger yöntemine göre daha yavaş olması nedeniyle, bilim adamları tarafından daha çok Sanger yöntemi tercih edilmektedir (125). Sanger yöntemi, otomatize sistemlere entegre edilerek yaklaşık 30 yıl boyunca DNA dizileme teknolojisi alanında önemli bir yere sahip olmuş ve altın standart olarak kullanılmıştır (126). Bu yöntemde DNA zincirlerinin sonlandırılması, sentez reaksiyonu sırasında deoksiribonükleotidler (dNTP) kimyasal analoglarının kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Dideoksinükleotidler (ddNTP) DNA zincirinin uzatılması için gereken 3’hidroksil gruplarını bulundurmadiğından sonraki dNTP’nin 5’ fosfat grubu ile bağ oluşturamaz. Bu nükleotidler standart dNTP’ler ile belirli konsantrasyonlarda karıştırılarak DNA sentezinde kullanılırsa, bu nükleotidlerin zincire eklendiği bölgelerde DNA zinciri sonlanır ve muhtemel bütün kombinasyonlarda DNA zinciri oluşturulmakta ve farklı boyutlardaki diziler poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek ayrılırken DNA zincirindeki nükleotidlerin dizilenmesi yapılmaktadır.

Pirosekanslama (Pyrosequencing) ilk ortaya çıkan ikinci nesil dizileme teknolojisi olup, DNA polimeraz enzimine gereksinim duyduğu için sentez yoluyla dizileme (sequencing by synthesis) prensibine dayanmaktadır. DNA sentezi sırasında zincire nükleotid eklenmesiyle ortama salınan pirofosfat grubunun bir dizi enzimatik reaksiyonlar sonucu meydana getirdiği ışık şiddetinin incelenerek zincire eklenen nükleotidin tespit edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde paralel şekilde gerçekleştirilen dizileme reaksiyonları sonucu eş zamanlı dizi analizi yapılan DNA miktarı büyük ölçüde artmıştır (127). İkinci nesil dizileme teknolojileri pirosekanslama tekniğini kullanan 454 cihazıyla başlamış ve daha sonra Solexa® (Illumina Inc.) ile devam etmiştir. Solexa teknolojisinde katı yüzeye bağlı haldeki DNA zincirlerinin sentezi sırasında ortamda bulunan floresan ile işaretli dNTP’ler tarafından ışımaya oluşmakta ve bu ışımalar yüksek çözünürlüklü kameralar ile kayıt altına alınmaktadır. İlk zamanlarda çok kısa dizi okumaları (35 baz uzunluğunda)

yapılmakta iken, zamanla okuma büyüklükleri artırılarak daha uzun dizi okumaları (300 baz uzunluğunda) yapılabilmektedir (128).

Bu iki dizileme teknolojisinden sonra SOLiD® (Applied Biosystem) adında DNA ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yoluyla dizileme reaksiyonlarının yapıldığı bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu yöntemde, floresan ile işaretlenmiş oligonükleotid problemlerin DNA zincirine ligasyonu sonrası problemlerin işaretli uç kısımları kesilerek döngü devam ettirilmektedir. Bu teknik, sentez yoluyla sentezleme prensibiyle çalışan Illumina teknolojisine göre elde edilen okuma uzunluğu ve kapsam (coverage) değerlerine ulaşmasa da baz başına düşen maliyet açısından halen rekabetini sürdürebilmektedir (129). İkinci nesil dizileme teknolojileri içerisinde floresan veya lüminesans teknikleri kullanılmaması nedeniyle Ion Torrent® (Thermo Fisher Scientific™) teknolojisi öne çıkmakta ve DNA sentezi sırasında hidrojen iyonlarının ortama salınmasından kaynaklanan pH düzeyindeki değişimleri hesaplayarak dizi analizi yapmaktadır. Ion Torrent® teknolojiyle homopolimer yapısındaki genom bölgelerinde hatalı okumalar görülebilmesine rağmen diğer yöntemlere göre çok daha hızlı dizi analizi yapabilmektedir (130). Dizileme teknolojilerinin kuşaklara ayrılması konusunda büyük tartışmalar bulunmaktadır. Üçüncü nesil dizileme teknolojiler arasında HeliScope® (Helicos BioSciences Inc.), PacBio® (Pacific Biosciences Inc.) ve Oxford Nanopore şirketi tarafından piyasaya sürülen MinION®, PromethION® ve SmidgION® teknolojileri yer almaktadır. Tek molekül dizileme (Single Molecule Sequencing) ve gerçek zamanlı dizileme üçüncü nesil dizileme sistemlerini daha önceki nesillerden ayıran basit farklardır. Üçüncü nesil dizileme ayrıca daha önceki teknolojilerden farklı olarak DNA amplifikasyonuna ihtiyaç duymamaktadır (125).

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), çeşitli mikroorganizmalar ve konvansiyonel yöntemlerle birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilemeyen tür komplekslerinin tanımlanmasında kullanılan hızlı ve doğru sonuç veren proteomik temelli yeni bir yöntemdir. Bu yöntemin ilk aşamasında kültür ortamında saf halde üretilen izolatların, kullanılan lazer dalga boyunda optimal absorpsiyona imkân sağlayan çeşitli asit çözeltileri içeren matriks solüsyonuyla plak yüzeyinde karıştırılarak kristalize forma dönüşmesi gerekmektedir. Daha sonraki aşamalarda lazer ışınlarıyla iyonizasyon sonucu oluşan ısı enerjisi etkisiyle buharlaşarak gaz fazına geçen matriks/biyopolimer kompleksi içerisindeki moleküller

(protein, peptit, şeker), zayıf asidik koşullara sahip matriks ortamından $[H^+]$ iyonları olarak yüklü parçacıklar şeklinde plak yüzeyinden ayrılmaktadır. Serbest haldeki parçacıkların elektromanyetik alanda hızlandırıldıktan sonra detektöre ulaşınca kadar uçuş tüpünde geçirdikleri zamana göre kütle ağırlıkları tespit edilmektedir. Dezorbsiyon sonucu açığa çıkan parçacıklar tek değerliğe sahip yük bulundurduğundan elde edilen pikler esas olarak kütleyle bağlı olmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntüler, sistem veri tabanındaki uyum düzeyine göre cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir.

MALDI-TOF MS yönteminin maya türlerini tanımlamadaki başarısı, özellikle *Candida* cinsi içerisindeki türlerde daha yüksek olmak üzere %85-100 arasında değişmektedir (131). Guitard ve arkadaşlarının ITS1-ITS2, 28S rDNA'da bulunan D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgeleri hedeflenerek gerçekleştirilen dizi analizi ile MALDI-TOF MS yöntemlerinin *Pichia captophila* kladındaki yakın ilişkili türlerin kesin olarak ayırımına ilişkin performanslarını değerlendirdiği bir çalışmada; bu türlerin kesin olarak ayırımında MALDI-TOF MS ve EF-1 alfa gen bölgesine spesifik primerlerle gerçekleştirilen dizi analizi yöntemlerinin daha üstün olduğu belirtilmiştir (33).

2.6. Antifungal Duyarlılık Testleri

İnvaziv kandidoz tanısı doğrulandıktan sonra, tanımlanan türlerin antifungal duyarlılık profillerini tespit etmek çok önemlidir. İntrensek (primer) direnç doğru bir tür tanımlaması ile tespit edilebilirken, sekonder direncin tanımlanmasında; standart prosedürlere uygun olarak gerçekleştirilen in vitro antifungal duyarlılık testleriyle elde edilen her bir türe ilişkin epidemiyolojik eşik değerleri ve klinik sınır değerlerin bilinmesine gereksinim bulunmaktadır. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ve EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) gibi kuruluşlar tarafından klinik örneklerden yaygın olarak saptanan türlerde kazanılmış direncin varlığına ilişkin ECV değerleri ile tedaviye yanıtın öngörülmesi açısından türlere özgü klinik sınır değerler CBP (Clinical breakpoint) belirlenmektedir. Bununla birlikte bu değerlerin güncellenmesi amacıyla, mevcut antifungal duyarlılık testlerindeki prosedürlere ilişkin çeşitli referans standartlar geliştirilmektedir (132, 133).

2.6.1. Standart sıvı dilüsyon test yöntemleri

Candida türlerinin antifungal ajanlara duyarlılığının test edilmesinde kullanılan ve uluslararası referans kabul edilen iki adet sıvı dilüsyon test yöntemi bulunmaktadır.

Bu yöntemlerin esası, mayaların üremesini inhibe eden en düşük antifungal ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanan minimum inhibitör konsantrasyon değerinin saptanması temeline dayanmaktadır. Antifungal duyarlılık test yöntemlerinin standardizasyonu için NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)'nin antifungal duyarlılık testleri alt komitesi tarafından 1982 yılından beri çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda ilk olarak yayınlanan M27-P rehber dökümanında *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için gerçekleştirilecek antifungal duyarlılık testlerinde sıvı makrodilüsyon yöntemi önerilmiştir. Bununla birlikte; M27-T ve M27-A rehber dökümanlarında antifungal duyarlılıkların belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon test yönteminin sıvı makrodilüsyon yöntemine alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Günümüzde sıvı mikrodilüsyon test yöntemi, antifungal duyarlılık testlerinde yaygın olarak kullanılan referans yöntem olup; bu yöntemin uygulanmasına ilişkin güncel standart yaklaşımlar CLSI M60-Ed2 ve EUCAST E-Def 7.3.2 rehber dökümanlarında açıklanmıştır. CLSI rehberine göre MİK sonlanım noktasının belirlenmesi “U” tabanlı mikropklarda, kontrol kuyucuğundaki üremeyle antifungallerin olduğu diğer kuyucukların görsel olarak karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilirken; EUCAST rehberinde ise düz tabanlı mikropklarda ve spektrofotometrik olarak; kontrol kuyucuğunda ölçülen optik yoğunluğun diğer kuyucuklarla karşılaştırılması sonucu objektif olarak gerçekleştirilmektedir. Azoller, ekinokandinler ve 5-florositozin için MİK değerleri, her iki rehberde de belirgin üreme inhibisyonunun saptandığı en düşük antifungal ilaç konsantrasyonu (üreme kontrol kuyucuğu ile karşılaştırıldığında $\geq$ %50 inhibisyon) olarak; amfoterisin B için ise CLSI standardı temel alındığında görsel olarak tamamen üreme inhibisyonunun gözlemlendiği en düşük ilaç konsantrasyonu, EUCAST standardı temel alındığında spektrofotometrik olarak % 90 veya % 100 üreme inhibisyonunun gerçekleştiği en düşük antifungal ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (132, 133).

2.6.2. Alternatif antifungal duyarlılık test yöntemleri

2.6.2.1. Kolorimetrik temelli dilüsyon yöntemleri

Kolorimetrik belirteçler veya floresan boyalar, MİK sonlanım noktalarının belirlenmesini kolaylaştırabilmektedir. Ticari [Sensititre™ YeastOne™ YO9 AST Plate (Termo Fisher Scientific™) ve Fungitest® (Bio-Rad) vb.] ve ticari olmayan (tetrazolium tuzu ve substrat alım indikatörleri vb.) yöntemler, antifungal duyarlılık testleri için uyarlanmıştır. Sensititre™ YeastOne™ YO9 AST plate (Termo Fisher

Scientific™) test yöntemi, CLSI tarafından önerilen referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile benzer özelliklere sahip kolorimetrik temelli bir sıvı mikrodilüsyon yöntemi olup, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. Bu yöntemde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları için kolorimetrik indikatör olarak alamar mavisi kullanılmaktadır. Üreme olmayan kuyucukların rengi mavi olarak kalırken; pembe renk oluşan kuyucuklar üremeyi, mor renkli kuyucuklar ise parsiyel (kısmi) inhibisyonu göstermektedir (134).

2.6.2.2. Vitek 2 YST ID (BioMérieux) otomatize maya duyarlılık test yöntemi

Vitek 2 YST (BioMérieux) spektrofotometrik analize dayanan ve kart içerisindeki kuyucuklarda test edilen antifungallerin ikişer katlı seri dilüsyonlarının bulunduğu ticari bir maya duyarlılık test yöntemidir. Bu testin, çoğu *Candida* türünde CLSI tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle; amfoterisin B, 5- flusitozin, flukonazol ve vorikonazol gibi antifungaller için tutarlı, tekrarlanabilir, hızlı ve doğru sonuçlar verdiği gösterilmiştir (135).

HCV ile ilişkili hepatoselüler karsinom nedeniyle karaciğer nakli yapılan 47 yaşındaki bir erkek hastada *C. norvegensis*'e bağlı gelişen nozokomiyal invaziv kandidoz olgusunun bildirildiği bir çalışmada hem safra hem de kan kültürlerinden elde edilen izolatların flukonazol ve vorikonazole duyarlılıkları VITEK 2 YST (BioMérieux) ticari otomatize duyarlılık sistemiyle test edilmiş. İzolatların MİK değerleri sırasıyla 8 µg/ml ve 0,25 µg/ml olarak belirlenmiştir (136).

2.6.2.3. Gradient strip (E® test, BioMérieux) test yöntemi

Bu test yöntemi, belirli bir konsantrasyon aralığında plastik, inert şeritlere emdirilmiş olan antimikrobiyal ajanların agar yüzeyine gradient (kademeli) biçimde difüze olması prensibine dayanmaktadır. E® test (BioMérieux, Fransa), ilk üretilen antifungal gradient strip testi olduğu için günümüzde gradient strip test yöntemi yerine çoğunlukla E-test yöntemi ifadesi kullanılmaktadır (137).

Candida norvegensis izolatlarının amfoterisin B, 5-florositozin ve flukonazole duyarlılıklarının kolorimetrik temelli sıvı mikrodilüsyon ve E® test yöntemleri kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada; her iki yöntemle elde edilen MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerinin ± 2 dilüsyon aralığında %100 uyumlu olduğu belirlenmiştir (15).

2.7. *Candida norvegensis* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar

İnvaziv kandidozdan sorumlu *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin insidansı giderek artmaktadır. Azol türevlerine dirençli *Candida* türlerinin artması ve özellikle profilaksi ve tedavi amacıyla yaygın kullanılan flukonazole karşı direnç gelişmesi, invaziv kandidiyazisli olguların tedavisinde başvurulacak ilaç tercihini sınırlamaktadır. Bu nedenle, bu enfeksiyonların tedavisi için diğer azoller (Vorikonazol ve posakonazol), polyen makrolidler (Amfoterisin B) ve ekinokandinler gibi diğer antifungal ajanların kullanımı tercih edilmektedir (138-140).

2.7.1. Polyen makrolid sınıfı antifungal ilaçlar

Amfoterisin B: Lipofilik bir molekül olan amfoterisin B, mantar hücre membranındaki önemli bir yapısal bileşen olan ergosterole bağlanarak membran bütünlüğünü bozmakta; sonuçta membranın seçici geçirgen özelliğini değiştirmektedir. Günümüzde amfoterisin B'nin 1960'lı yıllardan beri sistemik antifungal tedavide kullanılan deoksikolat formu ve iki adet lipid formülasyonu (Amfoterisin B lipid kompleksi ve lipozomal amfoterisin B) bulunmaktadır. *Candida* türlerine karşı lipozomal amfoterisin B, deoksikolat formu ile aynı antifungal etki spektrumuna sahiptir ancak; günlük doz şemaları ve toksisite profilleri her biri için farklıdır. Lipozomal amfoterisin B'nin deoksikolat formuna göre en önemli avantajı, nefrotoksisite riskinin düşük olmasıdır. İnsanlarda nadir bir enfeksiyon etkeni olarak tanımlanması nedeniyle *C. norvegensis* enfeksiyonlarının tedavisinde kanıt düzeyi çok düşük olmasına rağmen amfoterisin B'nin kullanımı tercih edilmektedir (22). Yapılan bir çalışmada, iskemik kolit nedeniyle genişletilmiş sol hemikolektomi uygulanan ve postoperatif çeşitli komplikasyonlara bağlı tekrarlanan laparotomi operasyonları geçiren 76 yaşındaki kadın hastada *C. norvegensis* ile ilişkili Gore-Tex mesh enfeksiyonu ve intraabdominal apse formasyonunun relaparotomi ihtiyacı olmadan sistemik lipozomal amfoterisin B uygulaması ve enfekte meshin çıkarılmasıyla başarılı bir şekilde tedavi edildiği bildirilmiştir (141).

Nistatin: Gastrointestinal sistemden emilmediği için topikal preparatları bulunan, bu nedenle mukokutanöz kandidiyazisin çeşitli formlarının tedavisinde kullanılan bir antifungaldir. Oral kandidiyazisin tedavisinde referans olarak kabul edilmesine rağmen, suda çözünürlüğü zayıf olduğundan oral mukozada düzensiz bir biyoyararlanım göstermektedir. Bununla birlikte 2021 yılında yapılan bir çalışmada, nistatin süspansiyonunun fizikokimyasal özelliklerinde değişiklik sonucu (hiperosmotik bir

taşıyıcı olan maltodekstrin ile solid dispersiyon) referans süspansiyona göre *C. albicans* biyofilm aktivitesinde %80'den fazla azalma saptandığı bildirilmiştir (142).

2.7.2. Azol grubu antifungal ilaçlar

Azol türevleri, ergosterol biyosentezini etkileyerek mantar hücre membranının bütünlüğünü bozmaktadır. Ergosterol biyosentezinde önemli bir enzim olan lanosterol 14- α sterol demetilaz enzimini inhibe eder. Ekinokandinler kan-beyin bariyerini yeterince geçemediği ve idrarda yeterli konsantrasyonlara ulaşamadığı için; endoftalmit, menenjit ve idrar yolu kandidiyazisi gibi spesifik klinik durumlarda azol grubu antifungal ilaçlar tercih edilmektedir (124).

Flukonazol: Oral veya intravenöz uygulamaya uygun olan suda çözünebilir bir triazoldür. Flukonazol, sistemik kullanım için tüm azol grubu antifungaller arasında en dar etki spektrumuna sahip ilaçtır. Ekinokandinler, flukonazole dirençli *Candida* türlerine bağlı gelişen ciddi sistemik kandidiyazisli olguların sayısındaki artış sonucu, maya enfeksiyonlarının tedavisine ilişkin onay aldığı 2003 yılından bu yana kandideminin ilk basamak tedavisinde kullanılmaktadır.

Ketakonazol: Sistemik olarak da uygulanabilen imidazol türevi olan ketakonazolün günümüzde başlıca kullanımı topikal bir antifungal olarak uygulanmasıdır (143). Bununla birlikte, kronik mukokutanöz kandidiyazisin uzun süreli tedavisinde oral formülasyonu kullanılabilir. Terapötik seviyelerde fungisidal etki göstermemektedir (144).

Posakonazol: Posakonazol, ikinci jenerasyon geniş antifungal etki spektrumu gösteren ve itraconazolün hidroksillenmiş türevi olan bir triazol bileşiğidir. Sitokrom P450 bağımlı 14-alfa demetilaz (CYP51) enzimini etkileyerek ergosterol biyosentezini inhibe etmekte, hücre içerisinde toksik yapılı metilsterol birikimi sonucu mantar hücre membranı hasara uğramaktadır. *Candida* türlerine karşı in vitro aktivitesi vorikonazol ile benzerlik gösterir, ancak invaziv kandidoz tedavisi için klinik veriler yetersizdir (144).

Vorikonazol: Vorikonazol, oral veya intravenöz uygulanabilir ikinci jenerasyon geniş spektrumlu bir triazol bileşiğidir. Kimyasal yapısı flukonazole benzerdir. İnvaziv kandidoz için etkilidir, ancak rutin kullanımda rolü sınırlıdır.

İtraconazol: Genellikle mukokutanöz ve özofagiyal kandidiyazisli hastalarda flukonazol tedavisiyle başarısızlık olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Uzun yarılanma ömrü nedeniyle günde tek doz şeklinde kullanılabilir. Büyük oranda karaciğerden metabolize olup, idrar ve dışkı ile atılmaktadır. İtraconazol,

dermatofitozlar, onikomikoz, pitriyazis versikolor ve kandidiyazisin mukozal ve kutanöz formları dahil olmak üzere çeşitli yüzeyel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (143, 144).

İsavukonazol: İsavukonazol; geçtiğimiz on yıl içerisinde onaylanmış ve *Candida* türleri, çoğu *Aspergillus* türü, *C. neoformans*, *Candida* dışındaki diğer maya türleri, *Scedosporium apiospermium*, dimorfik ve esmer-kahverengi (dematiaceous) küflerle yakın zamanda özellikle metilprednizolon enjeksiyonu sonrası gelişen fungal menenjit epidemisi sırasında saptanan, önceden genellikle keratit ve kutanöz enfeksiyonlara yol açtığı bildirilen, klinik önemi yeni ortaya konan bir tür *Exserohilum rostratum* gibi nadir rastlanan küflere karşı in vitro antifungal aktivite göstermektedir. *Mucorales* takımında bulunan çeşitli türlere karşı ise değişen düzeylerde in vitro antifungal aktivite sergilemektedir (145, 146).

14- α lanosterol demetilaz (CYP51) enzim inhibisyonu ile ergosterol biyosentezini bozarak fungal hücre membranına toksik sterollerin birikmesine neden olmaktadır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlandığı için idrarda yeterli konsantrasyonlarda bulunamaması, kandidürinin tedavisinde sorun olmaktadır. BOS'a geçişi düşüktür ve dışkı ile elimine edilmektedir. İsavukonazolün invaziv kandidiyaziste etkinliğinin değerlendirildiği randomize kontrollü, çift kör, faz III uluslararası ACTIVE çalışmasında isavukonazol; IV kaspofungin ve sonrasında oral vorikonazol ardışık tedavi rejimi ile klinik ve mikrobiyolojik yanıt açısından karşılaştırılmış. Çalışma sonunda isavukonazol uygulanan tedavi grubundaki klinik ve mikrobiyolojik yanıt oranı diğer gruba nazaran daha düşük (%60,3-71,1) bulunmuştur (147).

2.7.3. Ekinokandinler

Ekinokandinler, mantar hücre duvarını hedef alan yeni bir semi-sentetik lipopeptid yapılı antifungal ilaç sınıfıdır. β (1,3)-D-glukan sentaz enzimini inhibe ederek mantar hücre duvarı sentezini bozmaktadır. ESCMID sistemik kandidiyazisli hastalar, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği de 2016 yılında yayımlandığı rehberde hem nötropenik hem de nötropenik olmayan hastalarda gelişen kandidemiler için birinci basamak tedavide ekinokandinleri önermektedir. Ayrıca; YBÜ'de yatan, nötropenik olmayan hastalardaki şüpheli invaziv kandidoz [İntraabdominal (karın içi) kandidoz de dahil] olgularında da ampirik tedavi seçeneği olarak önerilmektedir (148).

Orta-ciddi seyirli sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış üç ekinokandin bulunmaktadır: kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin. Yüksek moleküler ağırlıkları ve düşük oral biyoyararlanımlarından dolayı

sadece IV (Intravenöz) preparatları mevcut olan bu ilaçlar, nadir ortaya çıkan ilaç etkileşimleri ve *Candida* türleri arasında bu ajanlara karşı direnç gelişiminin yaygın olmaması nedeniyle klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ekinokandinler birçok *Candida* türüne karşı önemli bir fungisidal aktivite göstermektedir; bu ajanların her biri randomize karşılaştırmalı klinik çalışmalarda hastaların yaklaşık %70-75'inde klinik başarı sağladığı bildirilmiştir (149).

Kasprofungin: İlk kullanılan ve ekinokandinler sınıfını temsil eden bir antifungal olup, ABD'de özofageal kandidoz, kandidemi ve bazı invaziv kandidoz formlarının (abdominal apseler, peritonit ve plevral boşluk enfeksiyonları) tedavisi ve febril nötropenik hastalarda görülebilen potansiyel mantar enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (143).

