



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NON-ALBİCANS *CANDIDA* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Hulusi GÜVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2022

T.C

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**NON-ALBİCANS *CANDIDA* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Hulusi GÜVEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Filiz ORAK

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA Prof.Dr. Mustafa Altay ATALAY

KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hulusi GÜVEN



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2020/4-1 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim sürecinde ve tez çalışmamın konusunun belirlenmesinden son aşamaya gelene kadar bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz ORAK'a,

Eğitimim sürecinde her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm bölüm başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Murat ARAL'a, Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA'ya, Prof. Dr. Ekrem KİREÇCİ'ye, Doç. Dr. Özlem KİRİŞÇİ'ye,

Tezimin moleküler çalışma aşamasında yardımda bulunan KSÜ ÜSKİM Merkez Sekans Laboratuvarından Öğr. Gör. İbrahim Seyfettin ÇELİK ve ekibine,

Bilgi, tecrübe ve desteklerinden istifade ettiğim Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın değerli ekibine,

Beni yetiştiren, her zaman yanımda olan, ilgi ve desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım aileme, çalışma sürecinde büyük sabır gösteren ve bu zorlu süreç dahil hayatımın her anında yanımda olan değerli eşime, kader arkadaşına ve varlıklarıyla hayatıma neşe katan değerli yavrularıma,

Teşekkür ederim.

Temmuz-2022

Hulusi GÜVEN

NON-ALBİCANS *CANDIDA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Hulusi GÜVEN

ÖZET

Son yıllarda *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlarda çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması, başarılı ve etkili tedavi seçeneklerini ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle, *Candida* türlerinin doğru tanımlanması, yalnızca mevcut antifungallere duyarlılıktaki farklılık nedeniyle değil, aynı zamanda epidemiyolojik açıdan da önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen ve klinik örneklerden izole edilen non-albicans *Candida* türlerinin DNA dizi analizi ile belirlenmesi, sonuçların BD Phoenix otomatik tanımlama sistemi ile karşılaştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesidir.

Fenotipik olarak tanımlanmış toplam 82 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada, mantar rDNA'sının 5.8S bölümünde ITS genini amplifiye etmek için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. İzolatların amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole duyarlılıkları mikrobrot dilüsyon metoduna göre araştırıldı.

Örnek alınan hastaların demografik verileri incelendiğinde; yaş ortalaması $57,61 \pm 26,3$ olarak belirlendi. Örneklerin 42 (%51,22)'si kadın hastalardan izole edilmiştir. Erkek hastaların yaş ortalaması $59,77 \pm 27,49$ ve kadın hastaların yaş ortalaması $55,55 \pm 25,40$ olarak hesaplandı. Örneklerin 62 (%75,61)'si yoğun bakım ünitelerinden, 5 (%6,10)'i Hematoloji ve Onkoloji Kliniği ve 15 (%18,29)'i diğer klinik bölümlerden gönderilmiştir. İzolatların 54 (%65,85)'ü kandan, 25 (%30,49)'i idrardan, 2 (%2,44)'si yaradan ve 1 (%1,22)'i ise kataterden izole edildi.

BD Phoenix 100 otomatik tanımlama sistemi ile tanımlanan türler sıklık sırasına göre; 25 (%30,49)'i *C. tropicalis*, 25 (%30,49)'i *C. parapsilosis* kompleks, 17 (%20,73)'si *C. glabrata* kompleks, 4 (%4,88)'ü *C. krusei*, 4 (%4,88)'ü *C. kefyr*, 4 (%4,88)'ü *C. firmetaria*, 1 (%1,21)'i *C. lambika* ve 2 (%2,44)'si *C. norvegensis* idi.

DNA dizi analizine göre tanımlanan türler ise; 30 (%36,38)'u *C. tropicalis*, 25 (%30,49)'i *C. parapsilosis* kompleks, 19 (%23,17)'u *C. glabrata* kompleks, 5 (%6,10)'i *C. kefyr* ve 3 (%3,66)'ü *C. krusei* idi.

BD Phoenix sistemi moleküler yöntemle karşılaştırıldığında; 82 örnekten 62 (%75,60) tanesinin doğru tanımlandığı belirlendi. İki yöntem arasındaki kappa katsayısı 0,655 olarak hesaplandı ve sonuçlar uyumlu bulundu ($p < 0.001$). Fenotipik tanımlama yönteminin genel doğruluğu 0,756 bulundu.

Amfoterisin B test edildiğinde; *C. glabrata* kompleks izolatlarından 1 (%5,88)'i dirençli ($MİK_{90} = 4 \mu g/mL$) bulundu ve $MİK$ aralığı 0,0156 - 1 mg/L olarak saptandı. *C. krusei* izolatlarının tamamı amfoterisin B'ye duyarlı bulundu ($MİK_{90}$ değeri $\leq 1 \mu g/mL$). 4 (%16) *C. parapsilosis* kompleks izolatının amfoterisin B'ye dirençli olduğu ve $MİK$ aralığı 0,0156-1 mg/L olarak belirlendi. *C. tropicalis* izolatlarının ise sadece 1 (%4)'i amfoterisin B'ye dirençli bulundu ve $MİK$ aralığı 0,0312 - 1 mg/L olarak belirlendi.

Flukonazol test edildiğinde; *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının 7 (%28)'si ($MİK$ aralığı 0,5 - 32 mg/L), *C. glabrata* kompleks izolatlarının 6 (%35,29)'sı ($MİK$ aralığı 0,25 - 128 mg/L) ve *C. tropicalis* izolatlarından ise 9 (%36)'u flukonazole dirençli ($MİK$ aralığı 0,0312-32 mg/L) bulundu.

İtrakonazol test edildiğinde; *C. tropicalis* izolatlarının 11 (%44)'i ($MİK$ aralığı 0,0156 - 1 mg/L) ve *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının 9 (%36)'u itrakonazole dirençli ($MİK$ aralığı 0,0156-4 mg/L) bulundu.

Vorikonazol test edildiğinde; *C. tropicalis* izolatlarının 6 (%24)'sı ($MİK$ aralığı 0,0156 – 1) ve *C. parapsilosis* kompleks'e ait 3 (%12) ($MİK_{50} = 1,1$ ve 1) izolatın vorikonazole dirençli olduğu değerlendirildi.

Sonuç olarak *Candida* enfeksiyonlarında tür ve antifungal duyarlılığa özgü profilaksi veya tedavi uygulanacağı için, mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilecek tanı yönteminin seçimi kadar antifungal duyarlılık testlerinin kullanılmasının da önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antifungal duyarlılık testi, *Candida*, DNA dizi analizi

Sayfa Adedi: 94

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Filiz ORAK

MOLECULAR TYPING OF NON-ALBICANS *CANDIDA* SPECIES AND DETERMINATION OF THEIR ANTIFUNGAL SENSITIVITY

Master Thesis

Hulusi GÜVEN

ABSTRACT

The emergence of multi-drug resistance in infections due to *Candida* species in recent years has eliminated successful and effective treatment options. Therefore, the correct identification of *Candida* species is important not only because of the difference in susceptibility to available antifungals, but also from an epidemiological point of view.

The aim of this study is to determine the non-albicans *Candida* species isolated from clinical samples and sent to Kahramanmaraş Sutcu Imam University Microbiology Laboratory by DNA sequence analysis, compare the results with the BD Phoenix automatic identification system and determine their antifungal susceptibility.

A total of 82 phenotypically defined samples were included in the study. In the study, primers ITS1 and ITS4 were used to amplify the ITS gene in the 5.8S section of fungal rDNA. The susceptibility of the isolates to amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole was investigated using the microbroth dilution method.

When the demographic data of the sampled patients were examined; the mean age was determined as 57.61 ± 26.3 years. Forty-two (51.22%) samples were isolated from female patients.

The mean age of male patients was 59.77 ± 27.49 and mean age of female patients was calculated as 55.55 ± 25.40 . Of the samples, 62 (75.61%) were sent from intensive care units, 5 (6.10%) from Hematology and Oncology Clinic and 15 (18.29%) from other clinical departments. Of the isolates 54 (65.85%) were isolated from blood, 25 (30.49%) from urine, 2 (2.44%) from wound and 1 (1.22%) from catheter.

Species identified by the BD Phoenix 100 automatic identification system; 25 (30.49%) *C. tropicalis*, 25 (30.49%) *C. parapsilosis* complex, 17 (20.73%) *C. glabrata*

complex, 4 (4.88%) *C. krusei*, 4 (4.88%) *C. kefyr*, 4 (4.88%) *C. firmetaria*, 1 (1.21%) *C. lambika* and 2 (2.44%) *C. norvegensis*.

Species identified according to DNA sequence analysis were; 30 (36.38%) *C. tropicalis*, 25 (30.49%) *C. parapsilosis* complex, 19 (23.17%) *C. glabrata* complex, 5 (6.10%) *C. kefyr* and 3 (3.66%) were *C. krusei*.

When the BD Phoenix system is compared with the molecular method; It was determined that 62 (75.60%) of 82 samples were correctly identified. The kappa coefficient between the two methods was calculated as 0.655 and the results were found to be compatible ($p < 0.001$). The overall accuracy of the phenotypic identification method was found to be 0.756.

When amphotericin B was tested; 1 (5.88%) of the *C. glabrata* complex isolates were found to be resistant ($MIC_{90} = 4 \mu\text{g/mL}$) and the MIC range was determined as 0.0156 - 1 mg/L. All *C. krusei* isolates were found susceptible to amphotericin B (MIC_{90} value $\leq 1 \mu\text{g/mL}$). It was determined that 4 (16%) *C. parapsilosis* complex isolates were resistant to amphotericin B and the MIC range was 0.0156-1 mg/L. Only 1 (4%) of the *C. tropicalis* isolates were found resistant to amphotericin B and the MIC range was determined as 0.0312 - 1 mg/L.

When fluconazole was tested; 7 (28%) of *C. parapsilosis* complex isolates (MIC range 0.5 - 32 mg/L), 6 (35.29%) isolates of *C. glabrata* complex (MIC range 0.25 - 128 mg/L) and 9 (36%) of *C. tropicalis* isolates were resistant to fluconazole (MIC range 0.0312-32 mg/L).

When itraconazole was tested; 11 (44%) of *C. tropicalis* isolates (MIC range 0.0156 - 1 mg/L) and 9 (36%) *C. parapsilosis* complex isolates were resistant to itraconazole (MIC range 0.0156-4 mg/L) was found.

When voriconazole was tested; 6 (24%) isolates of *C. tropicalis* (MIC range 0.0156 – 1) and 3 (12%) ($MIC_{50} = 1.1$ and 1) isolates of *C. parapsilosis* complex were evaluated to be resistant to voriconazole.

As a result, since prophylaxis or treatment specific to species and antifungal susceptibility will be applied in *Candida* infections, it is thought that the use of antifungal

susceptibility tests is as important as the selection of the diagnostic method to be preferred in microbiology laboratories.

Keywords: Antifungal susceptibility testing, *Candida*, DNA sequence analysis

Page Number: 94

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Filiz ORAK



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mantarların Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Candida</i> türlerinin Genel Özellikleri	4
2.2.1. <i>Candida</i> türlerinin tarihçesi	4
2.2.2. <i>Candida</i> türlerinin sınıflandırılması.....	5
2.2.3. Ekoloji.....	6
2.2.4. <i>Candida</i> türlerinin morfolojik özellikleri	7
2.2.5. <i>Candida</i> türlerinin boyanma özellikleri.....	8
2.2.6. <i>Candida</i> türlerinin üreme özellikleri.....	8
2.3. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarında Patogenez	8
2.4. <i>Candida</i> Türlerinin Virülans Faktörleri	9
2.5. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	10
2.6. <i>Candida</i> Enfeksiyonları	13
2.6.1. Vulvovajinal kandidiyaz	14
2.6.2. Oral kandidiyaz.....	15
2.6.3. Sistemik kandidiyaz.....	15
2.6.4. Ülkemizde <i>Candida</i> enfeksiyonlarının epidemiyolojisi	15
2.7. <i>Candida</i> Türlerinin Laboratuvar Tanısı	16
2.7.1. Fenotipik yöntemler.....	16
2.7.1.1. Germ tüp testi, klamidospore oluşumu ve büyüme sıcaklığı	16
2.7.1.2. Karbon ve nitrojen asimilasyonu	16
2.7.1.3. Karbonhidrat Fermantasyonu	17
2.7.2. Hızlı ticari sistemler.....	17
2.7.2.1. API 20C Aux sistem	17