Anidulafungin: Geniş spektrumlu bir ekinokandin olup, ABD'de özofageal kandidoz, kandidemi ve bazı invaziv kandidoz formlarında (abdominal apseler ve peritonit) kullanım için onaylanmıştır. Bununla birlikte, nötropenik ve *Candida krusei* de dahil olmak üzere diğer *Candida albicans* dışı *Candida* türlerine bağlı gelişen özellikle derin yerleşimli doku enfeksiyonları olan hastalarda kullanımına ilişkin etkinlik verileri sınırlıdır. *C. albicans* ve *Candida albicans* dışı *Candida* türlerine bağlı kültürle doğrulanmış kandidemi ile invaziv kandidoz (kandidemi görülen veya görülmeyen) gelişen 539 hastada (iki hastada *C. norvegensis* ile ilişkili) en az bir doz IV anidulafungin tedavisinin etkinliğinin araştırıldığı klinik çalışmaların havuzlanmış analizinde; medyan 10 günlük IV anidulafungin tedavi süresi sonucunda hastalar toplu olarak değerlendirildiğinde klinik ve mikrobiyolojik yanıt düzeyleri sırasıyla %80,3 ve %82,4 olarak tespit edilmiş. Nötropenik ve derin yerleşimli doku enfeksiyonları olan hastalar tek başına ele alındığında, total (klinik ve mikrobiyolojik) tedavi başarısı sırasıyla %56,5 ve %79,1 olduğu; bu enfeksiyonlardan izole edilen bir veya daha fazla sayıda *Candida albicans* dışı *Candida* türlerine karşı etkinliğin ise %66,7-75,8 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (148).

Mikafungin: Pediatrik ve genç erişkin hastalarda görülen *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarının tedavi ve profilaksisinde kullanılır. Mikafungin, ABD ve Avrupa Birliği'nde HSCT (Haematopoietic stem cell transplantation) alıcılarındaki *Candida* enfeksiyonlarının profilaktik tedavisinde kullanım onayı almıştır (143).

2.7.4. Hücre döngüsü ve nükleik asit sentezinde inhibisyona neden olan diğer antifungaller

Griseofulvin: Mikrotübül proteinlerine bağlanarak mantar hücresinin mitoz bölünmesini inhibe eden fungostatik bir ilaçtır. Kullanım güçlüğü ve yan etkilerinden dolayı günümüzde fazla tercih edilmemektedir.

Flusitozin (5-florositozin): Flor içeren sentetik bir sitozin analogudur ve antimetabolit görevi gören mevcut tek antifungal ajandır. Flusitozin ve aktif metaboliti fluorodeoksiüridin monofosfat, pirimidin metabolizmasını bozarak duyarlı mantar hücrelerinde DNA, RNA ve protein sentezini inhibe eder. Flusitozin ve amfoterisin B kombinasyonunun, sinerjistik antifungal aktivitesi bulunmaktadır (143).

2.8. Moleküler Epidemiyolojide Temel Prensipler

Moleküler epidemiyoloji; klinik örnekler ve çevresel kaynaklardan soyutlanan çeşitli etkenlerin moleküler ve biyokimyasal düzeyde tanımlanması, enfeksiyon hastalıklarının teşhisi ve patogeneze rol oynayan gen bölgelerinin tespit edilmesi, genetik ve çevresel risk faktörlerinin belirlenmesi ve enfeksiyonların toplum içinde yayılmasını önlemek için çalışmalar yapan bilim dalıdır. Moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesiyle enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Moleküler epidemiyolojik tanı yöntemlerinin amaçları şunlardır:

1. Hastaların epidemiyolojik açıdan birbirleriyle ilişkisinin belirlenmesi
 2. Relaps (nüks), re-aktivasyon ve re-enfeksiyon durumlarının tespiti
 3. Salgın çalışmalarında, olası kaynak ve bulaş yollarına ilişkin verilerin tespit edilmesi
 4. Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ayırt edilmesi
 5. Antimikrobiyal dirençten sorumlu çeşitli gen bölgeleri hedeflenerek gerçekleştirilen tanımlama yöntemleri ile dirençli izolatların tayini ve dağılımlarının belirlenmesi
 6. Epidemiyolojik surveyans ve enfeksiyon kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi.
- Mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, antifungal ajanlara direncin saptanması ve enfeksiyon patogeneziinde yer alan faktörlerin araştırılmasında çeşitli moleküler test yöntemleri kullanılmaktadır.

Moleküler Mikoloji laboratuvarında kullanılabilen yöntemler şu şekilde sıralanabilir (117):

- 1. Prob hibridizasyonuna dayalı yöntemler**
 - a. Southern Blot Hibridizasyon**
 - b. Northern Blot Hibridizasyon**
 - c. Dot Blot Hibridizasyon**
 - d. In situ Hibridizasyon**
- 2. Genomik DNA'daki kompozisyon farklılığına dayalı yöntemler**
 - a. PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)**
 - b. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**
 - c. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)**
 - d. Heterodupleks analizi**
- 3. Hedef gen bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı yöntemler**
 - a. PCR (Polymerase Chain Reaction),**
 - a.1. Nested PCR,**
 - a.2. Multipleks PCR,**
 - a.3. RT-PCR (Reverse transcription-PCR),**
 - a.4. Real time PCR,**

PCR ürünlerinin saptanmasına yönelik:
PCR-RFLP, PCR-EIA, PCR-dizi analizi

 - b. RAPD (Randomly Amplification of Polymorphic DNA)**
 - c. MLST (Multi Locus Sequence Typing)**
 - d. NASBA (Nükleik Acid Sequence-Based Amplification).**

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri bünyesindeki poliklinik, klinik bölümler ile YBÜ (Yoğun bakım üniteleri)'de takip edilen ve fungal enfeksiyon şüphesiyle Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'na mikrobiyolojik tanımlama amacıyla gönderilen çeşitli klinik örneklerin elde edildiği hastalara ait Hastane Bilgi Yönetim Sistemi'nde bulunan demografik verilerin retrospektif olarak incelenmesi; bu örneklerden izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle *Candida norvegensis* olarak tanımlanan izolatların ek fenotipik testlerle (eskülin hidroliz aktivitesi) birlikte moleküler yöntemlerle yeniden tanımlanması, moleküler epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi, Virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık paternlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1. Klinik Örnek Türleri

Çalışmaya Ocak 2015-Temmuz 2021 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde ayaktan veya yatarak tedavi gören hastalardan alınan 40 klinik örnek dahil edildi. Klinik örnek türleri içerisinde BAL (Bronkoalveolar lavaj), balgam, safra, idrar, ETA (Endotrakeal aspirat), kan, doku örneği, dışkı, intraabdominal mayi ve vajinal akıntı gibi invaziv ve non invaziv tekniklerle elde edilen çeşitli örnekler yer aldı.

3.2. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi (Direkt/Boyalı)

Laboratuvara gelen klinik örneklerden SF ile lam-lamel arası preparat hazırlandı ve mantar elemanı varlığı (blastokonidi, psöдохif) açısından ışık mikroskopunda düşük

büyütmeli objektifler (10X, 20X) kullanılarak incelendi. Eş zamanlı olarak her bir klinik örnek, temiz bir lam üzerine alınarak havada kurutuldu ve sonrasında metil alkolle tespit edildi. Hazırlanan bu preparatlar Gram boyama yöntemiyle boyanarak Gram pozitif boyanmış blastokonidiler ve/veya psödohif varlığı açısından ışık mikroskopunda immersiyon objektifi (100X) kullanılarak değerlendirildi.

3.3. Primer İzolasyon

Direkt ve/veya Gram boyalı mikroskopik inceleme sonucu mantar elemanı görülen veya görülemeyen bütün klinik örneklerdeki muhtemel maya izolatlarının primer izolasyonu amacıyla içerisinde SDA (Sabouraud dekstroza agar, Conda, İspanya) besiyeri bulunan 11*16 cm boyutundaki cam tüplere ekim yapıldı. Her bir klinik örnek; herhangi bir antibiyotik içermeyen bir adet, %0,05 oranında kloramfenikol içeren iki adet ve %0,05 oranında kloramfenikolle birlikte %0,4 oranında sikloheksimid içeren bir adet olmak üzere toplam dört adet SDA besiyerine ekildikten sonra; kloramfenikol içeren SDA besiyerlerinden biri 37°C'lik etüve, diğer tüpler ise 25°C'lik etüve konularak inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri üreme yönünden günlük olarak değerlendirildi. Üreme saptanan tüplerden SDA besiyeri içeren petri kaplarına tek koloni ekim şeklinde subkültür (pasaj) yapıldı.

Çalışmada kalite kontrol suşları olarak; fosfolipaz, salgısal aspartil proteinaz ve esteraz enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi için *Candida albicans* ATCC 90028 referans suşu (150); modifiye mikropalak (MMP) yöntemiyle biyofilm formasyonu ve eskülin hidrolaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için ise *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşu kullanıldı (151).

3.4. İzolatların Rutinde Kullanılan Konvansiyonel Yöntemlerle Tanımlanması

Çalışmadaki izolatlar; petri SDA besiyerlerindeki koloni görünimleri, germ tüp (çimlenme borusu) varlığı, mısır unlu-Tween 80 (Becton Dickinson, Sparks, ABD) agar besiyeri kullanılarak hazırlanan lam kültür düzeneğindeki mikroskopik morfolojileri, CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, Fransa) kromojenik besiyerinde oluşturdukları koloni renk ve morfolojileri, üreaz enzim aktiviteleri ve API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari tanımlama kiti ile çeşitli karbonhidratları fermentasyon/asimilasyon kabiliyetleri gibi fenotipik özellikler kullanılarak tanımlandı.

3.4.1. Kültür için genel kullanım besiyerleri

Sabouraud dekstroza agar (SDA, Conda, İspanya) besiyeri

Klinik örneklerdeki maya izolatlarının üretilmesi amacıyla; bileşiminde 40 gram dekstroza, 10 gram hayvan dokusunun peptik enzimler ve kazeinin pankreatik enzimlerle digesti ve 15 gram bakteriyolojik agar ihtiva eden dehidre baz besiyerinden üreticinin talimatları doğrultusunda 65 gram analitik terazide tartıldıktan sonra 1000 ml hacimli cam şişe içerisine aktarıldı. Toz besiyerinde oluşabilecek topaklanmayı engellemek için ilk önce 100 ml distile su eklenerek çözünme sağlandıktan sonra hacim 1000 ml 'ye tamamlandı. Homojen ve şeffaf bir görünüm elde edilinceye kadar manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırılan karışım sterilizasyon için otoklava koyuldu. Otoklavda 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C 'de 15 dakika süresince steril edilen besiyeri, sterilizasyon işlemi sonrasında 45-50°C' ye kadar soğumaya bırakıldı. Konsantrasyonu 50 mg/L olacak şekilde kloramfenikol eklendikten sonra besiyerinin nihai pH'sı $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Karışım, dispenser yardımıyla her biri 90 mm çaplı steril petri kaplarına 25'er ml dağıtıldı. Hazırlanan besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere 2-8°C'de muhafaza edildi.

Mısır unlu-Tween 80 (Becton Dickinson, Sparks, ABD) agar besiyeri

Çalışmadaki izolatların üretilmesi ve karakteristik mikroskopik morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla mısır unlu-Tween 80 (Becton Dickinson, Sparks, ABD) agar besiyeri kullanıldı. Üreticinin talimatlarına göre analitik teraziyle 17 gram ağırlığında tartılan mısır unlu agar baz besiyeri, borosilikat cam şişe içerisine aktarılıp üzerine 1000 ml distile su eklendi. Bu karışıma %1 v/v oranında Tween 80 (Merck, Germany) çözeltisinden 10 ml eklendikten sonra besiyeri otoklava koyularak 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C'de 15 dakika boyunca sterilize edildi. Otoklavdan çıktıktan sonra 45-50°C'ye kadar soğumasına izin verilen besiyeri, dispenser yardımıyla 90 mm çaplı steril petri kaplarına 25'er ml hacimlerde dağıtıldı. Hazırlanan besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere 2-8°C 'de muhafaza edildi.

CHROMagar Candida (CHROMagar Company, Paris, Fransa) kromojenik besiyeri

Çeşitli klinik örnek türlerindeki izolatların doğrudan izolasyonu ve hızlı bir şekilde tanımlanması amacıyla; bileşiminde 10,2 gram pepton, 22 gram kromojenik karışım, 0,5 gram kloramfenikol ve 15 gram agar içeren toz halindeki besiyerinden 47,7 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisine aktarıldı. Manyetik karıştırıcıda tamamen homojen hale gelene dek karıştırılan besiyeri, kaynama noktasına ulaşınca kadar

ısıtıldı. Toz içeriğın tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra 45-50°C'ye kadar soğumasına izin verilen besiyeri, dispenser yardımıyla 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 20'şer ml dağıtıldı. Hazırlanan besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere 2-8°C'de muhafaza edildi.

Urea Agar Base (acc. to Christensen, Himedia, Hindistan) besiyeri

Hayvan dokularının peptik digesti, monopotasyum fosfat, dekstroze, sodyum klorür, fenol kırmızısı ayırıcı ve agar içeren toz halindeki karışımdan 2,45 gram tartıldı. Üzerine 95 ml distile su ilave edildikten sonra besiyeri içeriğı tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Otoklavda 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C'de 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon sonrası 45-50°C'ye kadar soğuyan besiyerine aseptik koşullarda 50 ml %40'lık üre solüsyonundan (FD048) eklendi ve kuvvetlice karıştırılarak solüsyonun besiyerine homojen dağılması sağlandı. Dispenser ile steril cam tüplere dağıtılan besiyerleri kullanım zamanına kadar 2-8°C'de muhafaza edildi.

Safra Eskülin Agar (Becton Dickenson, ABD) besiyeri

Genelde su ve gıda örneklerinde *Enterococcus* sp., *Streptococcus bovis* ve *S. equines* gibi grup D streptokokların varlığını araştırmak amacıyla kullanılan; bileşimindeki safra tuzları nedeniyle rekabetçi gram pozitif ve bazı gram negatif flora bakterilerinin üremelerini inhibe eden seçici bir besiyeridir. Bileşiminde jelatinin pankreatik digesti 5,0 g/L, sığır eti ekstratı 3,0 g/L, eskülin 1,0 g/L, ferrik (Fe⁺³) amonyum sitrat 0,5 g/L, öküz safrası 20,0 g/L ve bakteriyolojik agar 14,0 g/L olacak şekilde hazırlanan besiyeri karışımı 1000 ml hacimli borosilikat cam şişe içerisine aktarıldı. Üzerine distile su eklenerek hacim 1 litreye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılan besiyeri, daha sonra otoklava yerleştirilerek 15 lbs basınçlı buhar altında 121 °C'de 15 dakika boyunca sterilize edildi. Sterilizasyon işlemi sonrası 45-50°C'ye kadar soğuyan besiyeri, dispenser yardımıyla 7 ml'lik steril cam tüplere dağıtıldı. Yatık bir yüzey elde etmek amacıyla masayla yaklaşık 30 derecelik açı yapacak şekilde eğilerek tel düzeneğe yerleştirilen cam tüpler içerisindeki besiyerleri katılaşmaya bırakıldı. Hazırlanan besiyerleri kullanılıncaya kadar 2-8°C'de muhafaza edildi.

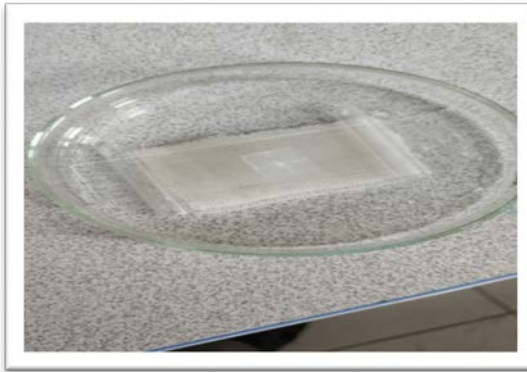
3.4.2. Germ tüp testi

SDA besiyerinde üreyen maya kolonilerinden nikrom öze yardımıyla birkaç koloni alınarak 500 µl tavşan plazması içeren 1.5 ml hacimli ependorf tüplerine inokulasyon yapıldı. Hazırlanan süspansiyon 37°C'de 2-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda

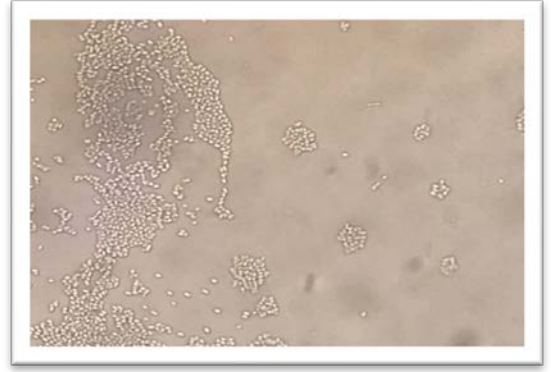
mikropipet yardımıyla bu süspansiyondan bir miktar alınarak temiz bir lamın üzerine damlatıldı. Üzerine hava kabarcığı oluşumuna yol açmadan dikkatlice lamel kapatılarak düşük büyütme (10 X, 20 X) objektifle ışık mikroskopunda incelendi. Ana maya hücresinden boğumlanmadan çıkan ve maya hücresinin yaklaşık 3-4 katı uzunluğunda ve yarısı genişliğinde olan uzantılar germ tüp varlığı açısından pozitif olarak değerlendirildi. Mikroskopik inceleme esnasında germ tüp oluşturan koloniler *C. albicans*/*C. dubliniensis*, oluşturmayanlar ise *Candida albicans* dışı *Candida* türleri olarak değerlendirildi.

3.4.3. Mısır unlu-Tween 80 agarda mikroskopik morfolojinin değerlendirilmesi

SDA besiyerinde saf halde üreyen kolonilerden iğne uçlu nikrom öze yardımıyla tek düşmüş birkaç koloni alınarak kare şeklinde, 10*10 mm ebatlarda hazırlanan ve temiz bir lam üzerine yerleştirilen mısır unlu-Tween 80 agar besiyerinin dört kenarına Dalmau plak kültür tekniği kullanılarak çizgi ekim yapıldı. Agar blok yöntemi olarak da isimlendirilen bu düzenek U veya V şekilli küçük cam boruların üzerine konuldu ve mayaların üremesi için gereken nemli ortamın sağlanması amacıyla cam petri kabının altına steril distile suyla ıslatılmış steril bir sargı bezi yerleştirildi. Maya kolonilerinin besiyerlerine inokulasyonu yapıldıktan sonra inokulum çizgilerini de içerecek şekilde temiz bir lamelle üzeri kapatılan besiyerleri, (Şekil 3.1) 25°C’de 48-72 saat süre boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda düşük büyütme objektifle ışık mikroskopunda kolonilerin mikroskopik morfolojileri incelendi. Tomurcuklanan yuvarlak-oval şekle sahip maya hücreleri (blastokonidi) ve az miktarda psöдохif yapısı varlığı *Candida norvegensis* lehine değerlendirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Agar blok yöntemiyle hazırlanan lam kültür düzeneği (Çalışmadan)



Şekil 3.2. İzolatların mısır unlu-Tween 80 agardaki mikroskopik görünümü (Çalışmadan, 40X)

3.4.4. İzolatların CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) kromojenik besiyeri kullanılarak tanımlanması

CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, France) besiyeri, koloni rengi ve morfolojisine dayalı olarak başlıca *C. albicans* (yeşil renkli koloni), *C. krusei* (soluk pembe renkli koloni) ve *C. tropicalis* (metalik mavi renkli koloni) türlerinin tanımlanmasında kullanılan ayırt edici kromojenik bir besiyeridir. SDA besiyerinde üreyen saf haldeki kolonilerden öze yardımıyla iki-üç koloni alınarak CHROMagar *Candida* kromojenik besiyerine pasajlandı. Petriler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda koloniler renk oluşumu ve morfolojik görünüm yönünden üretici firmanın talimatları göz önünde bulundurularak değerlendirildi. İzolatların CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company) besiyerindeki koloni renk ve morfolojileri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Çalışmadaki izolatlara ait CHROMagar *Candida* besiyerindeki yassı, soluk kenarlı ve beyaz, pembe-lavanta renkli kolonilerin görünümü

3.4.5. API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari tanımlama kiti kullanılarak karbonhidrat fermentasyon/asimilasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

Çalışmadaki fungal izolatların fenotipik olarak tanımlanmasında API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari tanımlama kiti kullanıldı. API 20C AUX test stribinde 20 adet mikroskobik boyutta kuyucuk bulunmaktadır. Bu kuyucukların ilki herhangi bir substrat içermeyen üreme kontrol kuyucuğu; geri kalan 19 kuyucuk ise her biri dehidrate formda farklı karbonhidrat yapısındaki substratları içeren ve fermentasyon/asimilasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği test kuyucukları olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tanımlanmak istenen izolatın hif/psödohif oluşturma özelliği de değerlendirme cetvelinde yer almaktadır. SDA besiyerinde üremiş maya

kolonilerinden steril bir aplikatör yardımıyla birkaç koloni alınarak kit içerisinde yer alan API Suspension Medium (2 ml) içerisine karıştırıldı. Üreticinin önerileri doğrultusunda 2 McFarland bulanıklığa eşdeğer bir maya süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan mikropipet yardımıyla 100µl alınarak kit içerisinde yer alan API C Medium (7 mL) içine aktarıldı. Homojenizasyon amacıyla 10-15 sn. vortekslenen süspansiyondan mikropipet yardımıyla 300 µL alınarak küpül dışına taşırmadan ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek küpüller dolduruldu. Buharlaşıma ve çevresel kontaminasyonu önlemek amacıyla sribin üzeri kapak ile kapatılarak 48 saat süreyle $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Maya hücrelerinin fermentasyon ile karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanıp üremesi sonucunda kuyucuklarda bulanıklık oluştu. Test edilen karbonhidratları içeren kuyucuklardaki bulanıklık derecesi, üreme kontrol kuyucuğu ile karşılaştırılarak kontrol kuyucuğuna eşit veya daha fazla bulanıklık oluşumu gözlenen kuyucuklar ilgili karbonhidratın asimilasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. Glukoz içeren kuyucukta belirgin bir üreme olmadığı durumda inkübasyon süresi 72 saate kadar uzatıldı. Değerlendirme işlemi, okuma cetveli üzerinde yazan her bir karbonhidrat için strip üzerinde o karbonhidrata karşılık gelen kuyucukta bulanıklık olup olmamasına ve hif/psödohif varlığına göre gerçekleştirildi. Pozitif sonuçlar için substratların altında yer alan numaralar ilgili kutucuklara yazılarak üçlü gruplar şeklinde toplama yapıldı. Sonuçta sekiz basamaklı sayısal bir değer elde edildi. Elde edilen sayısal değerler çevrimiçi bakteri ve maya tanımlama veri tabanı olan Apiweb™ (BioMérieux, Fransa) yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Çalışmadaki izolatların API 20C AUX (BioMérieux) ticari tanımlama kiti kullanılarak gerçekleştirilen karbonhidrat fermentasyon/asimilasyon reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Çalışmadaki izolatların API 20C AUX test sribindeki sadece glukoz ve gliserol asimilasyon reaksiyonu

3.4.6. Üreaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi

SDA besiyerinde üreyen saf haldeki maya kolonilerinden nikrom iğne özeyle birkaç koloni alınarak Urea Agar Base (acc. to Christensen, Himedia, Hindistan) besiyerine batırma tekniğiyle ekim yapıldı. 25°C’de 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Üreaz enzim aktivitesine sahip olan kökenler, bir dikarbamid olan üreyi hidroliz ettiğinde karbondioksit (CO₂) ve amonyak (NH₃) açığa çıkar ve alkali bir ürün olan amonyak, besiyeri içindeki fenol kırmızısı ayırıcının rengini kırmızı-pembe renge dönüştürür. Üreaz enzimi olmayan kökenler ise besiyerindeki dekstrozu kullanarak asidik ürünler oluşturur ve besiyeri orijinal rengine kalır. Çalışmadaki izolatlarla ait negatif üreaz aktivitesi aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Çalışmadaki izolatlarla ait negatif üreaz aktivitesi

3.4.7. Eskülin hidrolaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi

SDA besiyerinde saf halde üreyen maya kolonilerinden iğne nikrom öze yardımıyla birkaç koloni alınarak safra eskülin agar besiyerine batırma tekniğiyle ekim yapıldı. 35±2°C’de aerobik atmosferde 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakılan besiyerleri renk değişimi yönünden günlük olarak incelendi. Bu deneyde kumarin türevi glikozid yapılı bir bileşik olan eskülin, eskülin hidrolaz enzimi üreten mikroorganizmalar tarafından glikoz ve eskületin (6,7-dihidroksi-kumarin) moleküllerine ayrılmaktadır. Açığa çıkan eskületin molekülü daha sonra ortamdaki demir tuzlarıyla (ferrik sitrat) reaksiyona girerek koyu kahverengi-siyah renkli fenolik demir kompleksi meydana getirmektedir.