2.7.2.2. ID 32C sistemi	17
2.7.2.3. API <i>Candida</i> sistemi.....	18
2.7.3. Kromojenik ortam tabanlı ticari sistemler	18
2.7.3.1. CHROM agar <i>Candida</i> sistemi.....	18
2.7.3.2. <i>Candida</i> ID sistemi	19
2.7.3.3. Baxter MicroScan maya tanımlama paneli	19
2.7.3.4. Vitek YBC sistemi ve Vitek 2 ID-YST sistemi.....	19
2.7.4. Biyotipleme.....	20
2.7.4.1. Tween 80 opaklık testi.....	20
2.7.5. PCR tabanlı olmayan yöntemler	20
2.7.5.1. Peptit nükleik asit floresan <i>İn Situ</i> hibridizasyon protokolü.....	20
2.7.5.2. BD Phoenix cihazı ile identifikasyon yöntemi	21
2.7.6. Moleküler tanımlama yöntemleri.....	21
2.7.6.1. Multipleks-PCR	21
2.7.6.2. Nested-PCR	21
2.7.6.3. Gerçek zamanlı PCR (Real time PCR).....	21
2.8. Kandidiyazis Tedavinde Kullanılan Antifungal İlaçlar	22
2.8.1. Amfoterisin B	22
2.8.2. Azol bileşikleri.....	23
2.8.3. Flukonazol	23
2.8.4. Vorikonazol	23
2.8.5. İtrakonazol	24
2.8.6. Posakonazol	24
2.9. Mayalar İçin Antifungal Duyarlılık Testleri	24
2.9.1. Mayalar için CLSI sıvı besiyerinde dilüsyon	24
2.9.2. Ticari sıvı besiyerinde dilüsyon	25
2.9.3. E-test	25
2.9.4. Diğer agar bazlı test yöntemleri	25
2.9.5. Akan hücre sitometrisi ve vital boyaların kullanımı.....	25
2.9.6. Azole etkisinin doğrudan ölçümü: ergosterol sentezinin kantitasyonu	25
2.9.7. Mayalar ve küfler için diğer antifungal duyarlılık test yöntemleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazların Listesi	27

3.2. Maya Türlerinin İzole Edilmesi ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	27
3.2.1. Besiyerinin hazırlanması.....	28
3.2.2. Stok solüsyonlarının hazırlanması	28
3.2.3. Çalışma solüsyonunun hazırlanması.....	29
3.2.4. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması.....	30
3.2.5. Mikrodilüsyon Plaklarının Saklanması.....	30
3.2.6. Maya inokulumünün hazırlanması.....	30
3.2.7. Mikrodilüsyon Plaklarının inokülasyonu.....	30
3.2.8. Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu	31
3.2.9. Sonuç Okuma.....	31
3.2.10. Amfoterisin B	31
3.2.11. Azol grubu antifungaller	31
3.3. Tanımlama	31
3.3.1. BD Phoenix 100 Otomatize Tanımlama Sistemi	31
3.4. <i>Candida</i> İzolatlarının Homojenizasyon Basamağı	32
3.5. DNA İzolasyon Basamağı	33
3.5.1. DNA saflığının belirlenmesi	34
3.5.2. PCR ile gen bölgelerinin çoğaltılması	34
3.5.3. Agaroz jel elektroforezi	36
3.5.4. Sonuçların değerlendirilmesi	36
3.6. DNA Dizi Analizi	36
3.7. Filogenetik Analiz.....	39
4. BULGULAR	40
4.1. BD Phoenix 100 Tanımlama Sistemi ile İdentifikasyon	41
4.2. DNA Dizi Analiz Sonuçları	42
4.2.3. Tanımlama yöntemlerinin karşılaştırılması	42
4.4 Antifungal Duyarlılık Testi.....	45
4.4.1. Amfoterisin B ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları	45
4.4.2. Flukonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları	47
4.4.3. İtrakonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları	49
4.4.4. Vorikonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları	51
4.4.6. İstatistiksel Analiz.....	53
5. TARTIŞMA	56

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.	66
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	89
9. TABLOLAR DİZİNİ	90
10. EKLER DİZİNİ.....	92
11. ÖZGEÇMİŞ	94



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMB	: Amfoterisin B
CFU	: Colony Formit Unit
EUCAST	: European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLU	: Flukonazol
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
RPM	: Rate per minute
VOR	: Vorikonazol
İTRO	: İtrakonazol
WHO	: World Health Organization

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bulaşıcı hastalıkların doğası on yılda derin değişiklikler geçirmiştir. Bir zamanlar patojenik olmadığı veya daha az öldürücü olduğu düşünülen mantarlar, şimdi bağışıklığı baskılanmış ve ağır hastalarda morbidite ve mortalitenin birincil nedeni olarak kabul edilmektedir. *Candida spp.* en yaygın mantar patojenleri arasındadır. *Candida albicans* (*C. albicans*), kandidiyazisin önde gelen nedeni olmuştur. Ancak son zamanlarda *albicans* dışı *Candida* (Non-*albicans Candida* (NAC)) türlerine bağlı enfeksiyonlarda artış bildirilmiştir. Bu NAC türleri genellikle yaygın olarak kullanılan mantar önleyici ilaçlara karşı azaltılmış duyarlılık göstermektedir. Özellikle bazı NAC türlerinin azol grubu antifungal ajanlara karşı yüksek direnç gösterdiği bilinmektedir. Birçok çalışma, NAC türlerinin hasta örneklerinden izole edilen baskın patojenler olduğunu göstermiştir. NAC türleri, bir zamanlar *Candida albicans*'a atfedilen virülans faktörlerinin üretimini de göstermiştir. Bu nedenle, NAC türlerin önemli bir enfeksiyon nedeni olduğunu göstermektedir.

Candida türleri insan deri, ağız, gastrointestinal sistem ve mukoza florasında yer alan mikroorganizmalardır. Özellikle *C. albicans*, sistemik mikoz etkenlerinin başında yer almaktadır. Son yıllarda insanlarda hastalık yapan NAC türleri belirlenmiştir. Bu önemli türler; *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. kefyr*, *C. krusei* ve *C. glabrata* kompleks'dir (1,2). Birçok gelişmiş ülkede *Candida spp.* kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan ilk üç veya dört patojen arasında yer almaktadır (1, 2). ABD'de ulusal sağlık ve güvenlik ağından alınan verilere göre *Candida* türlerinin sağlıklı ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının %22'sine neden olduğu bildirilmiştir. *Candida spp.* dünya genelinde yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonların %18'inden sorumludur Ayrıca kandidemi vakalarının yaklaşık %50'si yoğun bakım ünitelerinde rapor edilmiştir.

Candida spp. enfeksiyonlarının prevalansında coğrafi konum önemli olmakla birlikte, merkezden merkeze ve klinikten kliniğe değişmektedir. *C. albicans*, en yaygın izole edilen *Candida* türü olmaya devam etmektedir. *C. albicans* hem yetişkin hem de pediatrik popülasyonda hastalığa neden olmaktadır (3, 4). NAC türlerinin prevalansındaki artışın nedenleri çoğu bölgede gereksiz yere kullanılan antifungal ilaçlar ve sağlık ekipmanlarında kontaminant olan *Candida* türlerindeki mutasyonlardır.

ABD ve kuzeybatı Avrupa'da, en yaygın ikinci tür, *C. glabrata* kompleks'dir (3, 4). Benzer şekilde, Latin Amerika, Güney Avrupa, Hindistan ve Pakistan'da NAC türleri içinde *C. parapsilosis* kompleks ve *C. tropicalis*'in *C. glabrata* kompleks'den daha yaygın olduğu bildirilmiştir (5, 6). İnvaziv kandidiyaz olgularında tanı ve etkili antifungal tedaviye başlamada 1-2 günlük bir gecikme, mortalitenin iki katına çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir (5, 6). İnvaziv kandidiyaza özgü hiçbir klinik belirti veya semptom bulunmamaktadır (5, 6). *Candida spp.* klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanabilmesine rağmen, klinik örneklerde bakteri ve mantar kontaminasyonunun sık görülmesi nedeniyle gerçek etken teşhis edilememektedir. Bu nedenle, invaziv kandidiyazın laboratuvar tanısında seçici besiyeri (bakteri üremesinin inhibitörlerini içeren), mantar duvar antijeni ve PCR testleri gibi ek spesifik tanı testleri kullanılması gereklidir. Kültür tabanlı olmayan, PCR tabanlı tanı teknikleri hızla gelişmektedir ve önümüzdeki 5 yıl içinde tanımlamada gelişmeler beklenmektedir (7-11). Buna karşılık, *Candida* mannan anti-mannan ve β -D-glukan antikorları içeren biyobelirteçler değişken ve biraz hayal kırıklığı yaratan performansa sahiptir. Bu klasik testlerin *Candida spp.* enfeksiyonu olan birçok hastada teşhis özgüllükleri ve duyarlılıkları genellikle sınırlıdır (12). PCR'nin invaziv kandidiyazisin saptanmasında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (13).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden (idrar, kan, yara vb.) izole edilen NAC izolatlarının DNA dizi analizi ile belirlenmesi, sonuçların tam otomatik tanımlama sisteminin test sonuçları ile karşılaştırılması ve izolatların antifungal duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarların Genel Özellikleri

İnsanlar tarih öncesi çağlardan beri maya ve mantarları çeşitli amaçlar için kullanmış olsalar da yakın zamana kadar mantarların biyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. 20. yüzyılın ortalarına kadar birçok bilim adamı mantarları bitki olarak sınıflandırmıştır. Mikoloji olarak adlandırılan bilimdalı mantarları inceler. Yunan kökenli ‘mykes (şapka)’ sözcüğünden türetilmiştir. Bilimde mantarlar fungus olarak isimlendirilmektedir. Mantarlar, çoğunlukla sapsız görünüşte bitkilere benzer gövde benzeri bir yapıya sahip oldukları gibi, toprakta kök benzeri bir mantar miselyumuna da sahiptirler. Ek olarak, beslenme biçimleri yeterince anlaşılamamıştır (14). Mantar genomunun moleküler analizi, mantarların hayvanlara bitkilerden daha yakın akraba olduğunu göstermiştir. Tek bir ortak atayı paylaşmak yerine, özellikleri paylaşan polifiletik bir organizma grubu olarak kabul edilmektedir. Yüz binden fazla farklı türü olduğu bilinen mantarların yalnızca 150-200 türünün insanda hastalığa neden olduğu ve bunlardan da 12 türün insan hastalıklarının %90’ından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle son 20 yıl içerisinde, kemoterapi alan hastalarda, organ nakli yapılan hastalarda ve hastanede uzun süre yatan hastalarda mantarlar ciddi enfeksiyonlara neden olduğu belirlenmiş ve bu nedenle önem kazanmıştır (14).

Mantarlar ökaryot canlılardır ve bu nedenle karmaşık bir hücresel organizasyona sahiptirler. Tek veya çok hücreli olabilmekle beraber, çok hücreli ve çok çekirdekli olma eğilimini gösterirler. Çekirdekteki DNA, diğer ökaryotik hücrelerde gözlendiği gibi histon proteinlerinin etrafına sarılır. Birkaç mantar türü, bakteriyel plazmitlerle (DNA halkaları) karşılaştırılabilir yapılara sahiptir; bununla birlikte, genetik bilginin bir olgun bakteriden diğerine yatay aktarımı mantarlarda nadiren meydana gelmektedir. Mantar hücreleri ayrıca mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı dahil olmak üzere karmaşık bir iç zar sistemi içermektedir. Bitki hücrelerinin aksine, mantar hücrelerinde kloroplast veya klorofil yoktur. Bitki hücreleri gibi, mantar hücrelerinin de kalın bir hücre duvarı vardır. Bu yapının %90’ını karbonhidratlar (mannan, glukan, galaktan, kitin polimerleri ve/veya selüloz), %10-20’si proteinler ve glikoproteinden oluşmaktadır (15,16).

Mantar hücre duvarlarının sert katmanları, kitin ve glukanlar adı verilen karmaşık polisakkaritler içermektedir. Böceklerin dış iskeletinde de bulunan kitin, mantarların hücre

duvarlarına yapısal güç vermektedir. Duvar, hücreyi dış etkenlerden korumaktadır. Mantarların diğer ökaryotlara benzer plazma zarları vardır, ancak hayvan hücre zarlarında bulunan kolesterolün yerini alan bir steroid molekülü yapısı olan ergosterol bulundurması ve bu yapı tarafından membran stabilize edilmesi mantarları diğer canlı hücrelerden ayıran önemli bir özelliktir. Mantar hücre zarı çift tabakalıdır ve fosfolipid, sifingolipid, glikoprotein ve sterol içermektedir. Mantar hücre zarında bulunan ergosterol, antifungal ilaçların etki ettiği yapı olup bu ilaçların mantar enfeksiyonlarında kullanımını sağlamaktadır. Mantarların bazı çeşitlerinde kapsül olarak adlandırılan polisakkarid yapı da bulunabilmektedir. Morfolojik yapılarına göre mantarlar iki sınıfa ayrılır; küf ve mayalar. Küf mantarları 25°C’de üremektedir. Küf mantarları ‘hif’ adı verilen 2-10 mm çapındaki ipliksi yapılardan oluşmaktadır. Hiflerin birleşmesi ile ‘miselyum’ adı verilen tüysü yapıları oluştururlar. Maya mantarları ise çoğunlukla tek hücreli ve tek çekirdekliidir. Uzamış lif benzeri, oval ve yuvarlak şekillerde bulunmaktadır. Mayalar 37°C’de uygun katı besiyerinde karakteristik beyaz ve opak veya krem renkli, yuvarlak kolonileri iki-üç günde oluşturabilmektedirler. Mukoid görünümlü mantarlarda kapsül bulunmaktadır. Küf ve maya formu dışında dimorfik mantarlar olarak adlandırılan mantarlar vardır. Bu mantarlar çevre şartlarına (besin içeriği, CO₂ basıncı, ısı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gibi) bağlı olarak 26°C’de küf, 35-37°C’de maya şeklinde üreme özelliği göstermektedirler (14). Mantarlar dış ortam şartlarına dayanıklıdır ve uygun şartlarda çimlenerek koloni oluşturabilen sporlara sahiptir. Dimorfik mantarlar, çevresel koşullara bağlı olarak tek hücreliden çok hücreli duruma geçiş göstermektedir. Tek hücreli mantarlara genel olarak maya denmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* (fırın mayası) ve *Candida* türleri (pamukçuk etkeni) tek hücreli mantar örnekleridir.