Eskülin hidrolaz

Eskülin + Asit $\longrightarrow$ β -D-glukoz + Eskületin

Eskületin + Fe⁺³ tuzları $\longrightarrow$ Koyu kahverengi-siyah renkli kompleks

Taksonomik çalışmalar neticesinde aynı monofiletik grup içerisinde sınıflandırılan *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türlerinin fenotipik açıdan yüksek benzerlik

göstermeleri nedeniyle rutin biyokimyasal yöntemlerle tür düzeyinde ayrımı çoğu zaman doğru bir şekilde yapılamamaktadır. Bu iki tür sadece, her biri için değişkenliği iyi karakterize edilmiş bir fenotipik özellik olan eskülin hidroliz aktivitesine göre güvenilir bir biçimde ayırt edilebilmektedir (33, 103). Eskülin hidroliz aktivitesi *C. norvegensis*'te pozitif, *C. inconspicua*'da negatiftir. Bu çalışmada yer alan ve rutinde kullanılan fenotipik yöntemlerle *C. norvegensis* olarak tanımlanan izolatlar, üretici firma tarafından pozitif reaksiyon varlığının kontrolü için önerilen *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşu ile eş zamanlı olarak eskülin hidroliz aktivitesi yönünden test edildi. Kolonilerin etrafında koyu kahverengi-siyah renkte presipitatların gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Safra eskülin agarda test edilen izolatlara ait negatif reaksiyon (Şekil 3.6) ve *E. faecalis* ATCC 29212 referans suşuna ait pozitif reaksiyon (Şekil 3.7) aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Safra eskülin agarda test edilen izolatlara ait negatif eskülin hidroliz aktivitesi (Çalışmadan)



Şekil 3.6 Safra eskülin agarda *E. faecalis* ATCC 29212 referans suşuna ait pozitif reaksiyon (Çalışmadan)

3.5. İzolatların Saklanması

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan izolatlar, sonraki araştırmalarda kullanılmak üzere %15 oranında gliserol içeren boncuklu kriyovial tüplere konularak derin dondurucuda -20°C'de saklandı. Her bir analitik prosedür için derin dondurucudan çıkarılarak canlandırılan 24-48 saatlik taze kültürler kullanıldı.

3.6. Konvansiyonel Yöntemlerle *C. norvegensis* Olarak Tanımlanan Suşların Moleküler Yöntemlerle Yeniden Tanımlanması

Klinik örneklerden izole edilen ve fenotipik testlerle *C. norvegensis* olarak tanımlanan suşların ITS1-5,8S-ITS2, D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgelerine spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonu ve DNA dizi analizi, özel bir laboratuvarda (Atlas Biyoteknoloji Lab, Ankara, Türkiye) gerçekleştirildi.

3.6.1. DNA ekstraksiyonu (izolasyonu)

Geneall® Exgene Plant SV (Katalog no:107-101, GeneAll Biotechnology Co.) DNA izolasyon ve pürifikasyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda genomik DNA ekstraksiyonu (izolasyonu) yapıldı. Ekstraksiyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Elli gram mantar kolonisi sıvı nitrojen içerisinde ezilerek 1,5 mililitrelik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2. Üzerine 400 ul Buffer PL ve 4 ul RNaseA (100 mg/ml) eklenerek karıştırıldı.
3. Karışım 65°C’de 10 dk. bekletildikten sonra lizat üzerine 140 ul Buffer PD eklenerek karışım buz üzerinde 5 dk. bekletildi.
4. Ezsep™ filtre üzerine alınan lizat 14000 rpm devirde 2 dk. santrifüj edildi.
5. Santrifüj işlemi sonrasında dipte kalan 400 ul pellet bozulmadan yeni bir tüpe alındı ve üzerine 600 ul Buffer BD eklenerek karıştırıldı.
6. Karışımdan 700 ul alınarak spin kolon içerisinde 8000 rpm devirde 30 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolondan geçen kısım atıldı.
7. Geriye kalan karışım yeniden spin kolon içersine aktararak 8000 rpm devirde 30 sn. boyunca tekrar santrifüj edildi ve kolondan geçen kısım atıldı.
8. Kolon üzerine önce 700 ul Buffer CW eklenerek 8000 rpm devirde 30 saniye, ardından 300 ul Buffer CW eklenerek aynı devirde iki dk. santrifüj edildi.
9. Kolon 1.5 ml hacimli yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 100 ul Buffer AE eklendi. Beş dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 14000 rpm devirde bir dk. santrifüj edildi.
10. Elde edilen 25 µg DNA örneği, PCR reaksiyonu için kullanılıncaya kadar -70°C’de saklandı.

3.6.2. PCR reaksiyonu

Elde edilen her bir kalıp (template) DNA örneğiyle birlikte ITS1-ITS4, D1/D2 NL1-NL4, EF-1 F/R primer dizileri ve WizPure™ PCR 2X Master (Katalog no: W1401, Wizbiosolutions Inc.) kiti kullanılarak Applied Biosystems™ ProFlex (Thermo Fisher

Scientific™, ABD) termal döngü cihazında PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı içerisindeki reaktiflerin miktarları (Tablo 3.1); çoğaltılması hedeflenen gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılacak çift yönlü (forward/reverse) primer dizileri (Şekil 3.8) ve PCR reaksiyonu koşullarına ilişkin bilgiler aşağıda belirtilmiştir (Şekil 3.9).

Tablo 3.1. PCR reaksiyonundaki bileşenler ve reaksiyon karışımındaki miktarları

PCR Reaksiyonundaki Bileşenlerin Miktarı	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR 2X MasterMix	10 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
Template DNA	2 µl
Deiyonize su	7 µl
TOPLAM	20 µl

PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Bilgileri		
Primer Adı	Primer Dizisi	T _m (°C)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	52
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52
D1D2-NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	52
D1D2-NL4	GGTCCGTGTTCAAGACGG	52
EF1-F	GTGTCGGTGAATTCGAAGCTGGTA	52
EF1-R	GGTGGGTATTCACTGAAAGC	52

Şekil 3.5. PCR reaksiyonunda kullanılan forward/reverse primer dizileri (33)

PCR Reaksiyonu Koşulları			
	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	95	5 min.	1
Denature	95	30 sec.	30
Anneal	52	30 sec.	
Extend	72	30 sec.	
Final Extension	72	5 min.	1

Şekil 3.6. PCR reaksiyonu koşulları

3.6.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR reaksiyonu sonucu her üç gen bölgesinden elde edilen PCR ürünleri, dizi analiz işleminde kullanılmak amacıyla ExoSAP-IT Express PCR Clean-Up Reagents (Thermo Fisher Scientific™) kiti ile saflaştırıldı.

PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan bileşenler ve miktarları ile reaksiyon koşulları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.10-11).

PCR Clean-Up Reaksiyonu İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR ürünü	10 µl
ExoSAP-IT	4 µl
TOPLAM	14 µl

Şekil 3.10. PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

PCR Clean-Up Reaksiyonu Koşulları			
Steps	Temp (°C)	Time	Cycle
Incubation1	37	4 min.	1
Incubation2	80	1 min.	1
Cooling	4	-	1

Şekil 3.7. PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan reaksiyon koşulları

3.6.4. Sekans PCR reaksiyonu

Saflaştırılmış PCR ürünlerinden DNA fragmanlarının elde edilmesi amacıyla hedef gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan primer çiftleri, normal nükleotidler ve 3'(OH) grubu bulundurmeyen floresan işaretli zincir sonlandırıcı ddNTP (Dideoksinükleotid trifosfat) molekülleri kullanılarak Applied Biosystems™ ProFlex (Thermo Fisher Scientific™) termal döngü cihazında sekans PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenlerin hacimleri ve reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (Şekil 3.12-13).

DNA Dizileme İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR Ürünü	5 µl
Primer (Forward veya Reverse) (3.2 pmol)	1 µl
Floresan işaretli Dye Terminatör	1 µl
5X Sekans Buffer	4 µl
Su	2 µl
TOPLAM	13 µl

Şekil 3.8. Sekans PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve hacimleri

DNA Dizileme Reaksiyon Koşulları			
	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	95	30 min.	1
Denature	95	10 sec.	30
Anneal	50	5 sec.	
Extend	60	4 min.	
Cooling	4	-	1

Şekil 3.9. Sekans PCR reaksiyonu koşulları

3.6.5. DNA dizileme ürünlerinin saflaştırılması

DNA dizileme ürünlerinin saflaştırma işlemi Sephadex G-50® (MilliporeSigma, ABD) içeren gözenekli yapıdaki boncukların bulunduğu kolonlarda jel filtrasyon metodu kullanılarak aşağıdaki işlem basamaklarına göre gerçekleştirildi:

1. 6 g sephadex tartılarak üzerine 80 ml saf su eklenerek vortekslendi.
2. Kolonlara hazırlanılan Sephadex G-50® solüsyonundan 850 – 900 µl konuldu.
3. 4600 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Kolon işlem için hazır hale getirildi.
4. Sekans PCR ürünlerinin hepsi kolona yüklenerek 4800 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj işlemi sonunda saflaştırılmış dizileme ürünlerini içeren elüat (Ekstraksiyon prosedürüyle elde edilen sıvı çözelti) kullanım zamanına kadar -70°C’de saklandı.

3.6.6. DNA dizi analizi

DNA dizileme ürünlerinin saflaştırma işlemini takiben DNA dizi analizi işlemine geçildi. Dizi analizi kapiller elektroforez yöntemi kullanılarak HITACHI ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Saflaştırılmış dizileme ürünlerinden 20 µl alınarak 96 kuyucuklu mikropiplara dikkatlice yüklendi ve üzerine 5 µl formamid çözeltisi eklenerek kapiller elektroforez işlemi yapıldı. Laser aracılığıyla uyarılan floresan boyalardan ortama salınan ultraviyole ışınlar dedektör tarafından algılanarak cihaz tarafından digital verilere dönüştürüldü. Elde edilen dendrogramlara göre diziler yorumlandı. Elde edilen sekans dizileri “BioEdit” programında “ClustalW” analizi ile hizalandı. Hizalanan dizilerin yaklaşık 50 bazlık ilk ve son dizileri sekans yönteminden kaynaklanabilen kirlilikleri temizlemek amacıyla analiz dışında bırakıldı. Çalışmadaki izolatların tür tayininin yapılması için,

diziler <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> adresindeki “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) programına yüklendi.

3.7. Filogenetik Analiz

ITS1-5.8S-ITS2, 28S rDNA’daki EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda elde edilen diziler arasındaki evrimsel yakınlığın belirlenmesi için neighbour-joining yöntemi kullanıldı. Filogenetik ağaç çiziminde çalışmadaki *C. inconspicua* suşlarıyla birlikte Genbank veri tabanında bulunan *Pichia captophilia* kladı içerisindeki bazı referans suşlar ve dış grup olarak *C. krusei* referans suşuna ait diziler de kullanıldı. Bu yöntemle bahsedilen her bir gen bölgesi için filogenetik ağaç; test edilen suşlar gama dağılımına uyacak şekilde, “bootstrap” değeri 1000 döngü (replication) ve Tamura-Nei modeli seçilerek çizildi.

3.8. Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.8.1. Fosfolipaz aktivitesinin değerlendirilmesi

Suşların fosfolipaz aktivitesini belirlemek için Price ve arkadaşları tarafından bulunan ve Samaranayake adlı araştırmacı tarafından modifiye edilen YSA (Yumurta sarılı agar) plak yöntemi kullanıldı (152, 153).

Besiyerinin hazırlanması: Bir litre distile su içerisine 57.3 gr NaCl (1 M), 0.735 gr CaCl_2 (0.005 M), 10 gr pepton, 30 gr glukoz, 20 gr agar eklendi. Karışım manyetik karıştırıcı ile homojen hale gelene kadar ısıtılarak karıştırıldı. Otoklavda 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C ’de 15 dakika steril edildi. Yumurtalar 1/10 konsantrasyonda hazırlanan çamaşır suyu içerisinde 1 dakika bekletildi. Çamaşır suyundan alınan yumurtalar steril gazlı bez ile kurulandı. Aseptik şartlar altında kırılan yumurtaların beyaz ve sarı kısımları birbirinden ayrıldıktan sonra sarı kısımlar, içerisinde steril manyetik karıştırıcı bulunan steril bir behere aktarıldı. Homojen hale gelene kadar iyice karıştırılan yumurta sarıları, sterilizasyon sonrası sıcaklığı 50°C ’ye kadar düşen besiyeri karışımına eklendi ve homojen dağılması için karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri dispenser ile 90 mm çaplı steril petri kaplarına 25’ er ml dağıtıldı.

Testin uygulanması: SDA’da üreyen maya kolonilerinden steril eküvyonla birkaç adet alınarak %0,9 steril serum fizyolojik içeren cam tüplerde 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bir süspansiyon elde edildi. Önceden hazırlanan yumurta sarılı agar besiyerlerine maya süspansiyonlarından 10’ar µl inoküle edildi ve 37°C ’de dört gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fosfolipaz enzim aktivitesinin varlığı, maya kolonileri çevresinde bir presipitasyon zonu oluşumu ile belirlendi. Fosfolipaz

aktivitesi (Pz); koloninin çapının, koloni çapı ve presipitasyon zon çapının toplamına bölünmesi ile hesaplandı. Pz şu şekilde derecelendirildi (154):

Pz = ≤ 0.69 çok kuvvetli fosfolipaz aktivitesi (++++)

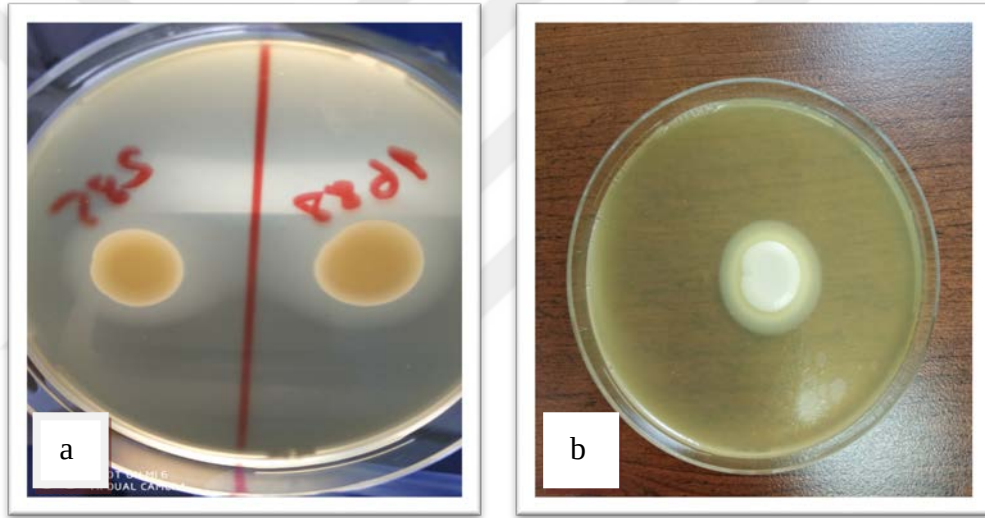
Pz = 0.70-0.79 kuvvetli fosfolipaz aktivitesi (+++)

Pz = 0.80-0.89 orta fosfolipaz aktivitesi (++)

Pz = 0.90-1 zayıf fosfolipaz aktivitesi (+)

Pz = ≥ 1 negatif fosfolipaz aktivitesi (-)

Fosfolipaz aktivitesi pozitif olan *Candida albicans* ATCC 90028 referans suşu ve orta düzey fosfolipaz aktivitesi gösteren *C. inconspicua* suşlarının enzimatik aktiviteleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.10. YSA besiyerinde a) *C. albicans* ATCC 90028 suşunun kuvvetli pozitif fosfolipaz aktivitesi, b) Suşların orta düzey fosfolipaz aktivitesi (Çalışmadan)

3.8.2. Salgısal aspartil proteinaz aktivitesinin değerlendirilmesi

Çalışmadaki suşların ekstrasellüler salgısal aspartil proteinaz aktivitesinin değerlendirilmesi için Staib tarafından önerildiği şekilde sığır serum albümin içeren agar besiyeri kullanılmıştır (155).

Temel besiyerinin hazırlanması:

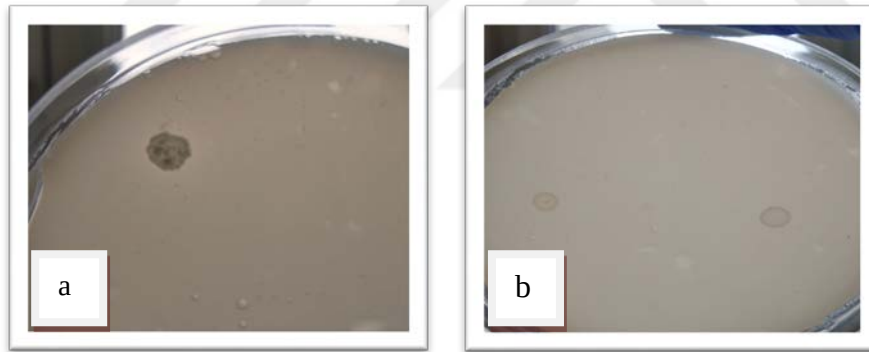
Bir litre distile su içerisine %0,1 oranında potasyum dihidrojen fosfat, %0,05 oranında magnezyum sülfat, %2 oranında glukoz ve %2 oranında agar (Difco, Becton Dickinson, USA) eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Besiyeri daha sonra otoklavda 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C’de 15 dakika steril edildi.

Protein çözeltilisinin hazırlanması:

%1 oranında sığır serum albümini (Sigma-Aldrich, USA) 100 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Tamamen çözündükten sonra 0.22 mikrometre porlara sahip membran filtreden süzülerek steril edildi. Temel besiyeri içine, protein çözeltilisinin son konsantrasyonu %20 olacak şekilde %1 sığır serum albümin içeren protein çözeltilisinden eklendi. Hidroklorik asit çözeltisi (HCL) yardımıyla pH'sı 4,5'a ayarlanan karışım 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 25'er ml dağıtıldı.

Testin uygulanması: Sığır serum albümin agar üzerine, daha önce hazırlanan maya süspansiyonundan 10 µl inoküle edildikten sonra 37°C'de 10 gün inkübasyon gerçekleştirildi. Proteinaz aktivitesinin varlığı, maya kolonileri etrafında şeffaf bir zon oluşumu ile saptandı (Şekil 3.15).

Şeffaf zonların genişliği mm cinsinden ölçülerek, proteinaz aktivite düzeyi şu şekilde derecelendirildi: Koloni etrafında şeffaf zon olmayanlar proteinaz aktivitesi açısından negatif (-), 1-2 mm şeffaf zon olanlar pozitif (+) ve 3-5 mm şeffaf zon olanlar kuvvetli pozitif (++) olarak değerlendirildi (150, 154).



Şekil 3.11. Sığır serum albümin agar besiyerinde a: Pozitif proteinaz aktivitesi (*C. albicans* ATCC 90028), b: Negatif proteinaz aktivitesi (Çalışmadan)

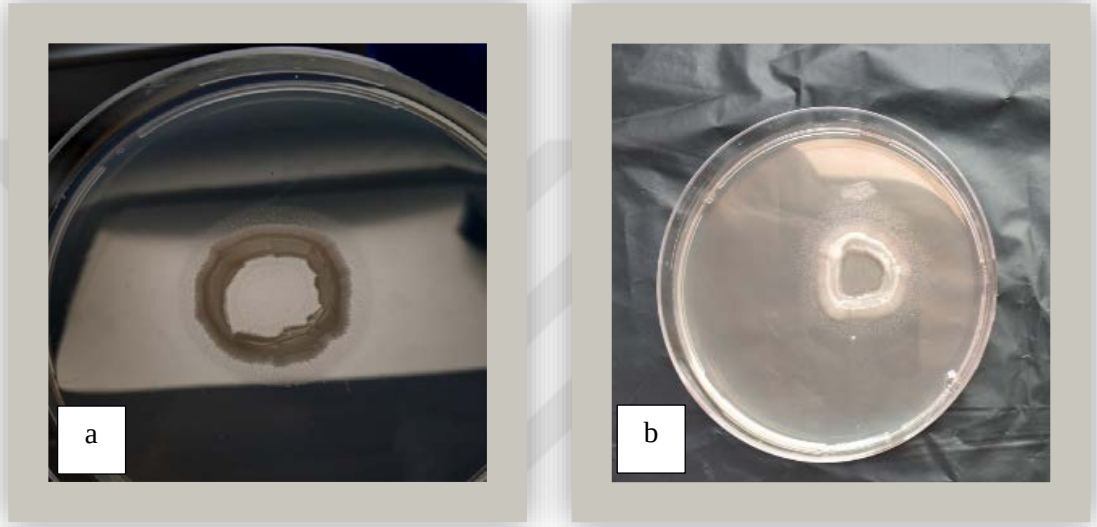
3.8.3. Esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi

Patojen mayaların virulansında önemli rol oynayan ve lipolitik aktivite sergileyen esteraz enziminin varlığı, ilk kez 1978 yılında Rudek tarafından Tween 80 opasite test yöntemiyle ortaya konmuştur. Bu çalışmadaki *C. inconspicua* suşlarının esteraz aktivitesi Tween 80 agar besiyeri kullanılarak incelendi (156).

Besiyeri hazırlanması: Bir litre distile su içerisine %1 pepton, %0,5 NaCl, %0,01 CaCl₂ ve %1,5 oranında agar eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize edildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilen besiyeri karışımının sıcaklığı 50°C'ye geldiğinde içerisine %0,5 oranında Tween-80 (Merck, Almanya) eklendi. Eşit

miktarda sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tamponu kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanan besiyeri, dispenser yardımıyla 90 mm çaplı steril petri kaplarına 25'er ml döküldü.

Testin uygulanması: Hazırlanan maya süspansiyonlarından mikropipetle 10 µl alınarak Tween-80 agar besiyerine dikkatli bir şekilde ekim yapıldı. 30°C'de 10 gün boyunca inkübe edilen besiyerlerindeki esteraz aktivitesinin varlığı, inokulum etrafında ışığa geçirgen bir halo oluşumu durumunda pozitif olarak kabul edildi (Şekil 3.16).



Şekil 3.12. Tween-80 agar besiyerindeki pozitif esteraz aktiviteleri (Çalışmadan)
a) *C. albicans* ATCC 90028 referans suşu, b) Klinik *C. inconspicua* suşu

3.8.4. Biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi

Çalışmadaki suşların biyofilm aktivitesinin belirlenmesinde modifiye mikropalak yöntemi (MMP) kullanıldı (150, 151).