Mantarlar hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalmaktadır. Mantarlar mitozla sporlarını oluştururlarsa aseksüel (eşeysiz) spor, mayoz geçirmiş iki hücrenin sitoplazma ve çekirdeğinin birleşmesiyle oluşmuşlarsa eşeyli (eşeyli) spor oluşturmaktadırlar (17).

2.2. *Candida* Türlerinin Genel Özellikleri

2.2.1. *Candida* türlerinin tarihçesi

Candida’nın keşfi ve adlandırılmasının tarihi, antik Yunanlılardan günümüz araştırmacılarına kadar uzanmaktadır (18). *Candida*, insan konakçıda bir eksüda varlığından bilinen bir enfeksiyöz ajana dönüşmüştür. Kandidiyazisin tanımlanan ilk formu oral pamukçuk 200 yıllık tıbbi geçmişe sahiptir. 1923’te Christine Marie Berkhout, Utrecht Üniversitesi’ndeki doktora

çalışmasında *Candida* cinsi ve *albicans* türünü tanımlamıştır. "Pamukçuk", orofarenks veya bukkal mukoza veya dil içinde beyazımsı plaklar şeklinde görünmektedir. Pamukçuğu tanımlarken konakçıdan mı kaynaklandığı, bulaşıcı bir ajan mı yoksa ikisinin bir kombinasyonu mu olduğu tartışılmıştır. Pamukçuk ile ilgili en eski raporlar, mikrobiyal patojen kavramından önce oluşmuştur. "Of the Epidemics"de Hipokrat, oral kandidiyazisi (MÖ 400 civarında) "aftöz ülserasyonlardan etkilenen ağızlar" olarak tanımlamıştır (18).

1665'te Pepys Diary, oral pamukçuğun konakçıdan kaynaklandığını ileri sürerek "bir hastanın ateşi, pamukçuk ve hıçkırığı olduğunu" bildirmiştir (18). Mikologlar, Castellani'nin daha önceki pamukçuk açıklamalarını "ağız mukozasının hastalıklı salgıları" olarak kabul etmiştir (19). Bununla birlikte, birkaç klinisyen ve mikolog, popüler inancı, pamukçuğa neden olan bulaşıcı bir ajan fikrini ileri sürmüştür. 1771'de Rosen von Rosenstein, istilacı bir pamukçuk biçimi olarak tanımlamıştır (19). 1839'da Langenbeck, ilk kez tifolu bir hastada bir mantarı tanımlamıştır. Otopside ise psödomembranlı orofaringeal ve özofagus pamukçukları bulunmuştur. "Mikroskopta büyütülmüş objektifte, yalancı zarlar çok sayıda mantardan oluşuyordu." şeklinde bildirmiştir (19). 1844'te J.H Bennett, pnömotorakslı bir hastanın balgamında ve akciğerlerinde benzer bir mantar gözlemledi ve Langenbeck'e eleştiride bulunmuştur (19). Bennett'in morfolojik tanımı esasen Langenbeck tarafından bildirilen tarife benzer olduğu gözlemlenmiştir (19). İki yıl sonra Berg açık bir şekilde pamukçukun bir mantardan kaynaklandığını ve çocuklardaki enfeksiyonun yayılmasının ortak biberonlardan kaynaklandığı bildirmiştir. Berg yaptığı deneyde sağlıklı çocuklarda enfeksiyonu yeniden üretebilmiş ve böylece mantarın enfeksiyona neden olduğu hipotezini doğrulamıştır (19). Bu keşiften sonra, vajinit ve gastrointestinal kandidiyaz dahil olmak üzere bu mantara başka enfeksiyonlar atfedilmiştir. Ayrıca Langenbeck (1839) pamukçukla ilişkili mantarı ilk kez belgelemesine rağmen, hastalıkla doğrudan bağlantısını kuramamıştır (20).

2.2.2. *Candida* türlerinin sınıflandırılması

1847'de, seçkin Fransız mikolog Charles Philippe Robin, pamukçuk'a neden olan mantarı adlandırmak için *albicans* ("beyazlatmak") sözcüğünü kullanarak mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmıştır. Hill ve daha sonra Martin ve Jones *Candida* yı, bitkilerde yaygın olarak büyüyen mantarları içeren bir cins olan *Monilia* cinsine hatalı olarak sınıflandırmıştır (18). Daha sonra, mikologların pamukçukla ilişkili mantar ile *Monilia* cinsindeki mantar arasındaki morfolojik farklılıkları zaten açıklamış olmalarına rağmen, klinisyenler pamukçuk

etiyojisine yanlılıkla "Monilias" adını vermişlerdir. Christine Berkhout ve arkadaşları, bu farklılıkları, özellikle de bu mantarın insanları enfekte etme yeteneğini belirlemiştir. Berkhout, onu mevcut *Candida* cinsi (1923) altında yeniden sınıflandırmıştır (20). *Candida*, *Toga Candida*'nın Roma Senatörleri tarafından giyilen beyaz bir elbise anlamına gelen Latince'den türetilmiştir. Berkhout'un taksonomisi daha sonra önde gelen Fransız mikologlar Maurice Langeron ve Paul Guerra tarafından “askosporojen olmayan mayaların rasyonel sistematığının başlangıcı” olarak adlandırmıştır (20). Ancak, 1954 yılına kadar Sekizinci Botanik Kongresi, *Candida*'nın etiyojisi ve taksonomisi üzerindeki 200 yıllık belirsizliği resmen sona erdiren iki terimli *Candida albicans*'ı nomen conservandum olarak resmen onaylamıştır.

Deuteromycetes sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılan *Candida* 'lar, blastosporlarla çoğalan, yalancı ve gerçek hif yapan, bir grup maya olarak bilinmektedir (21-23). Heterojen bir grup olan *Candida* cinsinin içerisinde bulunan türler arasındaki taksonomik ilişkiler tam olarak belirlenememiştir (23, 24). Şu anda *Candida* cinsi içinde yaklaşık 200 tür bulunmaktadır. Bu maya benzeri hücreler, *Blastomycetes* sınıfına ait anamorfik (cinsel kusurlu) mantarlardır. Polimorfik yapı olarak; tomurcuklanan maya hücreleri (blastokonodia), miçel, psödomiçel ve blastospor üretme yeteneğine sahiptirler (25). Yaklaşık 200 türden 24 *Candida türünün* (*C. albicans*, *C. glabrata* kompleks, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. krusei* ve *C. lusitaniae*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides*) insan enfeksiyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (23, 24, 26). NAC enfeksiyonları, *C. albicans* dışındaki *Candida* maya türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarıdır. NAC'lar; *C. glabrata* kompleks, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. ortopsiloz*. Albicans dışı kandidiyazis insidansı son yıllarda artmaktadır (2, 20, 27, 28, 30-33).

2.2.3. Ekoloji

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan maya mantarlarıdır. Birçok bitkide bulunabildikleri gibi özellikle memelilerde, gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukokutanöz membranlarda bulunmaktadırlar. Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistemdeki kolonizasyon, ağızdan kolona doğru gittikçe artmaktadır. *Candida* kolonizasyonunun yoğun

olduğu bir diğer yer vajendir. Sağlıklı kadınların %30'unda bulunmaktadır. Sağlıklı deride *Candida* türlerine fazla rastlanmaz (34).

2.2.4. *Candida* türlerinin morfolojik özellikleri

Candida türleri tipik olarak maya veya filamentli formda büyümektedir. Mayalar tek oval şekilli tomurcuklanan hücrelerken filamentler uçtan uca eklenmiş uzun hücrelerden oluşmaktadır (35, 36). Klinik örneklerde ve kültürlerde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülmekte olup 2-8 X 3-15 µm boyutlarına sahiptirler (21, 37, 38, 39). İki tür filamentli morfoloji vardır: yalancı hif ve hif. Yalancı hif (psodohyphae) elips şeklindedir, hücre bağlantılarında daralmalara sahiptir ve tipik olarak oldukça dallıdır. Buna karşılık, hifler paralel kenarlı hücre duvarlarına, gerçek septaya (daralmalardan yoksun) sahiptir ve genellikle daha az dallanma gösterir (35, 39). Ek olarak, hiflerde ilk nükleer bölünme ilk germ tüpünde meydana gelirken, maya ve psödohipal hücrelerde bu olay ana hücre-tomurcuk boynu boyunca meydana gelir (40-42, 39). Tüm *Candida* türlerinin her üç morfolojide de büyüemeyeceğini ve belirli bir morfolojide bulunacağını belirtmek gerekir. Örneğin, *C. glabrata* kompleks neredeyse yalnızca maya morfolojisinde büyürken, *C. albicans* ve *C. tropicalis* her üç morfolojide de bulunabilir. *C. parapsilosis* kompleks ve *Candida guilliermondii* gibi diğer türler sadece maya ve psödohipal morfolojilerde bulunmaktadır (36, 39, 43, 44). Dördüncü bir morfoloji olan klamidosporlar, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* dahil olmak üzere birçok *Candida* türünde bulunabilir. Klamidosporlar kalın duvarlı, büyük, yuvarlak hücrelerdir. Tipik olarak, besin açlığı koşullarına yanıt olarak hif süspansiyon hücrelerinin uçlarında oluşurlar ve nadiren enfekte dokularda gözlenirler (39, 45, 46).

NAC türlerinin, konakçı çevresel streslere karşı artan hassasiyet ve biyofilm oluşturma, konak hücrelere yapışma ve çeşitli parçalayıcı enzimler salgılama gibi çeşitli nedenlerle *C. albicans*'tan daha az patojenik olduğu düşünülmektedir (39, 43, 47). Ek olarak, NAC türleri, *C. albicans* kadar kolay veya sağlam bir şekilde filament oluşturmazlar. Örneğin, *C. albicans*, serum ve sıcaklık, nötr / alkali pH, nitrojen açlığı, yüksek CO₂/O₂ dahil olmak üzere çeşitli çevresel koşullara yanıt olarak güçlü filament indüksiyonu gösterirken, belirli karbon kaynakları ve çeşitli insan hormonları varlığında (progesteron, koryonik gonadotropin, östradiol ve lotinize edici hormon dahil), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. guilliermondii* türlerinin çok sınırlı büyüme gösterdiği bildirilmiştir (39, 47-).

53). Ek olarak, *C. albicans* filamentasyonu ile ilişkili bazı anahtar transkripsiyonel olayların NAC'lar da sadece kısmen korunduğu görülmektedir (53). Banerjee ve arkadaşları yakın zamanda mayadan filamentli forma geçişin mekanizmasını aydınlatmıştır (39, 54, 55). İlginç bir şekilde, yakın tarihli bir başka rapor, *C. auris*'in *in vivo* olarak bir memeli konakçıdan geçtikten sonra mayadan hem filamentasyon yetkin mayaya hem de filamentli hücrelere kalıtsal bir fenotipik geçişe uğrayabildiğini ve beyin ve akciğerlerdeki maya hücrelerine karşı filamentli hücreler için daha yüksek geçişin olduğunu bildirmiştir (39, 56). İpliksi hücrelerin ayrıca bir cilt enfeksiyonu modelinde daha invaziv olduğu ortaya çıkmıştır.

2.2.5. *Candida* türlerinin boyanma özellikleri

Maya ve miçelyal formları Gram pozitif boyanma özelliğine sahip olan *Candida*, floresan bir boya olan potasyum hidroksit-kalkoflor beyazı ile boyanabilmektedir (22, 38). Bu boya içerisinde bulunan kalkoflor beyazı maya hücre duvarının yapısında bulunan kitin ve sellüloza non-spesifik olarak bağlanarak yeşilden maviye dönüşen floresan renkler verir. Bu boya özellikle örnekler içinde maya hücrelerinin aranmasında kullanılmaktadır (26, 57). Ayrıca Gram boyama, Giemsa veya Papanicolaou boyamada tanıda kullanılmaktadır.