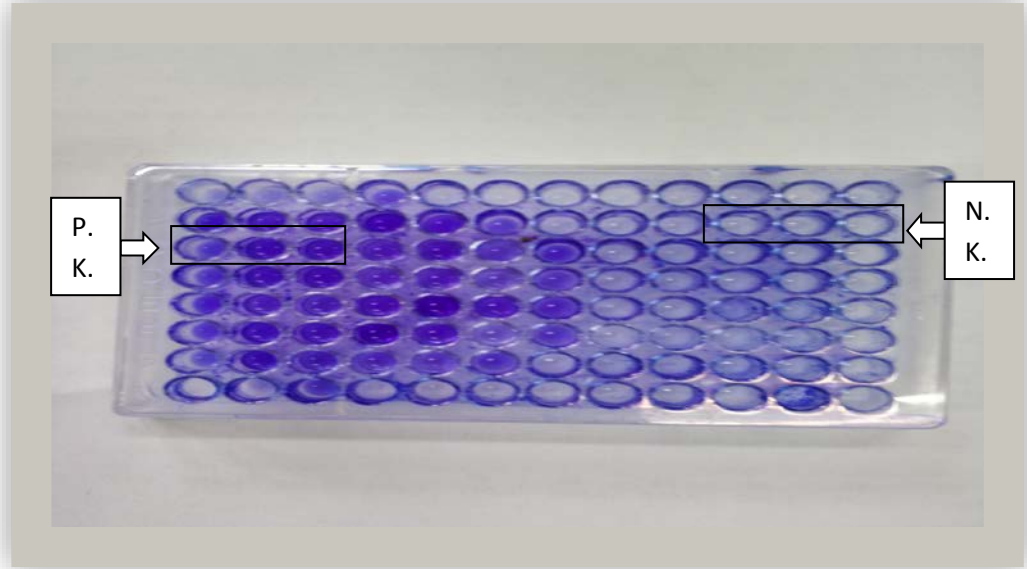
%0.25 glukoz içeren Brain Heart Infuzyon Broth (BHIB) besiyerinin hazırlanması:

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) besiyerinden 37 gram alınarak bir litre distile su içerisine eklendi ve karışıma son konsantrasyonu %0,25 olacak şekilde glukoz ilave edildi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilen besiyeri steril cam tüplere ikiye ml dağıtıldı.

Testin uygulanması: SDA besiyerinde üreyen 24-48 saatlik kolonilerden bir öze dolusu alınarak cam tüplerdeki BHIB içerisinde karıştırıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kısa süreli vortekslenen maya süspansiyonları, taze hazırlanmış olan BHIB ile 1/40 oranında seyreltilti. 96 kuyucuklu U tabanlı

mikroplağın (TPP, İsviçre) kuyucuklarına seyreltilmiş maya süspansiyonlarından 200'er µl koyuldu. Her izolat için üç kuyucuk kullanıldı ve analiz yaparken bu kuyucukların aritmetik ortalaması kullanıldı. Mikroplağın kapağı kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyon yapıldı. Daha sonra kuyucukların içindeki sıvı mikropipetle boşaltılıp, 3 kere fosfat tampon solüsyonu (PBS, pH 6,8) ile yıkandı ve mikroplak ters çevrilerek kurutuldu. Her kuyucuğa 200 µl %1'lik kristal viyole boya solüsyonundan konularak 15 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki boya mikropipet ile boşaltılıp, PBS ile 3 kere yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara etanol-aseton (80:20 v/v) karışımından 200 µl konularak ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Biotek EL x 808, USA) plate reader (plak okuyucu) cihazında 450 nanometre dalga boyunda her bir kuyucuk için optik dansiteler kaydedildi. Negatif kontrol olarak BHIB besiyeri, pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşu kullanıldı (151). Besiyeri içeren kuyucuklarda ölçülen optik dansite değerlerinin aritmetik ortalaması alındı ve +2 standart sapma eklenerek eşik değer belirlendi. Optik dansite değeri, eşik değerinin altında belirlenen suşlar biyofilm aktivitesi yönünden negatif; eşik değerinin üzerinde saptanan suşlar pozitif olarak kabul edildi.

C. inconspicua suşlarının MMP yöntemiyle saptanan biyofilm aktiviteleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.13. MMP yöntemiyle *C. inconspicua* suşlarının biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi

3.9. Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmada yer alan 40 *Candida inconspicua* suşunun antifungal ajanlara duyarlılıkları; amfoterisin B, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol ve 5-florositozin için sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI M60-Ed2 rehber dökümanı tarafından önerildiği şekilde test edildi (132). Antifungallerden toz formülasyonu bulunmayan vorikonazol, posakonazol, mikafungin, kaspofungin ve anidulafungin için duyarlılık testleri Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemiyle üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Sonuçların geçerliliğini değerlendirmek için her bir yöntemde klinik suşlarla birlikte *C. albicans* ATCC 90028 referans suşu kullanıldı (132).

3.9.1. Sıvı mikrodilüsyon test yöntemi

Antifungal duyarlılık testleri RPMI 1640 Medium (L-glutamin içeren, sodyum bikarbonat ve fenol kırmızısı içermeyen) (Sigma-Aldrich, İngiltere) sıvı besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi.

3.9.1.1. RPMI 1640 sıvı besiyerinin hazırlanması

Son konsantrasyon %0,2 olacak şekilde glukoz, 10,4 gram dehidre baz besiyeri ve 34.53 gr 0,165 M MOPS (3-N-morpholinopropane sulfonic acid) (PanReac&AppliChem, ABD) tamponu 900 ml distile su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırıldı. Otoklavda 15 lbs basınçlı buhar altında 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra soğumaya bırakılan besiyerinin son pH’sı 7 olacak şekilde ayarlandı ve kullanım vaktine kadar 2-8°C’de muhafaza edildi.

3.9.1.2. Antifungal ilaçların stok solüsyonlarının hazırlanması

1) Kullanılan antifungal ilaç tozlarının jenerik isimleri ve potensleri aşağıda verilmiştir (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Antifungal ilaç tozlarının jenerik isimleri ve potensleri

Antifungal ilaç etken maddeleri	Potens (µg/mg)
Flukonazol (Sigma, St. Louis, ABD)	997
İtrakonazol (Sigma)	980
Ketokonazol (Sigma)	1000
Amfoterisin B (Sigma)	1000
5-Florositozin (Pfizer)	990

2) Antifungal ilaç tozlarından stok solüsyonlarının hazırlanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Ağırlık (mg): } \frac{\text{Volüm} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL})}{\text{Antifungal potensi } (\mu\text{g/mg})}$$

3) Antifungal ilacın stok solüsyonlarının hazırlanmasında ve dilüsyonunda kullanılan çözücü ve sulandırıcılar Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Antifungal ilaç tozlarının çözücü ve sulandırıcıları

Antifungaller	Çözücü	Sulandırıcı
Flukonazol	Distile su	Sıvı RPMI 1640 besiyeri
İtrakonazol	DMSO	Sıvı RPMI 1640 besiyeri
Ketokonazol	DMSO	Sıvı RPMI 1640 besiyeri
Amfoterisin B	DMSO	Sıvı RPMI 1640 besiyeri
5-Florositozin	Distile su	Sıvı RPMI 1640 besiyeri

4) Hazırlanan stok solüsyonlarından flukonazol ve 5-florositozin için 0.125-64 $\mu\text{g/mL}$; diğer antifungaller için ise 0.03-16 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışma solüsyonları elde edildi. Bu solüsyonlar antifungal duyarlılık testlerinde kullanıldı.

3.9.1.3. Standart maya inokülumunun hazırlanması ve dilüsyonu

1) SDA'da üreyen 24-48 saatlik *C. inconspicua* kolonilerinden steril eküvyon yardımıyla alınan birkaç adet koloni, steril SF (Serum fizyolojik) içeren cam tüplere aktarıldı. Karışım vorteksenerek kolonilerin SF içerisinde homojen dağılımı sağlandıktan sonra 0,5 McFarland standarda eşdeğer bulanıklığa sahip maya süspansiyonları hazırlandı.

2) Hazırlanan maya süspansiyonları son dilüsyon oranı 1/1000 olacak şekilde, ilk önce steril SF ile 1/10; ardından sıvı RPMI besiyeri ile 1/100 oranında seyreltildi ($1-5 \times 10^3$ CFU/ml).

3.9.1.4. Testin yapılması

1) 96 kuyucuktan oluşan, U tabanlı, steril mikropalaklar kullanıldı.

2) Her bir kuyucuğa (Flukonazol ve 5- florositozin'in test edileceği mikropalaklardaki ilk kuyucuk hariç) 100 μL sıvı RPMI 1640 besiyeri konuldu.

3) İlk kuyucuklara (Flukonazol ve 5-florositozin'in test edileceği mikropalakların ilk iki kuyucuğuna) test edilecek her bir antifungale ait stok solüsyonundan 100'er μL

konuldu. Otomatik pipet yardımıyla ilk kuyucuktan 100 µl alınarak 2. Kuyucuğa aktarıldı ve bu şekilde 10. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı. Flukonazol ve 5-florositozin içeren mikrolaplarda ise seri dilüsyona 2. kuyucuktan başlanıp 10. kuyucuğa kadar devam edildi.

4) Mikrolaplarda 11. kuyucuk besiyeri sterilite kontrolü, 12. kuyucuk ise mikroorganizma üreme kontrolü olarak kullanıldı.

5) Hazırlanan maya süspansiyonundan, sterilite kontrolü dışında kalan her bir kuyucuğa 100 µl inoküle edildi.

6) Her bir antifungal ajan için belirlenen konsantrasyon aralıkları ve maya inokulum ($0.5-2.5 \times 10^3$ hücre/ml) konsantrasyon değerleri son şekline ulaştı.

7) Mikrolapların üzeri kapatılarak 37°C’de 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi.

8) İnkübasyon süresince üreme ve kontaminasyon varlığı açısından 24. Saatte gözlemlenen mikrolaplar 48. saatte yeniden değerlendirildi.

Sus No	64µg/ml	32µg/ml	16µg/ml	8µg/ml	4µg/ml	2µg/ml	1µg/ml	0,5µg/ml	0,25µg/ml	0,125µg/ml	BK	ÜK
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

BK: Besiyeri kontrolü, ÜK: Üreme kontrolü

Şekil 3.14. Flukonazol ve 5-florositozin için mikrolap kuyucuklarında elde edilen nihai ilaç konsantrasyonları

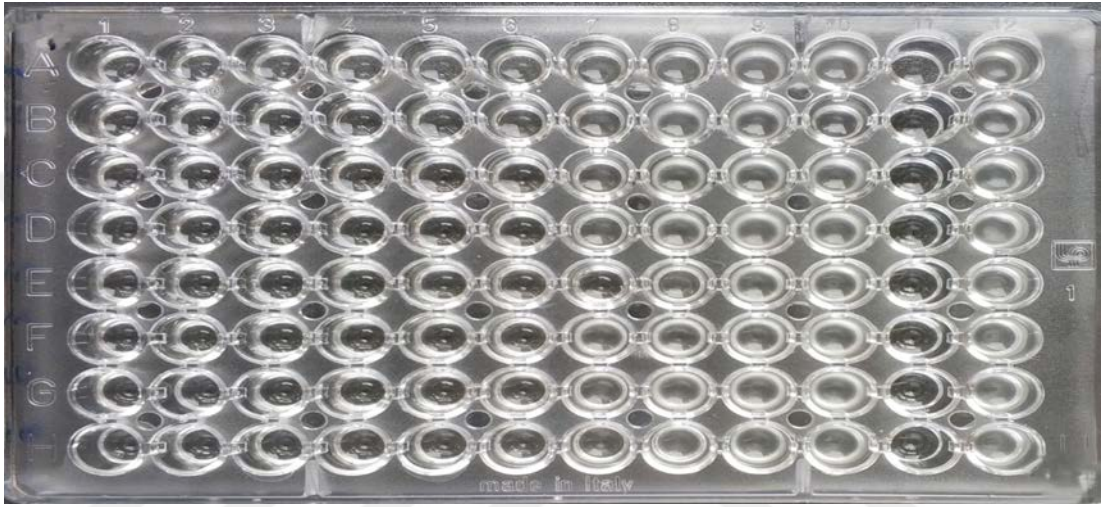
SusNo	16µg/ml	8µg/ml	4µg/ml	2µg/ml	1µg/ml	0,5µg/ml	0,25µg/ml	0,125µg/ml	0,06µg/ml	0,03µg/ml	BK	ÜK
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

BK: Besiyeri kontrolü, ÜK: Üreme kontrolü

Şekil 3.15. Amfoterisin B, itrakonazol ve ketokonazol için mikrolap kuyucuklarında elde edilen nihai ilaç konsantrasyonları

3.9.1.5. Sonuçların yorumlanması

İnkübasyon sonunda elde edilen MİK değerlerinin tespiti, antifungal içeren kuyucuklardaki bulanıklık ile üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklık düzeylerinin görsel olarak karşılaştırılmasıyla gerçekleştirildi. Flukonazol, itrakonazol, ketokonazol ve 5-florositozin için belirgin üreme inhibisyonunun saptandığı en düşük konsantrasyon (üreme kontrol kuyucuğuna göre $\geq 50\%$ inhibisyon); amfoterisin B için ise üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi.



Şekil 3.16. Sıvı mikrodilüsyon testi (Çalışmadan)

3.9.2. Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) test yöntemi

Çalışmadaki *Candida inconspicua* suşlarının vorikonazol, posakonazol, mikafungin, kaspofungin ve anidulafungin için duyarlılıklarının test edilmesinde özellikle ABD’de araştırma amaçlı (Research Use Only) kullanılan ve CLSI rehberlerinde yer alan mikrodilüsyon yöntemleriyle yüksek uyum gösteren, kolorimetrik temelli Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (ThermoFisher Scientific™) yöntemi kullanıldı.

3.9.2.1. Maya inokülumunun hazırlanması ve sulandırılması

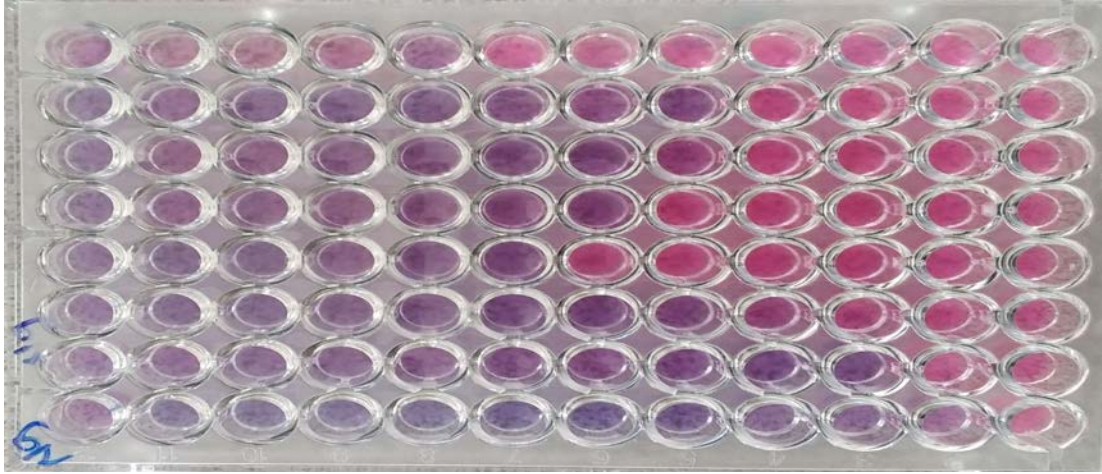
SDA’da üreyen 24-48 saatlik *C. inconspicua* kolonilerinden steril eküvyon yardımıyla 3-5 koloni alınarak Sensititre Sterile Water® (Katalog no: T3339) içerisinde karıştırıldı. Nefelometre cihazıyla 0,5 McFarland standartına eş değer bulanıklık elde edildikten sonra bu süspansiyondan 20 µl alınarak Sensititre YeastOne Broth® (Katalog no: Y3462) besiyeri (11 ml) tüpüne aktarıldı ve $1,5-8 \times 10^3$ CFU/ml konsantrasyonda maya inokulumu elde edildi.

3.9.2.2. Testin Uygulanması

Hazırlanan karışımdan mikroplaktaki her bir kuyucuğa çok kanallı pipet yardımıyla 100 µl inoküle edildi. Mikroplağın üzeri koruyucu ambalaj ile kapatılarak normal atmosferik ortamda 35°C’de 24±1 saat inkübasyon yapıldı.

3.9.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu sonucu kuyucuklarda gözlenen maviden kırmızıya renk değişikliği maya üremesinin varlığını göstermektedir. Bazı maya türleri kolorimetrik indikatör olan “Alamar Blue” molekülünü tamamen kırmızıya dönüştüremeyip, mor renk oluşumu meydana getirmektedir. Bazı türlerde özellikle posakonazol, vorikonazol, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol gibi antifungallerin olduğu kuyucuklarda hafif bir morluk oluşmaktadır. Sadece renk değişimi göz önünde bulundurulurken kuyucuklardaki bulanıklık dikkate alınmaz. Bu yöntemde MİK değeri, antifungal içeren kuyucuklardaki renk değişikliği pozitif üreme kontrol kuyucuğundaki renk ile karşılaştırılarak kırmızı veya mor renk değişikliğinin saptandığı ve organizmanın büyümesini büyük ölçüde inhibe eden en düşük antifungal ilaç konsantrasyonudur.



Şekil 3.17. Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (ThermoFisher Scientific™) yöntemi (Çalışmadan)

3.10. İstatiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 28.0 (IBM Co., New York, ABD) programı kullanıldı. Sürekli olmayan değişkenler için ortalama, ortanca ve yüzde değerleri hesaplandı. Kategorik değişkenler için “Fisher exact ki kare ve ki kare” testleri; parametrik olmayan sayısal değişkenler için ise “Wilcoxon T” testi kullanıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Suşların İzole Edildiği Hastaların Demografik Özelliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada *C. inconspicua* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin elde edildiği hastalar; yaş, cinsiyet durumu, örneğin gönderildiği bölüm, enfeksiyonun toplum veya hastane kaynaklı olup olmadığı, örnek türleri, altta yatan hastalık, fungal enfeksiyonlarla ilişkili bazı laboratuvar parametreleri ve çeşitli risk faktörleri ile uygulanan antifungal tedavi rejimleri yönünden incelenmiştir (Tablo 4.1). Hastaların bölümlere göre dağılımına bakıldığında; %15 (6/40)'inin polikliniklerde; %45 (18/40)'inin dahili kliniklerde, %17,5 (7/40)'inin cerrahi kliniklerde ve %22,5 (9/40)'inin yoğun bakım ünitelerinde takip edildiği belirlenmiştir. Bu çalışmada yer alan suşların elde edildiği hastaların bölümlere göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Çalışmadaki hastaların demografik özelliklerinin incelenmesi

Sıra No	Yaş ve Cinsiyet ^a	Örneğin Gönderildiği Bölüm ^b	Hasta Yatış Tarihi	Örnek Alım Tarihi	Klinik Örnek ^c	Altta Yatan Hastalık ^d	Serum/BAL Galaktomannan Düzeyi (pg/ml)	Nötropeni ^e	İntravasküler Kateter	Üriner Kateter	Kemoterapi	Antibiyotik Kullanım Öyküsü	Antifungal Tedavi ^f	Sağkalım
1	8/K	Pediyatri Nöroloji Servisi	14.02.2020	6.03.2020	Vajinal Akıntı	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet
2	78/K	Medikal Onkoloji Servisi	8.07.2020	16.07.2020	Safra	Pankreas malign neoplazmı, DM	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
3	66/E	Genel Cerrahi YBÜ	3.02.2020	5.02.2020	Intraabdominal mayı	Akciğer malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	MF	Hayır
4	70/K	Beyin Cerrahisi Servisi	21.10.2019	29.10.2019	İdrar	DM, KBY	Yok	Yok	Yok	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
5	76/E	Göğüs Hastalıkları Servisi	21.12.2015	29.12.2015	Balgam	Akciğer malign neoplazmı, KOAH	5.25 (Serum)	Yok	Var	Yok	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Hayır
6	52/E	Dahiliye YBÜ	2.12.2020	14.12.2020	Balgam	Bronşiektazi, KDH	Yok	Yok	Yok	Var	Almadı	Yok	Almadı	Evet
7	59/E	Göğüs Cerrahi Pol.	25.06.2015	25.06.2015	BAL	Akciğer malign neoplazmı, KOAH	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
8	35/K	Hematoloji-Kit Servisi	14.10.2020	15.10.2020	BAL	Akciğer malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Hayır
9	51/E	Nefroloji Servisi	2.03.2016	3.03.2016	Balgam	KBY	3.50 (Serum)	Yok	Var	Yok	Aldı	Var (kombine)	CAS	Evet
10	57/E	Göğüs Cerrahi Servisi	21.12.2016	22.12.2016	BAL	Kist hidatik, KDH	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
11	47/E	Göğüs Cerrahi Servisi	11.10.2016	12.10.2016	BAL	Pnömotoraks nedeniyle tüp torakostomi	2.40 (BAL)	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	CAS-VOR	Evet
12	24/K	Göğüs Cerrahi Pol.	15.05.2019	15.05.2019	Balgam	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
13	60/E	Göğüs Hastalıkları Günübirlik Pol.	19.07.2019	19.07.2019	BAL	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
14	82/E	Nefroloji Servisi	1.03.2016	8.03.2016	BAL	KBY, KDH	0.17 (Serum)	Yok	Var	Yok	Aldı	Var (kombine)	CAS	Evet
15	59/E	Göğüs Cerrahi YBÜ	17.12.2019	19.12.2019	BAL	Nazofarenks malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
16	45/K	Göğüs Cerrahi Servisi	2.06.2015	4.06.2015	BAL	Bronşiektazi	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
17	29/E	Göğüs Cerrahi Servisi	1.11.2017	3.11.2017	BAL	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Yok	Almadı	Evet
18	43/E	Göğüs Hastalıkları Servisi	10.05.2016	11.05.2016	Balgam	KOAH	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
19	63/E	Göğüs Hastalıkları Günübirlik Pol.	17.02.2020	17.02.2020	BAL	DM	Yok	Yok	Yok	Yok	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet
20	27/E	Göğüs Cerrahi Servisi	27.03.2020	30.03.2020	Balgam	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
21	25/E	Enfeksiyon Hastalıkları Pol.	13.08.2020	13.08.2020	Dışkı	<i>H. pylori</i> (Kronik antral gastrit)	Yok	Yok	Yok	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
22	58/E	Göğüs Hastalıkları Servisi	8.02.2018	9.02.2018	Balgam	Mide malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Yok	FZ	Evet
23	76/E	Genel Cerrahi YBÜ	23.12.2014	12.01.2015	Safra	Pankreas malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
24	57/E	Göğüs Hastalıkları YBÜ	15.11.2018	22.11.2018	Balgam	KOAH	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet
25	50/K	Göğüs Cerrahi Pol.	13.05.2016	13.05.2016	BAL	Bronşiektazi	Yok	Yok	Var	Yok	Almadı	Yok	Almadı	Evet
26	70/K	Dahiliye YBÜ	15.08.2019	21.08.2019	Kan	Pankreas malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Aldı	Var (kombine)	CAS	Hayır
27	56/K	Dahiliye YBÜ	19.12.2020	22.12.2020	ETA	DM	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Hayır
28	73/K	MedikalOnkoloji Servisi	1.12.2020	10.12.2020	İdrar	Kolanjiokarsinom	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet
29	93/K	Göğüs Hastalıkları YBÜ	18.01.2021	1.02.2021	ETA	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Hayır
30	61/K	Medikal Onkoloji Servisi	22.02.2021	2.03.2021	İdrar	Pankreas malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Aldı	Var (kombine)	Almadı	Hayır
31	64/E	Medikal Onkoloji Servisi	28.05.2021	3.06.2021	Safra	Kolon malign neoplazmı	Yok	Var	Var	Yok	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
32	55/E	Hematoloji-Kit Servisi	31.03.2021	12.04.2021	Balgam	T-ALL	0.14 (Serum)	Yok	Var	Yok	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
33	75/E	Nefroloji Servisi	21.04.2016	26.04.2021	BAL	DM, KBY, KOAH	4.39 (Serum)	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	AND	Hayır
34	31/K	Nefroloji Servisi	16.08.2017	21.08.2017	Balgam	KOAH, pulmoner tüberküloz	0.24 (Serum)	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet
35	56/E	Genel Cerrahi Servisi	4.06.2021	12.07.2021	Safra	Klatskin tümörü	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	FZ	Evet
36	56/K	Göğüs Hastalıkları Servisi	18.11.2018	21.11.2018	Balgam	KOAH	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (monoterapi)	Almadı	Evet
37	53/K	Dahiliye YBÜ	12.03.2019	4.04.2019	BAL	KBY, Pankreas nöroendokrin malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Aldı	Var (kombine)	Almadı	Hayır
38	59/E	Göğüs Hastalıkları Servisi	27.12.2018	3.01.2019	Balgam	KNPA, MDS, KOAH, bronşiektazi	0.16 (Serum)	Yok	Var	Var	Aldı	Var (kombine)	Almadı	Evet
39	38/E	Nefroloji Servisi	29.02.2016	8.03.2016	BAL	KBY	0.17 (BAL)	Yok	Var	Yok	Aldı	Var (kombine)	CAS-VOR	Evet
40	88/K	Genel Cerrahi YBÜ	2.08.2019	20.08.2019	Doku	Kolon malign neoplazmı	Yok	Yok	Var	Var	Almadı	Var (kombine)	Almadı	Evet

^a E: Erkek, K: Kadın.