2.2.6. *Candida* türlerinin üreme özellikleri

Candida türleri laboratuvarı rutin olarak kullanılan genel mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde üreyebilmektedirler (58). *Candida* türleri, antibiyotikli veya antibiyotiksiz Sabouraud dekstroza agar gibi seçici olmayan mantar besiyerlerinde 25–37°C'de üreme özelliğine sahiptir. Mayalar, 20-40°C'de, pH 2-8'de karbon, azot ve fosfat kaynakları ve biotin varlığında rahatlıkla üreyebilmektedirler ve çoğalma hızları saate 0.3-0.4/saattir (15). İnkübatördeki üreme ortamının rölatif nem oranı %95-100 oranında olmalıdır (26). Üremeyi gözlemlemek için genellikle 48-72 saat beklenmesi gerekmektedir. *Candida* türlerinin besiyeri üzerindeki karakteristik görünümü; genellikle kirli beyaz veya krem rengi ve şekil olarak buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokan koloni şeklinde tanımlanmaktadır (37, 38, 59, 60).

2.3. *Candida* Enfeksiyonlarında Patogenez

Yakın zamana kadar *Candida spp*'nin enfeksiyon sürecinde pasif olduğu düşünülmekte idi ve bu nedenle patogenezde düşünülen tek mekanizma, konağın bağışıklık sisteminin

baskılanmasıydı. Bununla birlikte, artık *Candida*'nın virölans faktörlerini kullanarak, enfeksiyonun genel patogeneze aktif olarak katılabileceği belirlenmiştir (61). Hastalık yapma yeteneğine sahip bir mantarın vücuda girmesi enfeksiyonun ilk aşamasıdır. Ancak enfeksiyonun meydana gelmesi için bu yeterli değildir. Enfeksiyonun oluşması mantar ile konakçı arasındaki karşılıklı etkileşime bağlıdır. *Candida*, özellikle insanlarda savunma bariyerleri hasar gördüğünde dokulara yayılarak konakçıyı enfekte etmektedir (21).

2.4. *Candida* Türlerinin Virölans Faktörleri

Enfeksiyonun oluşumu ve gelişiminde virölans faktörleri önemlidir (62). Konak dokulara yapışma, biyofilm oluşumu ve hücre dışı hidrolazların salgılanması gibi çeşitli virölans faktörleri *Candida* patojenitesine katkıda bulunmaktadır (62). Birçok çalışma *C. albicans*'ın virölans faktörlerine odaklanmıştır ve bu nedenle NAC hakkında nispeten daha az konu bilinmektedir.

Konak hücreye adezyon, enfeksiyonun oluşumunda ilk ve en önemli adımdır. Adezyon, *Candida*'nın konak dokulara nüfuz etmesine ve yayılmasına yardımcı olur. *Candida* türleri vajinal, gastrointestinal ve bukkal epitel hücreleri, endotel, polimorf nüveli lökositler ve lenfositler dahil olmak üzere çeşitli hücrelere adezyon gösterebilirler (62). *Candida spp.* adezinleri (yapışmadan sorumlu özel yüzey proteinleri), proteinler, fibrinojen ve fibrinonektin gibi konakçı ligandlarını (bağlanma bölgesi) tanıyabilmektedir. *C. albicans*'ın yüksek adezyon özelliğinin olduğu gösterilmiştir (62). Son yıllarda, *in vitro* adezyon özelliği, NAC türlerinden *C. tropicalis*, *C. glabrata* kompleks ve *C. dubliniensis*'te gösterilmiştir. Gilfillan ve ark., McCullough ve ark. ile Jabra-Risk ve ark., *C. dubliniensis*'in *C. albicans*'tan daha adezif olduğunu bildirmiştir (63). *C. dubliniensis*'in adezinleri, *C. albicans*'a benzer gen tarafından kodlanmaktadır. Bununla birlikte, genlerin düzenlenmesi bu iki türde farklıdır (63, 64). Tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturabilme yeteneği, NAC türlerinde sık görülen bir virölans faktörüdür. Bu nedenle sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyon (HCAI)'ların önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Biyofilmler, hücre dışı bir matris içinde sıkıca sabitlenmiş, yüzeyle ilişkili mikrobiyal topluluklardır (61). Bu biyofilm maya hücreleri antifungal ajanın matriksten penetrasyonunu sınırlar ve konakçı bağışıklık tepkisinden korur. Biyofilm ve hücre dışı matris oluşturma yeteneği türe ve çevresel faktörlere göre değişmektedir. *C. albicans*'ın biyofilm matrisi karbonhidratlar, proteinler, fosfor ve

heksozaminlerden oluşur. *C. tropicalis* biyofilm matrisi, *C. albicans* ve diğer NAC türleri ile karşılaştırıldığında düşük seviyelerde karbonhidrat ve protein içermektedir (64).

Ekstrasellüler hidrolitik enzimler kandidiyazis patogeneğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. *Candida spp.*'de konakçı doku invazyonu; fosfolipazların, lipazların ve proteinazların enzimatik aktivasyonu ile kolaylaşmaktadır. Fosfolipaz, konak hücre zarının fosfolipidlerini hidrolize eder ve maya hücrelerinin yapışmasını kolaylaştırmak için reseptörleri açığa çıkarmaktadır (62). Birkaç çalışma, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks gibi türlerde fosfolipaz aktivitesi bildirmiştir. *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks'in aksine, *C. glabrata* kompleks'te fosfolipaz üretimi hakkında çok az çalışma mevcuttur (62, 64). *C. dubliniensis* izolatları genellikle düşük fosfolipaz aktivitesi sergilemektedir. Fosfolipazlara ek olarak, salgılanan aspartil proteinazlar (saps) yapışma, penetrasyon, yayılma ve konakçı dokuların yok edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzimler, konakçının önemli immünolojik ve yapısal savunma proteinlerini bozmaktadır. Proteinaz aktivitesi, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. guilliermondii* gibi türlerde tespit edilmiştir (62, 64). *C. dubliniensis* izolatlarında, *C. albicans*'a kıyasla yüksek proteinaz aktivitesi tespit edilmiştir (63). Hemolizin ise konak eritrositlerini yok eder ve hifal invazyonu kolaylaştırmaktadır. Hemolizin, *Candida spp.*'nin canlılığı ve konakçıda kalıcılığı için gereklidir (62, 65). Çoğu NAC *in vitro* ortamda hemolizin üretebilmektedir.