^b KIT: Kemik iliği transplantasyonu, Pol: Poliklinik, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

^c BAL: Bronkoalveolar lavaj, ETA: Endotrakeal aspirat.

^d DM: Diabetes mellitus, KBY: Kronik böbrek yetmezliği, KDH: Kollajen doku hastalıkları, KNPA: Kronik nekrotizan pulmoner *Aspergilloz*, KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, MDS: Myelodisplastik sendrom, T-ALL: T-hücreli akut lenfoblastik lösemi.

^e Tanı anında mutlak nötrofil sayısı < 1,5*10⁹ hücre/L.

^f AND: Anidulafungin, CAS: Kaspofungin, CAS-VOR: Kaspofungin-vorikonazol, FZ: Flukonazol, MF: Mikafungin.

Tablo 4.2. Çalışmadaki suşların elde edildiği hastaların bölümlere göre dağılımı

BÖLÜM	Sayı (%)
Poliklinik (n=6)	
Göğüs Cerrahisi Polikliniği	3 (7,5)
Göğüs Hastalıkları Polikliniği	2 (5,0)
Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	1 (2,5)
Dahili Klinikler (n=18)	
Göğüs Hastalıkları Servisi	6 (15,0)
Nefroloji Servisi	5 (12,5)
Medikal Onkoloji Servisi	4 (10,0)
Hematoloji-Kit Servisi	2 (5,0)
Pediyatri Nöroloji Servisi	1 (2,5)
Cerrahi Klinikler (n=7)	
Göğüs Cerrahisi Servisi	5 (12,5)
Beyin Cerrahisi Servisi	1 (2,5)
Genel Cerrahi Servisi	1 (2,5)
Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ) (n=9)	
Dahiliye YBÜ	4 (10,0)
Genel Cerrahi YBÜ	3 (7,5)
Göğüs Cerrahisi YBÜ	1 (2,5)
Göğüs Hastalıkları YBÜ	1 (2,5)
TOPLAM	40 (100)

Hastaların %60'ının erkek olduğu ve çocuk yaş grubundaki bir kişi dışında tamamının erişkin yaş grubunda yer aldığı saptanmıştır. Erişkin hastaların yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde; en fazla hasta sayısının 45-64 yaş aralığında (20, %50), daha sonra ≥ 65 yaş (11, %27,5) olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). Ortalama ve ortanca yaş değerleri sırasıyla $55,6 \pm 18,5$ ve 57 olarak hesaplanmış, her bir cinsiyet için elde edilen ortalama ve ortanca yaş değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Suşların elde edildiği hastaların yaş ve cinsiyet durumları

Yaş ve Cinsiyet Durumları	Toplam hasta sayısı (n= 40)
	Sayı (%)
Cinsiyet	
Erkek	24 (60)
Kadın	16 (40)
Yaş Grupları	
<18 yaş	1 (2,5)
18-44	3 (20)
45-64	21 (50)
≥ 65 yaş	15 (27,5)

Tablo 4.4. Hastaların ortalama±standart sapma ve ortanca (Min-Max) yaş değerleri

Cinsiyet	Ortalama±standart sapma	Ortanca (Min-Max)	<i>p</i> [*]
Erkek	55,6±15,1	57,5 (25,0-82,0)	0,380
Kadın	55,7±23,3	56,0 (8,0-93,0)	
TOPLAM	55,6±18,5	57,0 (8,0-93,0)	

** Fisher kesin ki-kare testi*

C. inconspicua suşlarına bağlı gelişen enfeksiyonların daha çok solid organ maligniteli hastalarda (15, %37,5) görüldüğü ancak; KOAH (Kronik obstruktif akciğer hastalığı) ve diğer patojen mikroorganizmalarla ko-enfeksiyon gibi eşlik eden hastalıklarda da diğer durumlara göre daha sık rastlandığı tespit edilmiştir. Dört hastanın galaktomannan antijen testi sonucunda pozitiflik saptanmış, üç hastada diğer maya türleriyle (*C. albicans*, *Trichosporon* sp.) ko-enfeksiyon ve antibiyotik kullanımı gibi başka faktörlere bağlıken birinde *C. inconspicua*'ya bağlı enfeksiyonla ilişkilendirilmiştir. *C. inconspicua* ile enfekte hastalarda tanı ve tedavi amaçlı vücuda yerleştirilen başta intravasküler kateterler olmak üzere üriner kateterler gibi tıbbi gereçlerin daha yaygın bulunduğu ortaya konulmuştur. Hastaların %80'inin enfeksiyon epizodu öncesindeki üç ay içerisinde herhangi bir kemoterapötik ilaç kullanmadığı, biri dışında tamamının normal nötrofil sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Gastrointestinal sistemin çeşitli bölümlerinde normal flora elemanı olarak da bulunabilen mikroorganizmanın geniş spektrumlu antibiyotik kullanım öyküsü olan hastalarda olmayanlara göre daha sık saptandığı bulunmuştur. Hastaların büyük bir kısmında (%77,5) antifungal tedavi uygulanmamasına rağmen enfeksiyon prognozunun iyi seyrettiği, mortalite ile sonuçlanan olguların büyük çoğunluğunun da yandaş hastalıklara bağlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.5. *C. inconspicua* izole edilen hastaların karakteristik özellikleri

Karakteristik Özellikler	Hasta Sayısı (N=40) n (%)
Komorbidite	
Hematolojik maligniteler	2 (5)
Solid organ maligniteleri	15 (37,5)
DM	5 (12,5)
KBY	6 (15)
KOAH	8 (20)
Yapısal akciğer hastalıkları	3 (7,5)
Kollajen doku hastalıkları	3 (7,5)
Ko-enfeksiyonlar	8 (20)
Diğer durumlar	5 (12,5)
İntravasküler Kateter	
Var	33 (82,5)
Yok	7 (17,5)
Üriner Kateterizasyon	
Var	22 (55)
Yok	18 (45)
Kemoterapi	
Var	8 (20)
Yok	32 (80)
Geniş Spektrumlu Antibiyotik Kullanım Öyküsü	
Var	28 (70)
Yok	12 (30)
Nötropeni	
Var	1 (2,5)
Yok	39 (97,5)
Galaktomannan Antijen Testi Sonucu	
Pozitif	4 (10)
Negatif	36 (90)
Antifungal Tedavi	
Var	9 (22,5)
Yok	31 (77,5)
Mortalite	
Var	9 (22,5)
Yok	31 (77,5)

Çalışmadaki izolatların elde edildiği hastaların klinik seyirleri incelendiğinde 31 (%77,5) hastanın iyileştiği, dokuz (%22,5) hastanın ise kaybedildiği görülmüştür. Kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü olmayan, 65 yaş ve altındaki erkek hastaların sağkalım yüzdesinin daha fazla olduğu tespit edilmekle beraber hastaların klinik durumu ile yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi

uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Suşların elde edildiği hastalardaki klinik seyrin; yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi uygulaması gibi özelliklere göre karşılaştırılması aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.6. *C. inconspicua* izole edilen hastalardaki klinik seyrin; yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi uygulaması gibi özelliklere göre karşılaştırılması

Karakteristik Özellik	Hastaların Klinik Seyri		(X^2)	p^{**}
	Sağ (%)*	Vefat etmiş (%)*		
Toplam	31 (77,5)	9 (22,5)		
Yaş				
<65 yaş	22 (88,0)	3 (12,0)	-	0,057
≥65 yaş	9 (60,0)	6 (40,0)		
Cinsiyet				
Erkek	21 (87,5)	3 (12,5)	-	0,120
Kadın	10 (62,5)	6 (37,5)		
Kemoterapötik İlaç Kullanım Öyküsü				
Var	5 (62,5)	3 (37,5)	-	0,348
Yok	26 (81,3)	6 (18,7)		
Antifungal Tedavi Uygulaması				
Var	4 (57,1)	3 (42,9)	-	0,316
Yok	27 (81,8)	6 (18,2)		

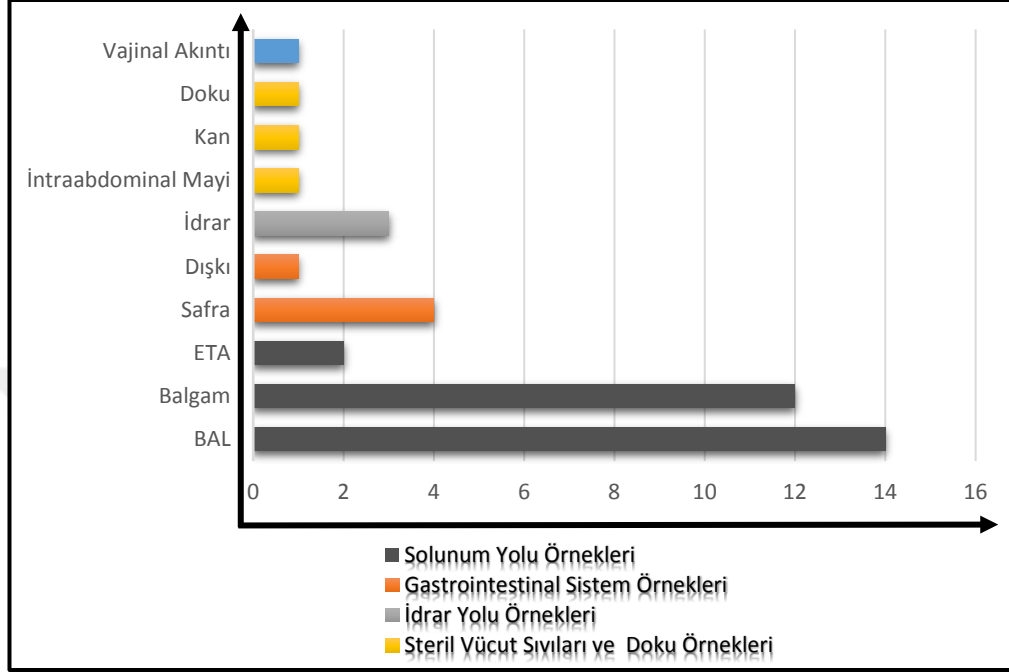
*: Satır yüzdeleri verilmiştir.

**: Fisher kesin ki-kare testi

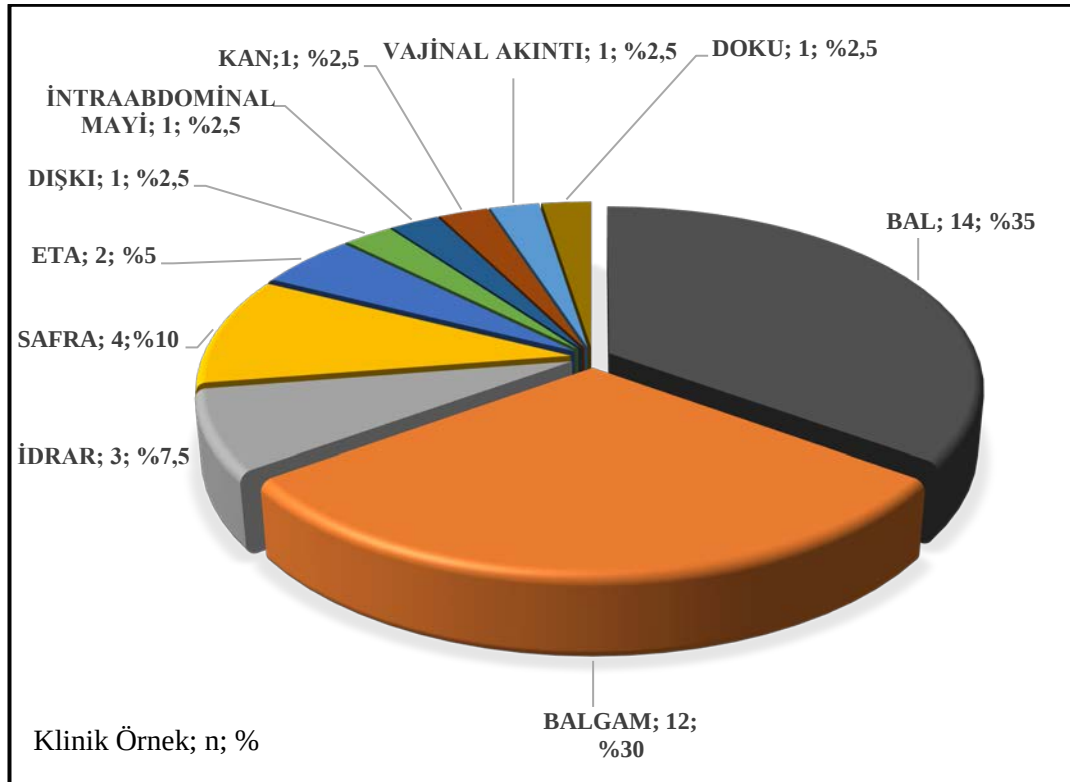
4.2. Suşların Elde Edildiği Vücut Bölümleri ve Klinik Örnek Türleri

Bu çalışmadaki klinik örnek türleri; elde edildiği vücut bölümleri açısından solunum sistemi, gastrointestinal sistem, üriner sistem, steril vücut boşlukları ve doku ile genital sistem örnekleri şeklinde beş kategoride toplanmıştır. Suşların elde edildiği vücut bölümlerine göre dağılımları incelendiğinde; solunum sistemi örneklerinin (28, %70) ilk, gastrointestinal sistem örneklerinin (5, %12,5) ikinci sırada yer aldığı tespit edilmiştir. Geriye kalan örnekler ise üriner sistem (3, %7,5), steril vücut boşlukları ve doku (3, %7,5) ile genital sistemden (1, %2,5) elde edilmiştir (Şekil 4.1). Tüm örnek türleri tek tek ele alındığında; izolasyon sıklığı açısından BAL örneklerinin (14, %35)

ilk, balgam örneklerinin ise ikinci sırada (12, %30) yer aldığı bulunmuş; dışkı, intraabdominal mayi, kan, doku ve vajinal akıntı örneklerinin ise her birinden birer adet örnekle son sırada yer aldığı belirlenmiştir. Suşların elde edildiği klinik örneklerle göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Suşların elde edildiği vücut bölümlerine göre dağılımları



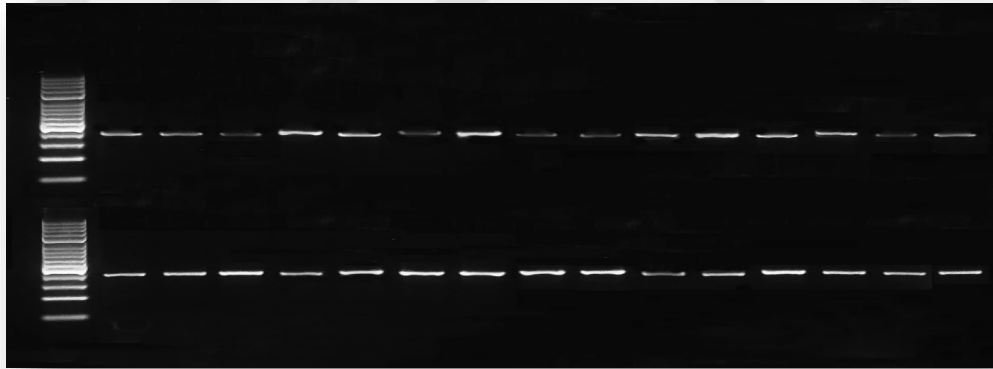
Şekil 4.2. Suşların elde edildiği örnek türlerinin sayı ve yüzdeleri (n: Örnek sayısı)

4.3. Suşların Rutinde Kullanılan Konvansiyonel Yöntemlerle Tanımlanması

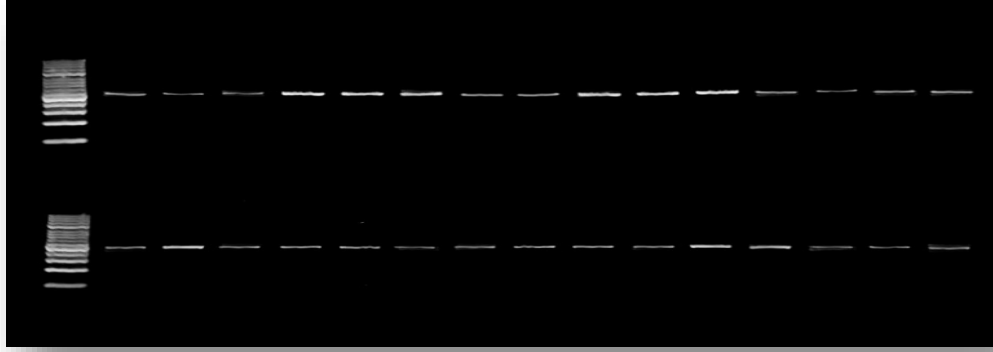
SDA besiyerinde üreyen suşlar; makroskopik koloni morfolojileri, mısır unlu-tween 80 agardaki mikroskopik görünüşleri, Chromagar *Candida* (CHROMagar Company) kromojenik besiyerinde oluşturdukları koloni renk ve morfolojileri, üreaz enzim aktiviteleri ve API 20C AUX (BioMérieux) ticari biyokimyasal tanımlama kitiyle yalnızca glikoz ve gliserol asimilasyon reaksiyonları sonucu *Candida norvegensis* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır.

4.4. *C. norvegensis* Olarak Tanımlanan Suşların Eskülin Hidroliz Aktivitesi ve Moleküler Yöntemlerle Yeniden Tanımlanması

Tür tayininin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen eskülin hidrolaz enzim aktivitesi sonucunda test edilen suşların hiçbirinde pozitif reaksiyon varlığı gözlenmemiş, suşların *Candida inconspicua* olabileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte, moleküler tanımlama için gönderilen suşların; ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri hedeflenerek gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki bant büyüklükleri sırasıyla 500, 900 ve 600 baz çifti olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3-5).



Şekil 4.3. 1’den 30’a kadar numaralandırılan klinik izolatların ITS1-5.8S- ITS2 gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.4. 1’den 30’a kadar numaralandırılan klinik izolatların EF-1 alfa gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.5. 1’den 30’a kadar numaralandırılan klinik izolatların D1/D2 gen bölgelerine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri

DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen ve dendrogram haline dönüştürülen sekans dizileri “BioEdit” programındaki “ClustalW” analizi kullanılarak hizalandığında, her bir gen bölgesine ait sekans dizilerinin bütün izolatlarda ortak olduğu görülmüştür (Şekil 4.6-8).

İzolatlar	ITS1-5.8S-ITS2 için dizileme ürünü sekans sonuçları
Tüm İzolatlar	GAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAAT TGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCG TCGTTTCCTTCTTGCGAAGCAGAGTTGGGGTTGTCACCGTCTTTCGGTGGCTCCCCGAAATGGAACGATTGCGGGC TAGAGAGCGAACTATAAACGCGCGTTCTCCCGCCGAACCTTTAATCAAGCTCGACCTCAAATCAGG

Şekil 4.6. İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları

İzolatlar	D1/D2 için dizileme ürünü sekans sonuçları
Tüm İzolatlar	CATGCTGCGAGTTGTAGATTGCAGGTGGGAGAGTCTGCGTAGGCCGGTGTGGAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCACT GAGGGTGAGAGCCCCGTGCGATGCCACGCTCTACGTTTTGTAAGTCCCTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAG CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAG ATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCCCGACATGGGAA TCGCGCACCGCTGCTCCTTGTTGGCGGGCGCTCTGGGCTTTTCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGG GCTGTGGAATGTGGCTGCCGCGCTTTGCCGGGGCAGTGTTATAGCCACTGGGCCAGATGCTGCGTGTGGGGACCGA GGACTGCGGCCGCAAGGTCTCGGATGCTGGCACAACGGCGCAATACCGCCCGTCTT

Şekil 4.7. İzolatların EF-1 alfa gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları

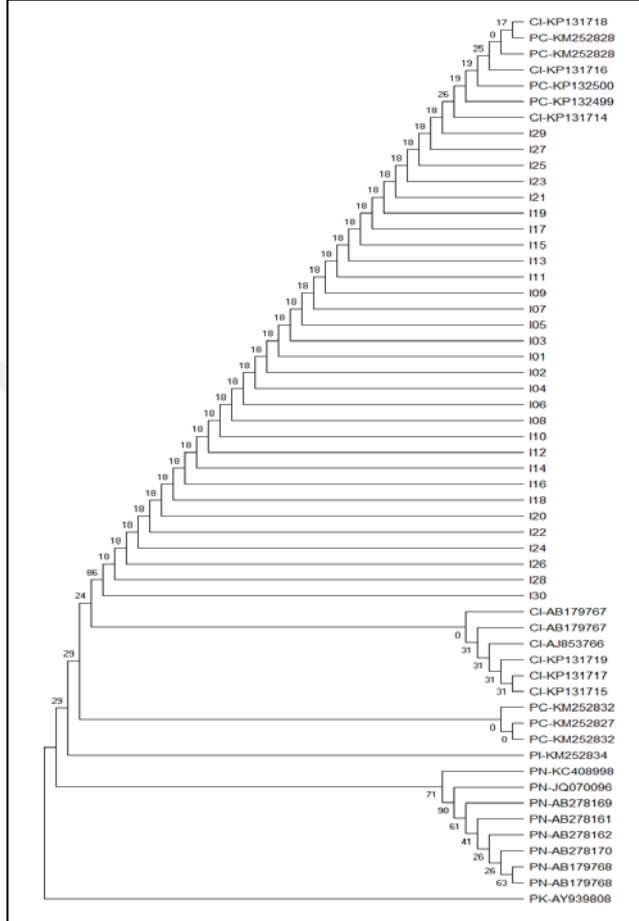
İzolatlar	D1/D2 için dizileme ürünü sekans sonuçları
Tüm İzolatlar	CATGCTGCGAGTTGTAGATTGCAGGTGGGAGAGTCTGCGTAGGCCGGTGTGGAAGTCCCTTGGAACAGGGCGCCACT GAGGGTGAGAGCCCCGTGCGATGCCACGCTCTACGTTTTGTAAGTCCCTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAG CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAG ATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGGCCCGACATGGGAA TCGCGCACCGCTGCTCCTTGTTGGCGGGCGCTCTGGGCTTTTCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGG GCTGTGGAATGTGGCTGCCGCGCTTTGCCGGGGCAGTGTTATAGCCACTGGGCCAGATGCTGCGTGTGGGGACCGA GGACTGCGGCCGCAAGGTCTCGGATGCTGGCACAACGGCGCAATACCGCCCGTCTT

Şekil 4.8. İzolatların D1/D2 gen bölgelerine ait dizileme ürünlerinin sekans sonuçları

Suşların ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgelerine ait sekans sonuçları “BLAST” analiziyle Genbank veri tabanında kayıtlı maya suşlarına ait dizilerle nükleotid dizi benzerlikleri yönünden karşılaştırıldığında; konvansiyonel yöntemlerle *C. norvegensis* olarak tanımlanan 30 izolatın tamamının *C. inconspicua* ile tür düzeyinde daha uyumlu olduğu bulunmuştur.

4.5. *Candida inconspicua* Suşlarının Filogenetik Analizi

ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri hedef alınarak gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda elde edilen dizi sonuçları ortak olduğu için çalışmaya alınan klinik suşlar benzer küme içerisinde gruplandırılmıştır (Şekil 4.9-11).

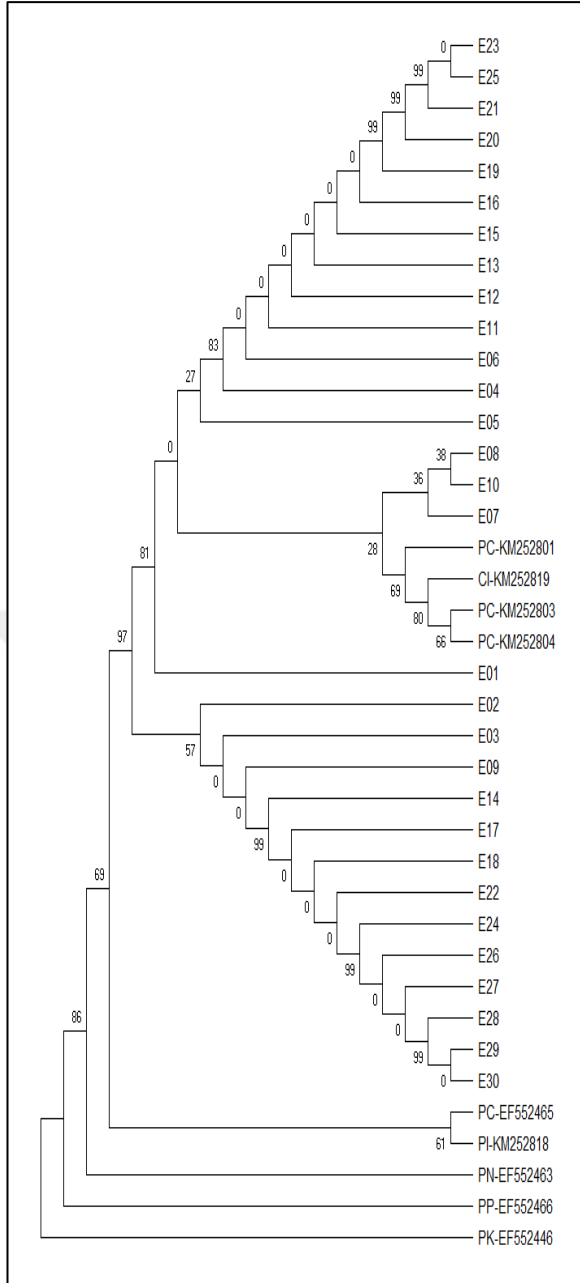


*Bootstrap“ değeri 1000 döngü (replication) olarak tayin edilmiştir.

** %50'den daha az “bootstrap“ değeri elde edilen dallara karşılık gelen kısımlar daraltılarak gösterilmiştir.

*** “Tamura-Nei” model-metodu kullanılarak evrimsel uzaklık hesaplanmıştır.

Şekil 4.9. Çalışmadaki *C. inconspicua* suşlarına, Genbank veri tabanındaki *Pichia captophilia* kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlara ve *Candida krusei* (Sinonim: *Pichia kudriavzevii*) referans suşuna ait ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü

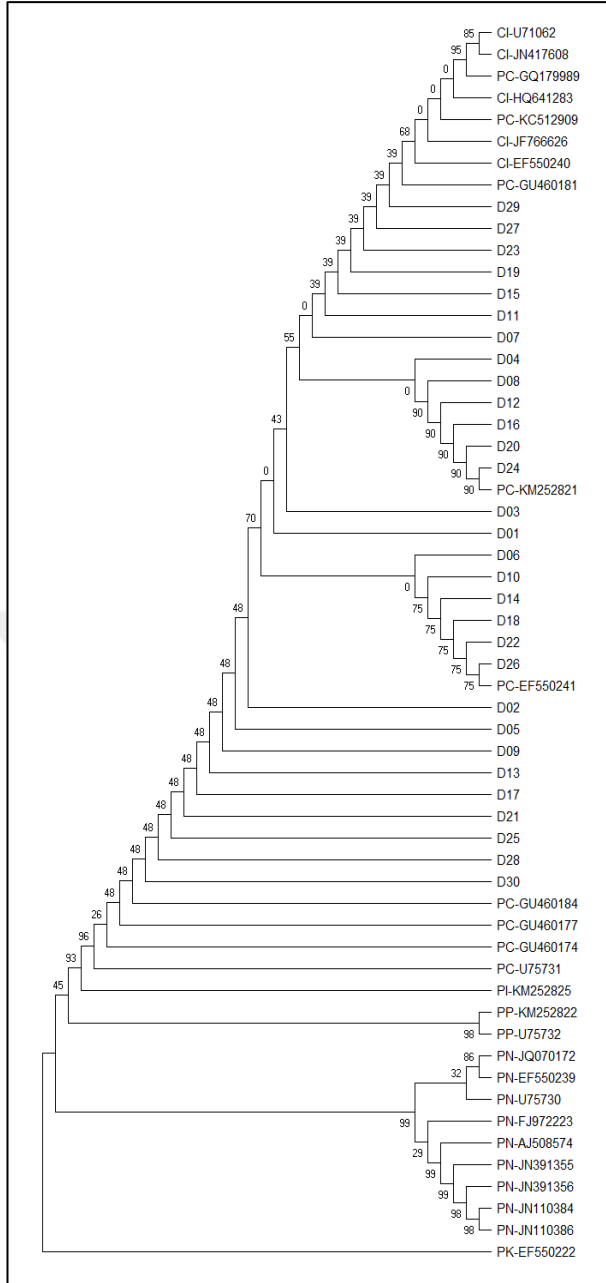


* “Bootstrap“ değeri 1000 döngü (replication) olarak tayin edilmiştir.

**%50'den daha az “bootstrap“ değeri elde edilen dallara karşılık gelen kısımlar daraltılarak gösterilmiştir.

*** “Tamura-Nei” model-metodu kullanılarak evrimsel uzaklık hesaplanmıştır.

Şekil 4.10. Çalışmadaki *C. inconspicua* suşları, Genbank veri tabanındaki *Pichia captophilia* kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve *Candida krusei* (Sinonim: *Pichia kudriavzevii*) referans suşuna ait EF-1 alfa gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü



. * “Bootstrap” değeri 1000 döngü (replication) olarak tayin edilmiştir.

** %50'den daha az “bootstrap“ değeri elde edilen dallara karşılık gelen kısımlar daraltılarak gösterilmiştir.

*** “Tamura-Nei” model-metodu kullanılarak evrimsel uzaklık hesaplanmıştır

Şekil 4.11. Çalışmadaki *C. inconspicua* suşları, Genbank veri tabanındaki *Pichia captophilia* kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve *Candida krusei* (Sinonim: *Pichia kudriavzevii*) referans suşuna ait D1/D2 gen bölgeleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın görüntüsü

4.6. Suşların Çeşitli Virülans Faktörlerinin Değerlendirilmesi

Moleküler yöntemlerle *Candida inconspicua* olarak tanımlanan suşlar, kolonizasyon/enfeksiyon patogeneğinde rol oynayan çeşitli Virülans faktörleri

açısından incelendiğinde; tamamının esteraz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Suşların 39 (%97,5)'unun fosfolipaz aktivitesine sahip olduğu, fosfolipaz aktivitesi pozitif suşların da enzimatik reaksiyon derecelerine göre sınıflandırılması sonucunda çok kuvvetli ve kuvvetli fosfolipaz aktivitesi gösterenlerin sayıca daha fazla olduğu (30, %75) belirlenmiştir. Suşların 15 (%37,5)'inde biyofilm formasyonu gözlenmiş ve bunların çoğunlukla solunum sistemine ait örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Suşların hiçbirinde salgısal aspartil proteinaz aktivitesi gözlenmemiştir. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre çeşitli virülans faktörlerinin varlığının incelenmesi ve virülans faktörlerinin dağılım sıklığı aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.6-7).

Tablo 4.7. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre çeşitli virülans faktörlerinin incelenmesi

Klinik Örnek	Suş No	Fosfolipaz Aktivitesi	Salgısal Aspartil Proteinaz Aktivitesi	Esteraz Aktivitesi	Biyofilm Formasyonu
Vajinal akıntı	1845	(+)	(-)	(+)	(-)
Safra	1946	(+)	(-)	(+)	(-)
İntraabdominal mayi	1829	(+)	(-)	(+)	(+)
İdrar	1760	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	285	(+)	(-)	(+)	(+)
Balgam	50	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	154	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	206	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	329	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	692	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	586	(+)	(-)	(+)	(+)
Balgam	1641	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	496	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	330	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	1762	(+)	(-)	(+)	(-)

Tablo 4.8. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre çeşitli virülans faktörlerinin incelenmesi (devamı)

BAL	108	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	1050	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	375	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	1836	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	1878	(+)	(-)	(+)	(+)
Dışkı	1983	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	1150	(+)	(-)	(+)	(-)
Safra	11	(+)	(-)	(+)	(+)
Balgam	1423	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	381	(-)	(-)	(+)	(-)
Kan	1679	(+)	(-)	(+)	(+)
ETA	2058	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	2055	(+)	(-)	(+)	(+)
İdrar	2091	(+)	(-)	(+)	(-)
ETA	2122	(+)	(-)	(+)	(-)
İdrar	2201	(+)	(-)	(+)	(-)
Safra	2148	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	374	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	951	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	2243	(+)	(-)	(+)	(+)
Safra	1430	(+)	(-)	(+)	(+)
BAL	1643	(+)	(-)	(+)	(-)
Balgam	1539	(+)	(-)	(+)	(-)
BAL	324	(+)	(-)	(+)	(+)
Doku	1688	(+)	(-)	(+)	(+)

Tablo 4.9. *Candida inconspicua* suşlarındaki çeşitli virülans faktörlerinin dağılım sıklığı

Virülans Faktörü (n=40)	Sayı (%)
Esteraz Aktivitesi	40 (%100)
Fosfolipaz Aktivitesi	39 (%97,5)
Çok Kuvvetli Aktivite	8 (%20)
Kuvvetli Aktivite	22 (%55)
Orta Aktivite	9 (%22,5)
Zayıf Aktivite	0 (%0)
Biyofilm Formasyonu	15 (%37,5)
Salgısal Aspartil Proteinaz Aktivitesi	0 (%0)

Bu çalışmada biyofilm formasyonu aktivitesi gözlenen suşların elde edildiği klinik örnek türleri arasında biyofilm formasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre biyofilm formasyonu aktivitesine ilişkin istatistiksel veriler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.10. Suşların elde edildiği klinik örnek türlerine göre biyofilm formasyonu varlığı açısından karşılaştırılması

	Biyofilm Formasyonu Sayı (%)			
Örnek Sayısı (N=40)	Var (%)*	Yok (%)*	(X ²)**	p
	15 (37,5)	25 (62,5)		
Örnek Türü				
BAL	3 (23,1)	10 (76,9)	2,650	0,265
Balgam	7 (53,8)	6 (46,2)		
Diğer	5 (35,7)	9 (64,3)		

*: Satır yüzdeleri verilmiştir.

**: Ki-kare testi kullanılarak hesaplanmıştır.

4.7. Suşların Çeşitli Antifungal Ajanlara Duyarlılıklarının Farklı Yöntemlerle Test Edilmesi

Bu çalışmada yer alan suşların sıvı mikrodilüsyon ve Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) test yöntemleri kullanılarak 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen MİK aralıkları, MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri ve geometrik ortalamaları (GO) ile ilgili veriler aşağıda gösterilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.11. Suşların test edilen antifungal ajanlar için sıvı mikrodilüsyon ve Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemleriyle saptanan MİK aralıkları, MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri ve geometrik ortalamaları (GO)

Antifungal Ajan	İnkübasyon Süresi (24. Saat)				İnkübasyon Süresi (48. Saat)			
	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GO	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	GO
Amfoterisin B	0,015-1	0,125	0,25	0,316	0,03-2	0,25	0,5	0,462
Flukonazol	4-64	16	32	27,892	4-128	32	64	38,794
Itrakonazol	0,125-1	0,25	0,5	0,235	0,25-1	0,25	0,5	0,255
Ketokonazol	0,125-1	0,25	0,5	0,395	0,125-1	0,25	0,5	0,412
5-Florositozin	0,125-64	1	4	4,078	0,25-64	2	8	5,238
Vorikonazol	0,03-1	0,125	0,25	0,215	0,03-2	0,125	0,5	0,333
Posakonazol	0,12-0,25	0,25	0,25	0,212	0,12-0,5	0,25	0,5	0,275
Mikafungin	0,015-0,06	0,03	0,03	0,029	0,015-0,06	0,03	0,03	0,029
Kaspofungin	0,03-0,25	0,12	0,12	0,107	0,03-0,25	0,12	0,12	0,112
Anidulafungin	0,015-0,12	0,06	0,12	0,049	0,015-0,25	0,06	0,12	0,058

Her iki test yöntemiyle elde edilen en yüksek MİK değerlerinin flukonazole ait olduğu, bunu 5-florositozinin izlediği saptanmıştır. Test edilen antifungallerin 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırıldığında; sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle bütün antifungaller, Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemiyle ise amfoterisin B, flukonazol, 5-florositozin, vorikonazol, posakonazol ve anidulafungin için elde edilen MİK değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.12. Antifungal ajanların her iki yöntemle 24 ve 48. saatlerde tespit edilen MİK değerlerinin karşılaştırılması

Antifungal MİK Değerleri	24.saat Ortanca (Min-Max)	48.saat Ortanca (Min-Max)	Ortalama Fark	<i>p</i>[*]
Amfoterisin B	0,125 (0,003-1,000)	0,250 (0,006-2,000)	-0,283	<0,001
Flukonazol	12,0 (4,0-32,0)	16,0 (4,0-64,0)	-10,0	<0,001
Itrakonazol	0,500 (0,125-1,000)	0,500 (0,250-1,000)	-0,375	0,003
Ketokonazol	0,250 (0,125-1,000)	0,500 (0,125-1,000)	-0,188	0,032
5-Florositozin	2,0 (1,0-8,0)	2,0 (1,0-16,0)	-1,5	<0,001
Vorikonazol	0,250 (0,060-1,000)	0,250 (0,120-1,000)	-0,250	<0,001
Posakonazol	0,250 (0,120-0,250)	0,250 (0,120-0,500)	-0,190	0,007
Mikafungin	0,030 (0,008-0,060)	0,030 (0,015-0,060)	-0,01	0,371
Kasprofungin	0,120 (0,008-0,250)	0,120 (0,015-0,250)	-0,045	0,058
Anidulafungin	0,060 (0,015-0,120)	0,120 (0,015-0,250)	-0,06	<0,001

5. TARTIŞMA

Vücutta normal flora elemanı olarak da bulunabilen *Candida* türleri, sıklıkla immün yetmezlikli hastalarda yaşamı tehdit edebilen enfeksiyonlara neden olmaktadır (158). Son yıllarda modern tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen; tanı ve tedavi amacıyla uygulanan invaziv yöntemler (Santral venöz katater, biyopsi işlemi, üriner katater, total parenteral beslenme vb.) nedeniyle deri ve mukozal yüzeylerin bütünlüğünün bozulması, kemoterapi ve diğer immünsupresif tedavi uygulamalarındaki artış, transplantasyon tekniklerindeki gelişmeler sonucu solid organ ve hematopoetik kök hücre transplant alıcılarındaki artış, yoğun bakım ünitesinde yatış, geniş spektrumlu veya kombine antibiyotik tedavi rejimleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak toplum ve hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonlarının sıklığında önemli bir artış ortaya çıkmıştır (159, 160). Bu enfeksiyonlardan en sık izole edilen patojen tür *Candida albicans* olmasına rağmen, özellikle fırsatçı mantar enfeksiyonları açısından yüksek riskli popülasyonlarda başta *Candida glabrata* olmak üzere *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin izolasyon sıklığında belirgin bir artış saptanmaktadır (138). Klinik örneklerden nadiren izole edilen, azollere ve diğer antifungal ajanlara karşı azalmış duyarlılıklarından dolayı önem arz eden ve invaziv kandidiyazise neden olan etkenler arasında görülme sıklığında son zamanlarda belirgin bir artış saptanan *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* ve *C. norvegensis* türlerinden, Latin Amerika'da *C. guilliermondii* ve *C. rugosa* türleri; Avrupa'da ise *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türleri daha belirgin olarak görülmektedir (40, 161).

Bu çalışmada; çeşitli klinik örneklerden *C. inconspicua* izole edilen hastaların demografik özellikleri, suşların elde edildiği vücut bölümleri ve örnek türleri, suşlar arasındaki evrimsel ilişki, suşların sahip olduğu çeşitli virülans faktörleri ile antifungal duyarlılık paternleri incelenmiştir.

Çalışmadaki *Candida inconspicua* suşlarının en sık izole edildiği örneklerin dahili kliniklere (18, %45) ait olduğu, bunu sırasıyla yoğun bakım üniteleri (9, %22,5), cerrahi klinikler (7, %17,5) ve polikliniklerden (6, %15) alınan örneklerin izlediği belirlenmiştir. Klinik örneklerinden *C. inconspicua* izole edilen her bir hasta; yaş grupları ve cinsiyet durumları yönünden incelendiğinde; hastaların 39'unun erişkin, birinin pediyatrik yaş grubunda bulunduğu ve erkek cinsiyetin hakim olduğu belirlenmiştir. Hastaların ortalama ve ortanca yaş değerleri sırasıyla 55,6±18,5 yıl, 57 yıl; yaş aralığı (8-93 yıl) olarak bulunmuştur.

Fransa'da 2006-2010 yılları arasında altı farklı üniversite hastanesinde *C. inconspicua* izole edilen sekizi erkek, ikisi kadın 10 hastanın bildirildiği bir çalışmada; hastaların yaş ortalaması 47,3; ortanca yaş değeri 47,5 olarak bulunmuştur (11). Baily ve arkadaşları; HIV ile enfekte yedi hastanın dördüne ait klinik örneklerden (ikisinde orofarinks ve özofagus lezyonlarından alınan sürüntü örnekleri ile diğer ikisinde balgam örnekleri) *C. inconspicua* izole etmiş olup, hastaların tamamının erkek olduğunu bildirmiştir (5).

Bu çalışmadaki izolatların elde edildiği hastalar; altta yatan hastalıklar açısından değerlendirildiğinde; 16'sında çeşitli maligniteler, altısında diabetes mellitus, yedisinde kronik böbrek yetmezliği, 11'inde ise yapısal akciğer hasarına yol açan farklı durumlar ve KOAH (Kronik obstruktif akciğer hastalığı)'ın bulunduğu, hastalardan sadece birinde nötropeni varlığı belirlenmiştir. Hastalar, *Candida* türlerine bağlı oluşan enfeksiyonlar için risk faktörleri açısından incelendiğinde; 32 hastada intravasküler kateter varlığı, 22 hastada üriner kateter varlığı ve 28 hastada ise *C. inconspicua* suşlarının izolasyonundan önce geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı saptanmıştır. Hastaların klinik seyirleri incelendiğinde 31 (%77,5) hastanın iyileştiği, 9 (%22,5) hastanın ise kaybedildiği görülmüştür. Kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü olmayan, 65 yaş ve altındaki erkek hastaların sağkalım yüzdesinin daha fazla olduğu tespit edilmekle beraber hastaların klinik seyirleri ile yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Literatürde bildirilen çalışmalar incelendiğinde; hematolojik maligniteye sahip üç hastadan ikisinde *C. inconspicua*'ya bağlı intravenöz kateterle ilişkili fungemi, diğerinde ise hepatit olgusu bildirilmiştir (6). Macaristan'da 1996-2001 yılları arasında Debrecen Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli poliklinik ve klinik bölümlerinde takip edilen 22 hastadan izole edilen 29 *C. inconspicua* suşunun klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, beş hastanın ayaktan, 17 hastanın ise yatarak tedavi edildiği bildirilmiş. Poliklinik takipli hastalarda ağır düzeyde vajinit ve mikotik tonsillit varlığı, hastanede yatan 17 hastanın 14'ünde ise fungal enfeksiyonlar açısından yatıklaştıran çeşitli durumların (Organ nakli, malignite, kistik fibrozis ve DM vb.) mevcut olduğu saptanmıştır (103). Guitard ve ark. (11) *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*'e bağlı gelişen 13 kandidemi epizodu ile literatürde bu konuya ilişkin önceden yapılan çalışmalardan elde edilen beş kandidemi epizodunu birlikte değerlendirdiği bir araştırmada; hastaların 12'sinde hematolojik malignite varlığı ile birlikte hepsinde intravasküler kateter varlığı, 15'inde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve 14'ünde ise nötropeni varlığı tespit edilmiş. 13 (%72) olguda esas olarak solunum ve gastrointestinal sistemlerde (sırasıyla yedi ve altı olgu), üç olguda da intravenöz kateterlerin yüzeyinde kandidemi öncesinde kolonizasyon varlığı saptanmıştır.

Bu çalışmadaki suşların, izole edildiği vücut bölümlerine göre dağılımı incelendiğinde; örneklerin %70'ini solunum yolu örneklerinin oluşturduğu ve tüm örnekler içerisinde BAL örneğinin *C. inconspicua*'nın en fazla izole edildiği klinik örnek türü (%35) olduğu görülmüştür. Balgam örnekleri ise *C. inconspicua*'nın ikinci sıklıkta izole edildiği klinik örnek türü (%30) olmuştur.

Fransa'da altı üniversite hastanesinde dört yıllık süre boyunca *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türleriyle ilişkili kandidemi epizodlarının klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin retrospektif olarak araştırıldığı ve literatürde bildirilen önceki bulgularla karşılaştırıldığı bir çalışmada; toplam 18 epizodun 13'ünden *C. inconspicua*, beşinden *C. norvegensis*'in sorumlu olduğu belirlenmiş. *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*'in ağırlıklı olarak gastrointestinal sistem [dışkı (sırasıyla %33 ve %32,2), oral kavite (sırasıyla %23,4 ve %16,2)] ve solunum yolu örneklerinden (sırasıyla %26 ve %28,2) izole edildiği bildirilmiş olup, bu örnekleri idrar (sırasıyla %8,4 ve %10) ve kan (sırasıyla %3,1 ve %3,5) takip etmiştir (11). Diğer bir çalışmada ise, tümü HIV ile enfekte ve uzun dönem flukonazol profilaksisi uygulanan hastalardan elde edilen

izolatların ikisi balgamdan, diğeri ikisi de oral kavite ve özofagustan izole edilmiştir (5).

Candida türlerinin tanımlanmasında kullanılan standart yöntemler, morfoloji ile birlikte asimilasyon ve fermentasyon reaksiyonlarına dayanmaktadır. Ribozomal RNA genlerinin nükleotid dizi analizleri çok çeşitli taksonomik düzeylerde filogenetik ilişkileri ortaya koymayı sağlamaktadır (162).

Candida inconspicua, fenotipik ve biyokimyasal özellikler bakımından sıklıkla *Candida norvegensis* ile karışabilmektedir. ITS gen bölgesindeki nükleotid dizilerinde yaklaşık %70 benzerlik gösteren bu türlerin, morfolojik ve biyokimyasal özelliklere dayalı rutin tanı yöntemleri aracılığıyla birbirinden ayırt edilmesinde birtakım zorluklar olduğu bildirilmektedir. Bu iki türün kesin ayrımında moleküler tanı yöntemlerine başvurulmaktadır (33, 103). Yapılan çalışmalarda, API ID32C (BioMérieux, Fransa) ticari tanımlama sistemi ve RAT ortamında psöдохif oluşturma yeteneği gibi fenotipik özelliklere dayalı gerçekleştirilen tür düzeyinde identifikasyon testlerinde *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*'in eskülin hidroliz aktivitesi de dahil biyokimyasal özellikler ve RAT ortamında psöдохif oluşturma yeteneği kullanılarak her zaman doğru ve güvenilir bir biçimde ayırt edilemeyeceği bildirilmiştir. Bu tarz "tanımlanması zor" maya türlerinin kesin olarak tanımlanmasında ITS ve/veya 28S rDNA'nın D1/D2 gen bölgelerinin PCR ürünlerinin dizi analizi, *Ascomycetes* sınıfındaki maya türleri için referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Literatürde, bu iki türün ayrımında çeşitli moleküler yöntemler kullanılmıştır. ITS1-ITS2 gen bölgeleriyle birlikte 5,8S rRNA'nın RFLP ve RAPD yöntemleriyle analizinin iki tür arasında ayrım yapabileceği belirtilmiştir (103, 104).

Bu çalışmadaki izolatlar; SDA (Conda, Madrid, İspanya) besiyerindeki koloni morfolojileri, mısır unlu-tween 80 agardaki mikroskopik görünümleri, Chromagar *Candida* (BioMérieux, Fransa) besiyerinde oluşturdukları koloni renkleri, üreaz enzim aktiviteleri ve API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari test kitiyle çeşitli karbonhidratları fermente/assimile etme kabiliyetleri gibi fenotipik özellikler kullanılarak başlangıçta *Candida norvegensis* olarak tanımlanmıştır. ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucu her üç gen bölgesinden elde edilen PCR ürünlerinin sekans dizilerinin BLAST analizi sonucu konvansiyonel yöntemlerle *C. norvegensis* olarak tanımlanan izolatlar, moleküler analiz sonucunda *C. inconspicua* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Literatürde *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın tür düzeyinde ayırımında çeşitli konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Fransa'da 2006-2010 yılları arasında altı üniversite hastanesinde bu türlerle ilişkili kandidemi olgularının klinik ve moleküler epidemiyolojik özellikleri araştırılmış. Kan kültürlerinden elde edilen 13 izolat, ilk önce API ID 32C (BioMérieux) ticari tanımlama sistemiyle eskülin hidroliz aktivitesi pozitif olan dört izolat *C. norvegensis*, eskülin hidroliz aktivitesi negatif olan dokuz izolat *C. inconspicua* olarak tanımlanmış. Bu izolatların 28 S rDNA'daki D1/D2 gen bölgelerinin dizi analizi sonucu elde edilen sekanslar "BLAST" yazılımı kullanılarak GenBank veri tabanında kayıtlı maya suşları ile karşılaştırıldığında, konvansiyonel yöntemlerle *C. norvegensis* olarak tanımlanan iki izolatin moleküler olarak *C. inconspicua* ile uyumlu olduğu saptanmıştır (11). Guitard ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Pichia cactophila* kladında yer alan yakın ilişkili türler *Pichia cactophila*, *Pichia insulana*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis* ve *P. pseudocactophila*'ya ait 13 klinik izolat ve dokuz referans suşun kesin tanımlanmasında biyokimyasal (API ID 32C), proteomik (MALDI-TOF MS) ve moleküler yöntemlerin (ITS1-ITS2, 28S rDNA'da bulunan D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgeleri kullanılarak) performansı değerlendirilmiş. API ID 32C (BioMérieux) yöntemiyle üç *C. norvegensis* suşu (bir referans suş ve iki klinik izolat) doğru şekilde tanımlanırken, bir *P. cactophila* referans suşu (CBS2155) tanımlanamış, moleküler analiz sonucu *C. inconspicua* olarak tanımlanan iki suş ise *C. norvegensis* olarak hatalı şekilde tanımlanmış. MALDI-TOF MS ile elde edilen proteomik profil ve EF-1 α gen bölgelerinin dizi analizinin, *C. norvegensis* ve *C. inconspicua* arasında ayırım yapmak için en etkili iki yaklaşım olduğu vurgulanmış, ayrıca *P. cactophila* kladındaki türlere ilişkin belirli suşlarda rDNA'da bulunan ITS1-ITS2 ve/veya D1/D2 gen bölgelerinin kromozom üzerinde birçok farklı allelik varyant içerdiği için tür ayırımında uygun olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, tür komplekslerini bile ayırt edebilen MALDI-TOF MS ve EF-1 α dizi analizi de dahil olmak üzere hiçbir durumda *C. inconspicua* ile *P. cactophila* türleri birbirinden ayırt edilememiştir (33).

CHROMagar Candida (Becton Dickenson, Sparks, ABD) besiyerinin *C. albicans* ile *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin hızlı bir biçimde ayırt edilmesinde kullanılan bir ortam olduğuna ilişkin artan sayıda çalışma bulunmaktadır. CHROMagar Candida besiyeri, koloni rengi ve morfolojisine dayalı olarak başlıca *C. albicans* (yeşil renkli koloni), *C. krusei* (soluk pembe renkli koloni) ve *C. tropicalis* (metalik mavi renkli koloni) türlerinin tanımlanmasına yönelik tasarlanan ayırt edici kromojenik bir

besiyeridir. Bazı çalışmalar, *C. dubliniensis* ve *C. glabrata*'nın da bu besiyeri kullanılarak güvenilir bir şekilde tanımlanabildiğini öne sürmektedir (108, 163). *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması, primer antifungal direnç paternlerinin göz önünde bulundurularak klinisyenlerin uygun antifungal tedavi rejimini seçmesine yardımcı olmaktadır. Klinik örneklerden daha nadir izole edilen 12 *Candida albicans* dışı *Candida* türü içerisinde yer alan 180 klinik izolatin ayırımında CHROMagar Candida besiyerinin kullanıldığı ve test edilen çoğu izolatin fildişi, pembe ve lavanta renklerinin çeşitli tonlarını barındıran koloniler ürettiğini bildiren bir çalışmada; *C. parapsilosis* izolatlarının koloni rengi ve morfolojisi açısından en çok varyasyon gösterdiği, *C. glabrata* izolatlarının zamanla koyu pembe renkten koyu mor renge dönüşen koloniler oluşturarak diğer *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinden ve *C. rugosa* izolatlarının ise soluk kenarlı, kaba, geniş morfolojiye sahip olmasına rağmen açık mavi-yeşil renkli koloniler ürettiğinden *C. krusei* ve benzer fenotipik özellik gösteren diğer *Candida albicans* dışı *Candida* türlerinden ayrılabilmeyle birlikte, 17 klinik *C. dubliniensis* izolatinın tamamının *C. albicans* gibi düzgün, konveks ve yeşil renkli koloniler oluşturduğu, altı klinik *C. inconspicua* izolatinın tamamı ile üç klinik *C. norvegensis* izolatinın bazılarının *C. krusei*'den ayırt edilemeyen kolonilere sahip olduğu belirtilmektedir (108). Başka bir çalışmada ise *C. glabrata*, son zamanlarda yapılan moleküler yaklaşımlar aracılığıyla *C. glabrata* kladında yer aldığı tespit edilen *C. bracarensis*, *C. nivariensis* ile *C. glabrata*'ya benzer fenotipik özellikler gösteren ve önceden *Pichia membranifaciens*/*P. fermentans* kladı içerisinde yer aldığı belirtilen *C. krusei*, *P. fermentans*, *C. inconspicua* ve *C. norvegensis* türlerine ait 154 referans ve klinik izolatin; fenotipik yöntemlere ilaveten CHROMagar Candida besiyerindeki koloni görünümü, API 20C (BioMérieux, Fransa) ticari test kiti ile karbonhidrat asimilasyon özellikleri ve D1/D2 gen bölgelerinin dizi analizi, peptid nükleik asit-fluoresan in situ hibridizasyon (PNA-FISH) gibi moleküler teknikler kullanılarak tür düzeyinde tanımlama işlemi gerçekleştirilmiş. Test edilen yedi türden beş tür (*C. glabrata*, *C. bracarensis*, *C. nivariensis*, *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*) içerisindeki 18 izolat, CHROMagar Candida besiyerinde *C. krusei* ve *P. fermentans* türlerinden ayırt edilebilen ancak; birbirlerinden ayırt edilemeyen benzer koloniler oluşturmuş. Moleküler yöntemlerle tanımlanan izolatlardan *C. glabrata* haricindekiler fenotipik yöntemler, diğer *Candida* türlerine nispeten daha az pozitif karbonhidrat asimilasyon reaksiyonu göstermeleri neticesinde API 20C (BioMérieux) test yöntemiyle yedi tür

arasında düşük düzeyde ayrım olması ve API 20C (BioMérieux) testi veri tabanında *C. bracarensis* ile *C. nivariensis* türlerinin yer almaması nedeniyle doğru bir biçimde tanımlanamıştır. Bu verilere dayanarak benzer fenotipe sahip *Candida* türlerinin güvenilir bir biçimde tanımlanmasında, kromojenik besiyerlerinin geniş bir renk aralığının yokluğundan dolayı sınırlı bir ayrım gücüne sahip olduğu; bu açıdan kesin tanımlama için moleküler tanı yöntemlerinin gerekli olabileceği vurgulanmaktadır (32).

Bu çalışmada yer alan izolatlar, benzer şekilde başlangıçta SDA besiyerindeki makroskopik morfoloji, mısır unlu-tween 80 agardaki mikroskopik görünüm, üreaz enzim aktivitesi gibi fenotipik tanı yöntemlerine ek olarak CHROMagar *Candida* besiyerindeki koloni görünümü ile API 20C AUX (BioMérieux) test stribindeki karbonhidrat asimilasyon özelliklerinden yararlanılarak *C. norvegensis* olarak tür düzeyinde tanımlanmış ancak; moleküler tanımlama için gönderilen izolatların ITS1/ITS2, D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgelerinin dizi analizi sonucunda *C. inconspicua* ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Ribozomal RNA (rRNA) genlerinin nükleotid dizi analizleri çok çeşitli taksonomik düzeylerde filogenetik ilişkileri ortaya koymayı sağlamaktadır. Nükleer küçük alt birim dizileri (16 S benzeri) nispeten daha yavaş değişim göstermekte ve yakın ilişkili olmayan organizmaların incelenmesi için kullanılabilir. Buna karşın; nükleer rRNA tekrar birimlerinin ITS ve IGS gen bölgeleri daha hızlı evrimsel değişime uğraması sebebiyle aynı cins içerisindeki türler arasında farklılık göstermektedir (162).

Bu çalışmada ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri hedef alınarak gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda elde edilen diziler arasındaki evrimsel yakınlığı belirleyebilmek amacıyla Genbank veri tabanında kayıtlı *Pichia captophilia* kladı içerisinde yer alan bazı referans suşlar ve dış grup olarak *C. krusei* referans suşuna ait diziler kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile her üç gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşturulduğunda, çalışmadaki bütün *C. inconspicua* suşlarının incelenen her bir gen bölgesi için dizi sonuçları ortak olduğu için suşlar benzer küme içerisinde gruptandırılmıştır. Yakın ilişkili diğer tür *C. norvegensis*'in ise her üç gen bölgesi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda *C. inconspicua*'dan ayrı bir küme içerisinde gruptandığı gözlenmiştir.

Hematolojik maligniteli üç hastada *Candida inconspicua* ile ilişkili invaziv kandidoz gelişen üç olgunun klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin araştırılmış. İzole edilen üç

suşun, RFLP ve RAPD yöntemleriyle benzer DNA paterni sergilediği ve üç olgu da son bir aylık süreçte yan yana tek kişilik odalarda kalan hastalarda meydana geldiği için suşlar arasında klonal ilişki varlığı ortaya konularak ortak bir kaynağa bağlı hastane kaynaklı bir enfeksiyon ihtimali düşünülmüştür (6). Guitard ve ark. (33) çalışmada yer alan 13 klinik izolat ve 9 referans suş için her üç gen bölgesi (ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 alfa ve D1/D2 gen bölgeleri) kullanılarak elde edilen dizilerle beraber GenBank veri tabanında kayıtlı kendi dizilerini de dahil ederek Neighbour-joining yöntemiyle filogenetik ağaç oluşturmuş. *Candida krusei* ATCC 24210 referans suşu dış grup olarak kullanılırken, analiz edilen her üç gen bölgesinden elde edilen filogenetik ağaçların topolojileri benzer olmuştur. *Pichia norvegensis* suşlarının %89-100 “bootstrap” yüzdesiyle; *P. insulana*, *C. inconspicua* ve *P. cactophila* suşlarının da %99,7-99,9 “bootstrap” yüzdesiyle tek bir küme içerisinde toplandığı tespit edilmiştir (33). *C. inconspicua*’nın evrimsel açıdan kökeni ve genetik çeşitliliği hakkında yeni bilgiler edinmek amacıyla, *C. inconspicua* (CBS180) referans suşu ile birlikte 10 klinik *C. inconspicua* suşunun tüm genom dizi analizi yapılmış, analiz sonucunda test edilen bütün suşlarda heterozigotluk kaybı mekanizmaları tarafından düzenlenen ve hibrit bir genomun göstergesi olan yüksek düzey genetik heterojenite varlığı tespit edilmiş. Araştırmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, *C. inconspicua*’nın fırsatçı bir insan patojeni olarak ortaya çıkmasında hibridizasyon mekanizmasının potansiyel rolü vurgulanmıştır (164).

Candida türleriyle ilişkili enfeksiyonların patogenezi araştırılan çalışmalarda, konak savunma sistemleri ile birlikte *Candida* türlerine ait virülans faktörlerinin de aktif rol oynadığı bildirilmektedir. Bu virülans faktörlerine; canlı-cansız yüzeylerde biyofilm oluşumu ve çeşitli ekstraselüler hidrolitik enzimlerin (Proteazlar, fosfolipazlar, esterazlar ve hemolizinler) sekresyonu örnek verilebilir (56, 60, 67). Bu çalışmadaki suşlar çeşitli virülans faktörleri açısından incelendiğinde; tamamının esteraz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiş. Suşların %97,5’inin fosfolipaz aktivitesi sergilediği ve fosfolipaz aktivitesine sahip olanlar içerisinde de çok kuvvetli ve kuvvetli fosfolipaz aktivitesi gösterenlerin daha fazla olduğu, %37,5’inde biyofilm formasyonu varlığı gözlenmiştir. Suşların hiçbirinde SAP aktivitesi gözlenmemiştir. Biyofilm formasyonu ile suşların elde edildiği klinik örnek türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Literatürde *Candida* türlerindeki virülans faktörlerinin incelendiği çalışmalarda, çeşitli test yöntemleri ve farklı kaynaklardan izole edilen suşların kullanıldığı görülmektedir.

Bu konuya ilişkin insanlarda yapılan çalışmalarda, Avrupa ve Japonya'dan elde edilen 22 *C. inconspicua* ve 16 *C. norvegensis* klinik izolatlarında potansiyel bir virülans faktörü olarak SAP ve fosfolipaz B gibi ekstraselüler enzim aktiviteleri araştırılmış. İzolatların hiçbirinde de bu enzimlerin varlığına rastlanmamıştır (35). Başka bir çalışmada, Macaristan'daki bir Üniversite Hastanesi'nde çoğu yoğun bakımda takip edilen hastalarda görülen 127 kandidemi epizodunun sadece birinin *C. inconspicua*'ya bağlı geliştiği ve bu izolatın virülansında potansiyel rolü olduğu düşünülen faktörlerden biri olan biyofilm aktivitesinin kristal viyole ile boyama ve XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) redüksiyon analizleri kullanılarak incelendiğinde düşük düzeyde olduğu bulunmuştur (74). Geleneksel alkollü içeceklerde (Palm yağı şarabı ve “*tchapalo*”) bulunan yedi *C. inconspicua* izolatındaki virülans faktörlerinin araştırıldığı çalışmada, izolatların tamamının esteraz aktivitesi sergilediği; beş izolatta düşük, diğer ikisinde orta düzey biyofilm oluşumu saptanmış. İzolatların hiçbirinde fosfolipaz ve SAP aktivitesi görülmemiştir (56). Hayvan modeli kullanılarak yapılan deneysel bir çalışmada ise; test edilen 25 klinik örnekten birinde saptanan *C. inconspicua* suşunda yüksek düzey SAP enzimi aktivitesi ve biyofilm oluşumu gözlenirken, fosfolipaz ve esteraz enzim aktiviteleri gözlenmemiştir (60).

Candida türlerinin klinik pratikte yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlara karşı direnç oranlarında belirgin artış tespit edilmektedir (165). Bu nedenle tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesi, optimal tedavi seçimi ve enfeksiyon kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır (166, 167). *Candida* spp. klinik örneklerden saptanan fırsatçı fungal etkenler arasında ilk sırada olması, özellikle kritik hastaların takip edildiği bölümlerde yaygın bir şekilde profilaktik antifungal kullanımına neden olup; antifungallere dirençli ya da orta duyarlı suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Fungal patojenlerin dirençli suşlarının görülme sıklığındaki bu artış, in vitro antifungal duyarlılık testlerine olan ihtiyacın artmasına neden olmuştur (168). Bu çalışmadaki *C. inconspicua* suşlarının çeşitli antifungal ajanlara duyarlılıkları; sıvı mikrodilüsyon ve Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemleriyle test edilmiştir. CLSI M60-Ed2 ve EUCAST E-Def 7.3.2 rehberlerinde hem *C. inconspicua* hem de *C. norvegensis* türlerine yönelik belirlenmiş klinik sonlanım noktaları bulunmadığı için suşların MİK değerleri duyarlı, doza bağlı duyarlı veya dirençli şeklinde yorumlanamamış; ayrıca her iki türün de ECV değeri olmaması sebebiyle test edilen antifungaller açısından

suşlar arasında WT ve non-WT ayrımı yapılamamıştır. Her iki test yöntemiyle elde edilen en yüksek MİK değerlerinin flukonazole ait olduğu, bunu 5-florositozinin izlediği saptanmıştır.

Test edilen antifungallerin 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda elde edilen MİK değerleri karşılaştırıldığında; sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle bütün antifungaller, Sensititre™ YeastOne™ AST Plate (Thermo Fisher Scientific™) yöntemiyle ise amfoterisin B, flukonazol, 5-florositozin, vorikonazol, posakonazol ve anidulafungin için elde edilen MİK değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Literatürde bildirilen çalışmalarda *Candida inconspicua* ve *Candida norvegensis* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılıkları çeşitli yöntemlerle test edilmiştir. Bailey ve arkadaşları, dört *C. inconspicua* suşunun dört farklı antifungal ajana (Flukonazol, itrakonazol, ketokonazol ve 5-florositozin) duyarlılıklarını sırasıyla; azol türevleri için sıvı makrodilüsyon yöntemi, 5-florositozin için hem sıvı makrodilüsyon hem de disk difüzyon yöntemi kullanarak araştırmış. Flukonazol, itrakonazol, ketokonazol ve 5-florositozin için MİK aralıklarını sırasıyla ($>12,5$ mg/L), (0,06-0,5 mg/L), (1-4 mg/L) ve (0,25-0,5 mg/L) olarak bildirmişlerdir (5). Sugita ve arkadaşları, Avrupa ve Japonya'da izole edilmiş 22 adet *C. inconspicua* ile 16 adet *C. norvegensis* klinik izolatlarının amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, mikonazol, flusitozin ve mikafungin için duyarlılık testlerini EIKEN kit (Eiken Chemical, Tokyo) mikropalak yöntemiyle gerçekleştirmiş ve MİK aralıklarını sırasıyla (0,25-1 mg/L), (8-64 mg/L), (0,5-1 mg/L), (1-4 mg/L), (2-8 mg/L), (0,03-0,06 mg/L) olarak bulmuşlardır (35). Guitard ve arkadaşları, 2006-2010 yılları arasında çoğunluğunu akut lösemili hastaların oluşturduğu hasta popülasyonunda saptanan kandidemi epizodlarından izole edilen 13 klinik izolatın (11 *C. inconspicua*, iki *C. norvegensis*) flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, amfoterisin B, kaspofungin ve 5-florositozin için duyarlılıklarını E-test yöntemi (BioMérieux) kullanarak test etmiş; her iki türü birlikte ele alınarak yapılan değerlendirme sonucu izolatların herbir antifungal için MİK₅₀ değerleri sırasıyla 64 mg/L, 0.25 mg/L, 0.125 mg/L, 0.19 mg/L, 0.094 mg/L, 0.19 mg/L ve 2 mg/L olarak bildirmiştir (11).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada yer alan *Candida inconspicua* suşları, çoğunlukla dahili kliniklerde takip edilen hastalara (18, %45) ait örneklerden izole edilmiştir. Bu durumun; dahili bölümler içerisindeki alt branş sayısının daha çok olması, dahili bölümlerde yatarak tedavi edilen hasta popülasyonlarında görülen çeşitli komorbiditelerin fungal enfeksiyonlar açısından risk artışına yol açması, yatan hastalardan invaziv girişimlerle de numune alınabilmesi, mikroorganizmanın belirli vücut bölümlerini (solunum ve gastrointestinal sistemler) daha çok tercih etmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.
2. Suşların elde edildiği hastaların %60'ının erkek olduğu ve çocuk yaş grubundaki bir kişi dışında tamamının erişkin yaş grubunda yer aldığı saptanmıştır. Erişkin hastaların yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde; en fazla hasta sayısının 45-64 yaş aralığında (20, %50), daha sonra ≥ 65 yaş (11, %27,5) olduğu görülmüştür. Çalışmadaki hastaların yaş gruplarına göre homojen bir dağılım göstermemesi ve yaşlanmaya birlikte immün sistem fonksiyonlarının bozulması nedeniyle *C. inconspicua* ile ilişkili enfeksiyonlar açısından ileri yaşın bir risk faktörü olabileceği düşünülmüştür.
3. Çalışmadaki suşların elde edildiği hastaların klinik seyirleri incelendiğinde 31 (%77,5) hastanın iyileştiği, dokuz (%22,5) hastanın ise kaybedildiği görülmüştür. Kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü olmayan, 60 yaş ve altındaki erkek hastaların sağkalım yüzdesinin daha fazla olduğu tespit edilmekle beraber hastaların klinik seyirleri ile yaş, cinsiyet, kemoterapötik ilaç kullanım öyküsü ve antifungal tedavi uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Kaybedilen hastalarda beraberinde ciddi sistemik hastalıkların da bulunması ve

antifungal tedavi uygulanan hasta sayısının azlığı gibi durumlar birlikte ele alındığında; klinisyenler tarafından çoğu olguda kolonizasyon şeklinde değerlendirilen bu tür ile ilişkili enfeksiyonlarda mortalite oranlarının daha da düşük olabileceği düşünülmüştür.

4. Bu çalışmadaki klinik örnek türleri; elde edildiği vücut bölümleri açısından solunum sistemi, gastrointestinal sistem, üriner sistem, steril vücut boşlukları ve doku ile genital sistem örnekleri şeklinde beş kategoride toplanmıştır. Suşların elde edildiği vücut bölümlerine göre dağılımı incelendiğinde; solunum sistemi örneklerinin ilk (28, %70), gastrointestinal sistem örneklerinin (5, %12,5) ikinci sırada yer aldığı tespit edilmiştir. Geriye kalan örnekler ise üriner sistem (3, %7,5), steril vücut boşlukları ve doku (3, %7,5) ile genital sistemden (1, %2,5) elde edilmiştir. Tüm örnek türleri tek başına ele alındığında; izolasyon sıklığı açısından BAL örneklerinin ilk (14, %35), balgam örneklerinin ise ikinci sırada (12, %30) yer aldığı bulunmuştur. Bu durumun; mikroorganizmanın orofarenks ve solunum sisteminin normal florasında yer alması, biyofilm formasyonu görülen suşların daha çok solunum sistemi örneklerinde saptanması gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu düşünülmüştür.

5. Klinik örneklerden izole edilen suşlar, konvansiyonel yöntemlerle başlangıçta *Candida norvegensis* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın fenotipik açıdan yüksek benzerlik göstermesi, aynı monofiletik grup içerisinde yer alması ve iki türün ayırımında yüksek duyarlılığa sahip bir test olan eskülin hidrolaz enzim aktivitesinin API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) test panelinde bulunmaması nedeniyle başlangıçta *Candida norvegensis* olarak tanımlanan bütün izolatlar; ITS1-5,8S-ITS2, D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgelerinden elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi sonucunda *C. inconspicua* olarak tanımlanmıştır. Fenotipik ve genotipik özellikler açısından yüksek benzerlik gösteren *C. norvegensis* ve *C. inconspicua*'nın tür düzeyinde kesin olarak tanımlanmasında rutinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin yetersiz olduğu; ancak DNA dizi analizi yönteminin kuvvetli ayırım gücüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Moleküler tanı yöntemlerinin olmadığı durumlarda eskülin hidroliz aktivitesinin de iki türün doğru şekilde ayırımında kullanılabileceği belirlenmiştir.

6. Moleküler yöntemlerle elde edilen sonuçlar ve klinik/moleküler epidemiyolojik bilgiler göz önüne alınarak, suşların klonal dağılımı belirlenmekte ve suşların hangi kaynaktan köken aldığına karar verilmektedir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar ile klonal ilişkilerin değerlendirilmesi, çoklu ilaç dirençli patojenler başta olmak üzere

enfeksiyon etkenlerinin yayılımının sınırlandırılması ve uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından önemlidir. ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 ve EF-1 alfa gen bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz sonucunda suşlara ait diziler arasında nükleotid varyasyonlarına rastlanmamıştır. Her üç gen bölgesinin türler arasındaki ayırım için elverişli olduğu ancak; evrimsel süreç boyunca tür içerisinde korunmuş olabileceği ve bu nedenle kökenlerle ilgili moleküler epidemiyolojik araştırmalarda MLST ve PFGE gibi farklı moleküler yaklaşımlara ihtiyaç olduğu belirlenmiştir.

7. EUCAST ve CLSI gibi rehberlerde *C. inconspicua* için ECV değeri bulunmadığından, test edilen antifungal ajanlara göre suşlar, WT ve non-WT şeklinde ayrılamamış; CBP değeri bulunmaması nedeniyle klinik direnç sınır değerleri de yorumlanamamıştır. Çalışmada test edilen antifungal ajanlar arasında flukonazolün hem sıvı mikrodilüsyon hem de Sensititre™ YeastOne™ AST Plate [Thermo Fisher Scientific™)] yöntemleriyle en yüksek MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri gösterdiği belirlenmiş olup, antifungal tedavi seçiminde bu durumun göz önünde bulundurulması vurgulanmıştır.

8. Bu çalışmada biyofilm formasyonu gözlenen suşların elde edildiği klinik örnek türleri arasında biyofilm formasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu durumun; *C. inconspicua*'nın klinik enfeksiyonlarla ilişkisinin net bir şekilde ortaya konamaması, çalışmadaki suş sayısının görece azlığı ve mikroorganizmanın biyofilm oluşumunda gerekli olan ortam koşullarının bilinmemesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

9. *C. inconspicua* suşlarının antifungal duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi ve antifungal ajanlara karşı direnç durumunun izlenmesi; ampirik tedavi seçiminde klinisyenlere yol göstermek ve akılcı antifungal ilaç uygulama politikalarına öncülük etmek açısından son derece önemlidir. EUCAST, CLSI gibi rehber dökümanlarda bu türe özgü ECV ve CBP değerlerinin bulunmaması, antifungal duyarlılık testlerinin yorumlanması ve klinik yanıtın öngörülmesinde sorunlara yol açmaktadır. Nadir izole edilen bu türün klinik önemine ilişkin verilerin az sayıda olması nedeniyle farklı bölgelerde bulunan klinik merkezlerin lokal süzveyans programlarından (*C. inconspicua*'nın tür düzeyinde kesin tanımlama/ antifungal duyarlılık testlerinin gerçekleştirilmesi) elde edilen epidemiyolojik verilerin kapsamlı bir metaanalizinin yapılması ECV ve CBP değerlerinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır. *Candida norvegensis* ile birlikte *Pichia captophilia* kladının diğer üyelerinin (*P. captophilia*, *P. pseudocaptophilia*, *P. insulana*, *C. inconspicua*) doğru bir şekilde tanımlanması, bu

türlerin coğrafi bölgelere göre dağılımlarının belirlenmesi, kolonizasyon/etken ayrımının kesin bir şekilde yapılması, hastalık etyopatogenezinde rol oynayan virülans faktörlerinin saptanması ve antifungal direnç paternlerinin belirlenmesi için daha fazla sayıda suşla yapılacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Azoulay E, Dupont H, Tabah A, et al. Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection. *Crit Care Med* 2012;40(3):813-22.
2. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, et al. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* 2011;39(4):665-70.
3. Leask BG, Yarrow D. *Pichia norvegensis* sp. nov. *Sabouraudia* 1976;14(1):61-3.
4. Nielsen H, Stenderup J, Bruun B, et al. *Candida norvegensis* peritonitis and invasive disease in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1990;28(7):1664-5.
5. Baily GG, Moore CB, Essayag SM, et al. *Candida inconspicua*, a fluconazole-resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1997;25(1):161-3.
6. D'Antonio D, Violante B, Mazzoni A, et al. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1998;36(3):792-5.
7. Kiraz N, Akay OM, Sen Y, et al. *Candida norvegensis* fungaemia in a neutropenic patient with acute non-lymphoblastic leukaemia. *Mycoses* 2010;53(5):460-2.
8. Krukowski H, Lisowski A, Rozanski P, et al. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. *Pol J Vet Sci* 2006;9(3):181-4.
9. Callon C, Duthoit F, Delbes C, et al. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* 2007;30(7):547-60.

10. Hellstrom Am, Vazques-Juarez R, Svanberg U, et al. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa. *Int J Food Microbiol* 2010;136(3):352-8.
11. Guitard J, Angoulvant A, Letscher-Bru V, et al. Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Med Mycol* 2013;51(8):795-9.
12. Ables AZ, Blumer NA, Valainis GT. Fluconazole prophylaxis of severe *Candida* infection in trauma and postsurgical patients: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 2000;9(4):169-75.
13. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, et al. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35(5):627-30.
14. Pfaller MA, Diekema DJ, International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10 Suppl 1:11-23.
15. Sandven P, Nilsen K, Digranes A, et al. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(6):1375-6.
16. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(2):153-8.
17. Putignani L, Del Chierico F, Onori M, et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst* 2011;7(3):620-9.
18. Eschenauer G, Depestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3(1):71-97.
19. Arikan S, Sancak B, Hascelik G. In vitro activity of caspofungin compared to amphotericin b, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. *Med Mycol* 2005;43(2):171-8.
20. Dodds Ashley ES. Treatment options for invasive fungal infections. *Pharmacotherapy* 2006;26(6 Suppl 2):55-60.

21. Gabardi S, Kubiak DW, Chandraker AK, et al. Invasive fungal infections and antifungal therapies in solid organ transplant recipients. *Transpl Int* 2007;20(12):993-1015.
22. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002;50(4):243-60.
23. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (7th ed, vol 2) Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia 2010, pp. 3225-41.
24. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA (editor), *Candida* and Candidiasis (1st ed) ASM Press, Washington DC 2002, pp. 3-13.
25. Dietrichson E. Etude D'une Collection Norvégienne De Levures. *Ann Parasitol* 1954;24:272–88.
26. Lodder J. The Yeasts, a Taxonomic Study. North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1970.
27. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, et al. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *Bmc Evol Biol* 2006;6:99.
28. Maren G, Coleman D, Sullivan D. An Introduction to the Medically Important *Candida* Species. In: Calderone RA, Clancy JC (eds). *Candida* and Candidiasis (2nd ed). ASM Press, Washington DC 2012, pp. 11-25.
29. Papon N, Courdavault V, Clastre M, et al. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog* 2013;9(9):e1003550.
30. Hou X, Xiao M, Chen SC, et al. Identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a multi-center Chinese collection of yeasts. *Front Microbiol* 2017;8:5.
31. Brandt ME, Lockhart SR. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Curr Fungal Infect Rep* 2012;6(3):170-7.
32. Bishop JA, Chase N, Lee R, et al. Production of white colonies on Chromagar *Candida* medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J Clin Microbiol* 2008;46(10):3498-500.

33. Guitard J, Atanasova R, Brossas JY, et al. *Candida inconspicua* and *Candida norvegensis*: new insights into identification in relation to sexual reproduction and genome organization. J Clin Microbiol 2015;53(5):1655-61.
34. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. Clin Microbiol Infect 2011;17(5):750-5.
35. Sugita T, Takeo K, Ohkusu M, et al. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production. Microbiol Immunol 2004;48(10):761-6.
36. White TJ, Bruns TD, Lee SB. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, New York 1990, pp. 315-22.
37. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35(1):19-25.
38. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol 2010;48(4):1366-77.
39. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2004;42(10):4419-31.
40. Enache-Angoulvant A, Girard A, Poirot JL, et al. In vitro activity of caspofungin and voriconazole against uncommon *Candida* spp. Int J Antimicrob Agents 2009;33(6):595-6.
41. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, et al. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from

- the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J Clin Microbiol 2006;44(10):3578-82.
42. Majoros L, Kardos G, Pócsi I, Szabó B. Distribution and susceptibility of *Candida* species isolated in the Medical University of Debrecen. Acta Microbiol Immunol Hung 2002;49(2-3):351-61.
 43. Nielsen H, Stenderup J. Invasive *Candida norvegensis* infection in immunocompromised patients. Scandinavian Journal Of Infectious Diseases 1996;28(3):311-2.
 44. Ahearn DG, Mcglohn MS. In vitro susceptibilities of sucrose-negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, and *Candida norvegensis* to amphotericin b, 5-fluorocytosine, miconazole, and ketoconazole. J Clin Microbiol 1984;19(3):412-6.
 45. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. Int J Infect Dis 2010;14(11):e954-66.
 46. Kurtaran B, Taşova Y. *Candida* enfeksiyonları. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler), Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi kitabında (3. baskı) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2008, ss.743-752.
 47. Brillowska-Dabrowska A, Bergmann O, Jensen IM, et al. Typing of *Candida* isolates from patients with invasive infection and concomitant colonization. Scand J Infect Dis 2010;42(2):109-13.
 48. Woo HY, Park SH, Lee DG. Two cases of *Candida inconspicua* infection in neutropenic patients with acute leukemia. Infection and Chemotherapy 2006; 164-8.
 49. de Groot PW, Bader O, de Boer AD, et al. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. Eukaryot Cell 2013;12(4):470-81.
 50. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Mol Microbiol 2006;60(1):5-15.
 51. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, et al. Biofilm formation on dental c restorative and implant materials. J Dent Res 2010;89(7):657-65. Douglas LJ.

- Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003;11(1):30-6.
52. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 2002; 45(5-6):160-5.
 53. Perfect JR. Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(7):1577-83.
 54. Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C, et al. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. FEMS Microbiol Rev 2001;25(2):245-68.
 55. Egue LAN, Bouatenin JKM, N'guessan FK, et al. Virulence factors and determination of antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from palm wine and sorghum beer. Microb Pathog 2018;124:5-10.
 56. Giacobbe DR, Mikulska M, Tumbarello M, et al. Combined use of serum (1,3)- β -D-glucan and procalcitonin for the early differential diagnosis between candidaemia and bacteraemia in intensive care units. Crit Care 2017;21(1):176.
 57. Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler), Enfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi Kitabında (4. Baskı) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2017, ss. 2115-29.
 58. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. Mycopathologia 2011;171(5):299-323.
 59. Mroczyńska M, Brillowska-Dąbrowska A. Virulence of clinical *Candida* isolates. Pathogens 2021;10(4):466.
 60. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol 2013;62(1):10-24.
 61. Gacser A, Stehr F, Kroger C, et al. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. Infect Immun 2007;75(10):4710-8.
 62. Silva S, Negri M, Henriques M, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev 2012;36(2):288-305.
 63. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004;17(2):255-67.

64. Güdücüoğlu H, Berktaş M, Bozkurt H, et al. The biofilm production (SLIME) and fluconazole sensitivity of the *Candida* strains isolated from the mouth flora of newborns and adults. Eastern Journal Of Medicine 2013; 10(1-2): 5-9.
65. Pittet D, Li N, Woolson RF, et al. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. Clin Infect Dis 1997;24(6):1068-78.
66. Keçeli Özcan S. Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2007;27:589-600.
67. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(9):2475-9.
68. Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, et al. Antifungal activity of amphotericin b, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(11):3499-505.
69. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002;40(4):1244-8.
70. Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology (Reading) 2003;149 Suppl 2:353-62.
71. Lewis RE, Lo HJ, Raad II, et al. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(4):1153-5.
72. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. Drug Resist Updat 2004;7(4-5):301-9.
73. Vitalis E, Nagy F, Toth Z, et al. *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. Mycoses 2020;63(4):352-60.
74. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica 2002;81(2):101-10.
75. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology 2001;9(7):327-35.

76. Vargas K, Messer SA, Pfaller MA, et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 2000;38(10):3595-607.
77. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol* 1998;1(2):95-106.
78. Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(4):350-7.
79. Kurtzman CP. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (4th ed) Elsevier, Amsterdam (The Netherlands) 1998, pp. 273–352.
80. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008;46(1):120-8.
81. Ksiezopolska E, Gabaldon T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. *Genes (Basel)* 2018;9(9).
82. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012;18 Suppl 7:19-37.
83. Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother* 2012;46(7-8):1086-96.
84. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 2007;10(3):121-30.
85. Garcia-Effron G, Lee S, Park S, et al. Effect of *Candida glabrata* fks1 and fks2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-β-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(9):3690-9.
86. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(1):112-22.
87. Park S, Kelly R, Kahn JN, et al. Specific substitutions in the echinocandin target fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3264-73.

88. Barchiesi F, Tortorano AM, Di Francesco LF, et al. In-vitro activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of *Candida* spp. J Antimicrob Chemother 1999;43(2):295-9.
89. Majoros L, Kardos G, Feiszt P, et al. Efficacy of amphotericin b and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2005;56(1):253-4.
90. Dietrichson E. Etude D'une Collection Norvé'gienne De Levures. Ann Parasitol 1954;29:460-98.
91. Hood SV, Moore CB, Denning DW. Isolation of *Candida norvegensis* from clinical specimens: four case reports. Clin Infect Dis 1996;23(5):1185-7.
92. Sandven P, Qvist H, Skovlund E. Significance of *Candida* recovered from intraoperative specimens in patients with intra-abdominal perforations. Crit Care Med 2002;30(3):541-7.
93. Aly F, Blackwell C, Mackenzie D, et al. Chronic atrophic oral candidiasis among patients with diabetes mellitus—role of secretor status. Epidemiology & Infection 1991;106(2):355-63.
94. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):462-78.
95. Gokahmetoglu G, Mutlu Sariguzel F, Koc AN, et al. Determination of *Candida* colonization and *Candida* score in patients in anesthesia intensive care unit. Mikrobiyol Bul 2016;50(3):438-48.
96. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. A bedside scoring system ("*Candida* score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. Crit Care Med 2006;34(3):730-7.
97. Leroy G, Lambiotte F, Thevenin D, et al. Evaluation of "*Candida* score" in critically ill patients: a prospective, multicenter, observational, cohort study. Ann Intensive Care 2011;1(1):50.
98. Nieto MC, Telleria O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: epidemiology and antifungal susceptibility. Diagn Microbiol Infect Dis 2015;81(1):34-40.
99. O'leary RA, Einav S, Leone M, et al. Management of invasive candidiasis and candidaemia in critically ill adults: expert opinion of the European Society of

- Anaesthesia Intensive Care Scientific Subcommittee. *J Hosp Infect* 2018;98(4):382-90.
100. Fothergill AW. Medically Significant Fungi. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds), *Textbook of Diagnostic Microbiology* (5th ed) Elsevier, Missouri 2015, pp. 589-624.
 101. Tille PM. The Yeasts. In: Bailey & Scott's *Diagnostic Microbiology* (14th ed) Elsevier, Missouri 2017, p. 834.
 102. Majoros L, Kardos G, Belak A, et al. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J Clin Microbiol* 2003;41(11):5250-3.
 103. Nho S, Anderson MJ, Moore CB, et al. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):1036-9.
 104. Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, et al. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 1999;52(4):271-3.
 105. Szabó Z, Tóth B, Kovács M, et al. Evaluation of the new Micronaut-*Candida* system compared to the API ID32C method for yeast identification. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1824-5.
 106. Arastehfar A, Daneshnia F, Kord M, et al. Comparison of 21-plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA sequencing for a wide range of clinically isolated yeast species: improved identification by combining 21-plex PCR and API 20C AUX as an alternative strategy for developing countries. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:21.
 107. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, et al. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium Chromagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:1.
 108. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds), *Clinical Mycology* (1st ed) Churchill Livingstone, New York, NY 2003, pp. 195-239.

109. Birinci A, Tanrıverdi Çaycı Y. Mantar Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı. Türk Hij Den Biyol Derg. 2016;73(2):ss.175-82.
110. Kozel TR, Wickes B. Fungal Diagnostics. Cold Spring Harb Perspect Med 2014;4(4):a019299.
111. Held J, Kohlberger I, Rappold E, et al. Comparison of (1->3)- β -D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. J Clin Microbiol 2013;51(4):1158-64.
112. Saraçlı MA. Mikozyların moleküler tanısı: Neredeyiz? s: 33-45. Tuncer İ, Fındık D, Arslan U (ed), 4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Kongre Kitabı. 3-6 Mayıs 2005, Konya. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No: 49. Çatı Grafik, İstanbul.
113. Mohr JF, Sims C, Paetznick V, et al. Prospective survey of (1->3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. J Clin Microbiol 2011;49(1):58-61.
114. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. Crit Care 2016;20(1):149.
115. Ashbee HR. General Approaches For Direct Detection And Identification Of Fungi. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds), Manual Of Clinical Microbiology (11th ed, vol 2) ASM Press, Washington DC 2015, pp 1965-83.
116. Kuştimur S, Kalkancı A. Moleküler mikoloji laboratuvarının tasarımı, kurulması, yönetimi ve beklentiler. Moleküler Tanı Dergisi 2007;3(1):101-6.
117. Saraçlı MA. *Candida* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı: moleküler ve genetik tanı yöntemleri, s: 133-44. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (ed), *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Sempozyumu, Tutanaklar. 21-22 Haziran 2002, Eskişehir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No: 43 OGÜ Basımevi, Eskişehir.
118. Mirhendi H, Makimura K, De Hoog GS, et al. Translation elongation factor 1-alpha gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. Med Mycol 2015;53(3):215-24.

119. Nouripour-Sisakht S, Ahmadi B, Makimura K, et al. Characterization of the translation elongation factor 1-alpha gene in a wide range of pathogenic *Aspergillus* species. J Med Microbiol 2017;66(4):419-29.
120. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. Med Mycol 2014;52(7):674-88.
121. Kristensen R, Torp M, Kosiak B, et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycol Res 2005;109(Pt 2):173-86.
122. Kalkancı A, Kuştimur S, Güneş İ. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda invazif mantar enfeksiyonlarının tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması, s.178. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y (ed), *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Sempozyumu, Tutanaklar. 21-22 Haziran 2002, Eskişehir. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No:43 OGÜ Basımevi, Eskişehir.
123. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primers 2018;4:18026.
124. Darcan C, Türkyılmaz O. Yeni nesil dizileme teknolojisine genel bakış. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2018;5(1):41-9.
125. Artuso R, Fallerini C, Dosa L, et al. Advances in Alport Syndrome diagnosis using next-generation sequencing. Eur J Hum Genet 2012;20(1):50-7.
126. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 2005;437(7057):376-80.
127. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. Genomics 2016;107(1):1-8.
128. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. Mol Ecol Resour 2011;11(5):759-69.
129. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nat Biotechnol 2012;30(5):434-9.
130. Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of

- bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010;48(5):1549-54.
131. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; CLSI Suppl. M60-Ed2, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne (PA) 2020.
 132. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts; EUCAST Definitive Document (E.Def 7.3.2.) European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease. Basel (Switzerland) 2020.
 133. Pfaller MA, Arikan S, Lozano-Chiu M, et al. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 1998;36(9):2609-12.
 134. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007;20(1):133-63.
 135. Musso M, Giannella M, Antonini M, et al. Invasive candidiasis due to *Candida norvegensis* in a liver transplant patient: case report and literature review. Infect Dis Rep 2014;6(2):5374.
 136. Johnson EM, Arendrup MC. Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds), Manual Of Clinical Microbiology (11th ed, vol 2) ASM Press, Washington DC 2015, pp.2255-81.
 137. Glockner A, Cornely OA. *Candida glabrata*--unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. Mycoses 2015;58(8):445-50.
 138. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis 2009;48(12):1695-703.
 140. Ortega M, Marco F, Soriano A, et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. J Hosp Infect 2011;77(2):157-61.

141. Nolla-Salas J, Torres-Rodríguez JM, Grau S. Successful treatment with liposomal amphotericin b of an intraabdominal abscess due to *Candida norvegensis* associated with a gore-tex mesh infection. Scand J Infect Dis 2000;32(5):560-2.
142. Benavent C, Torrado-Salmerón C, Torrado-Santiago S. Development of a Solid Dispersion of Nystatin with Maltodextrin as a Carrier Agent: Improvements in Antifungal Efficacy against *Candida* spp. Biofilm Infections. Pharmaceuticals (Basel) 2021;14(5):397.
143. Lockhart SR, Warnock DW. Antifungal Agents. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC Landry ML, Funke G, Richter SS, Warnock DW (eds), Manual Of Clinical Microbiology (11th ed, vol 2) ASM Press, Washington DC 2015, pp. 2223-35.
144. Mccarty TP, Pappas PG. Invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am 2016;30(1):103-24.
145. Gonzalez-Lara MF, Sifuentes-Osornio J, Ostrosky-Zeichner L. Drugs in clinical development for fungal infections. Drugs 2017;77(14):1505-18.
146. Murrell D, Bossaer JB, Carico R, et al. Isavuconazonium sulfate: a triazole prodrug for invasive fungal infections. Int J Pharm Pract 2017;25(1):18-30.
147. Kullberg BJ, Viscoli C, Pappas PG, et al. Isavuconazole Versus Caspofungin in the Treatment of Candidemia and Other Invasive *Candida* Infections: The ACTIVE Trial. Clin Infect Dis 2019;68(12):1981-9.
148. Kullberg BJ, Vasquez J, Mootsikapun P, et al. Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: a patient-level pooled analysis of six clinical trials. J Antimicrob Chemother 2017;72(8):2368-77.
149. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. J Clin Microbiol 2012;50(9):2846-56.
150. Inci M, Altay MA, Koc AN, et al. Investigating virulence factors of clinical *Candida* isolates in relation to atmospheric conditions and genotype. Turk J Med Sci 2012;42 Suppl 2:1476-83.

151. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The Enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(10):4538-45.
152. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982;20(1):7-14.
153. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* spp. in vitro. *Sabouraudia* 1984;22(3):201-7.
154. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 2007;164(6):265-9.
155. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965;4(3):187-93.
156. Yucesoy M, Marol S. Determination Of Esterase Activity Of *Candida* Varieties. *Mikrobiyol Bul* 2003;37(1):59-63.
157. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67(3):400-28.
158. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(4):499-511.
159. Atalay MA, Sav H, Demir G. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin b ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Dergisi* 2012;28:149-51.
160. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009;52(3):197-205.
161. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006;43(1):3-14.
162. White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, New York 2009, pp. 315-22.
163. Odds FC, Davidson A. "Room Temperature" use of Chromagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38(3):147-50.

164. Mixao V, Hansen AP, Saus E, et al. Whole-Genome Sequencing Of The Opportunistic Yeast Pathogen *Candida Inconspicua* Uncovers Its Hybrid Origin. *Front Genet* 2019;10:383.
165. Keceli Ozcan S, Mutlu B, Dundar D, et al. Comparison of broth microdilution and E-test methods for the antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. strains isolated from blood cultures (Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde sıvı mikrodilüsyon ile E-test yöntemlerinin karşılaştırılması). *Mikrobiyol Bul* 2010;44(2):263-71.
166. Beder D, Esenkaya Taşbent F, Doğan M. Kan kültürlerinde tespit edilen *Candida* izolatlarının dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2020;34(3):77-85.
167. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, vd. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Ankem Derg* 2015;29(3):105-13.
168. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G. Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2013;27(1):25-30.