2.5. *Candida* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalarda, invazif kandidiyaz insidansının 1970'lerin başından 1990'lara kadar giderek arttığı bildirilmiştir (66). İmmünoşüpresif ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisinin yaygın kullanımının ardından NAC, HCAI'nın önemli bir nedeni olarak ortaya çıkmıştır (67). Sadece birkaç yıl önce, NAC sadece kontaminant veya patojenik olmayan izolatlar olarak göz ardı edilmiştir. NAC'a bağlı enfeksiyon en sık azol tedavisi veya profilaksisi alan hastalarda saptanmıştır (68). Tablo 1, NAC türleri için önemli risk faktörlerini göstermektedir. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* kompleks ve *C. parapsilosis* kompleks en sık izole edilen türlerdir (67-70).

Tablo 1. NAC türlerinin neden olduğu önemli klinik belirtiler (67-70).

Tür	Klinik bulgular
<i>C. tropicalis</i>	Kandidemi ve diğer bağıışıklığı baskılanmış hastalarda kateterle ilişkili kandidüri, orofaringeal kandidiyaz, vulvovajinal kandidiyaz yaygındır
<i>C. glabrata</i> kompleks	Kandidemi, kandidüri, vulvovajinal kandidiyaz
<i>C. krusei</i>	Kandidemi, neonatal ishal, endoftalmi
<i>C. parapsilosis</i> kompleks	Kandidemi, endoftalmi, endokardit, septik artrit, peritonit ve invaziv veya prostetik cihazlarla ilişkili diğer yayılmış enfeksiyonlar.
<i>C. lusitaniae</i>	Kandidemi ve diğer sistemik kandidiyaz formları
<i>C. guilliermondii</i>	Daha önce kardiyovasküler veya gastrointestinal cerrahi geçirmiş hastalarda kandidemi, intravenöz ilaç bağıımlılarında endokardit.
<i>C. dubliniensis</i>	HIV ile enfekte hastalarda orofaringeal kandidiyaz.
<i>C. kefyr</i>	Sistemik kandidiyaz.
<i>C. famata</i>	Kateter ilişkili kandidemi
<i>C. rugosa</i>	Kandidemi ve yara enfeksiyonları.
<i>C. lipolytica</i>	İntravenöz kateter ile ilişkili kandidiyaz.

Kandidemi olgularında *C. tropicalis* 2. veya 3. sıklıkta izole edilmiştir. Hindistan'da yapılan bir çalışmaya göre, fungemi ve kandidüri olgularında *C. tropicalis* en sık izole edilen NAC türü olmuştur. NAC genellikle yoğun bakım hastalarından izole edilmektedir. Mane ve arkadaşları orofaringeal kandidiyazisi (OPC) olan HIV ile enfekte hastalardan en sık NAC türlerini izole etmişlerdir (65). Uzun süreli kateterizasyon, kemoterapi, akut lösemi, nötropeni ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi *C. tropicalis* enfeksiyonları için risk faktörleridir (62). *C. albicans* ve NAC türleri ile karşılaştırıldığında nötropenik hastalarda daha fazla invazyon yapma potansiyeline sahiptir. *Candida* cinsinin bilinen tek haploid türü olan *C. glabrata* kompleks, başlangıçta bir saprofit veya kommensal tür olarak kabul edilmiştir (71). *C. glabrata* kompleks türleri, yenidoğan ve pediatrik yaş grubuna kıyasla daha çok yaşlı hastalarda izole edilmektedir. *C. glabrata* kompleks enfeksiyonu genellikle yüksek ölüm oranları ile ilişkili bulunmuştur (64)

C. parapsilosis kompleks, yenidoğanlarda ve yoğun bakım hastalarında sistemik kandidiyazisin önemli nedenlerinden biridir (64). Bu tür sıklıkla hastanede yatan hastaların

normalde steril olan vücut bölgelerinden izole edilmektedir. İnsan elini, intravasküler cihazları ve protez materyallerini kolonize etme yeteneği, *C. parapsilosis* kompleksi önemli bir hastane patojeni yapmaktadır (62). *C. parapsilosis* kompleks, hiperalimentasyon solüsyonlarında seçici büyüme yeteneğine sahiptir (64). Ayrıca endoftalmi, endokardit, septik artritis ve peritonit gibi hastalıklara neden olmaktadır (64). *C. krusei*, kemik iliği veya kök hücre nakli alıcılarında ve hematolojik malignite hastalarında invazif yayılmış enfeksiyonlara neden olmaktadır (72).

C. krusei'nin kan kültürlerinde izole edilme oranı yetişkinlerde yüksek iken çocuklarda düşüktür. *C. krusei*, HIV ile enfekte hastalarda nispeten nadir görülen bir kandidemi nedenidir. Ayrıca *C. krusei* idrar yolu enfeksiyonu, endoftalmi, osteomiyelit ve endokardit ile ilişkilidir (62). Özellikle flukonazol ile antifungal profilaksi, *C. krusei* enfeksiyonları için risk faktörüdür (62). *C. guilliermondii*, insan enfeksiyonlarının nadir bir nedenidir. Başlangıçta bir hayvan saprofiti olarak kabul edilmiştir, ancak son yıllarda daha önce kardiyovasküler veya gastrointestinal cerrahi geçirmiş hastaların kanındanda izole edilmiştir (73). Bu tür, pediatrik ve HIV ile enfekte hastalarda nadiren enfeksiyona neden olmaktadır. *C. guilliermondii* disemine enfeksiyonlarına bağlı ölümlerin çoğu kanser hastalarında meydana gelmektedir (73).

C. kefyr, Sendid ve ark. tarafından onko-hematolojik hastalığı olanlarda ortaya çıkan bir patojen olarak bildirilmiştir (72). Reuter ve ark. nötropenik hastalarda kandan *C. kefyr* izole etmişlerdir (72). *C. lusitaniae* kanser hastalarında agresif kemoterapi uygulanmadan önce nadir görülen bir patojen olarak kabul ediliyordu (73). Ancak kemik iliği transplant alıcılarında ve yüksek doz sitoredüktif tedavi alan kanser hastalarında önemli bir etiyolojik ajan olarak ortaya çıkmıştır (73). *C. dubliniensis*, ilk kez 1995'te Sullivan ve ark. tarafından tanımlanmıştır (74). Bu tür ilk olarak OPC'li İrlandalı HIV ile enfekte hastalarda rapor edilmiştir. Son yıllarda, diğer vücut örneklerinden hem HIV ile enfekte hem de enfekte olmayan bireylerin vajina, idrar, deri ve gastrointestinal sisteminden *C. dubliniensis* izolasyonu rapor edilmiştir (62). Sınırlı fosfolipaz aktivitesi ve mayadan hifale dönüşüm yeteneği nedeniyle bu tür invaziv enfeksiyonlarda rol oynamaktadır (62). Ancak son yıllarda az sayıda kandidemi vakasında bildirilmiştir (75).

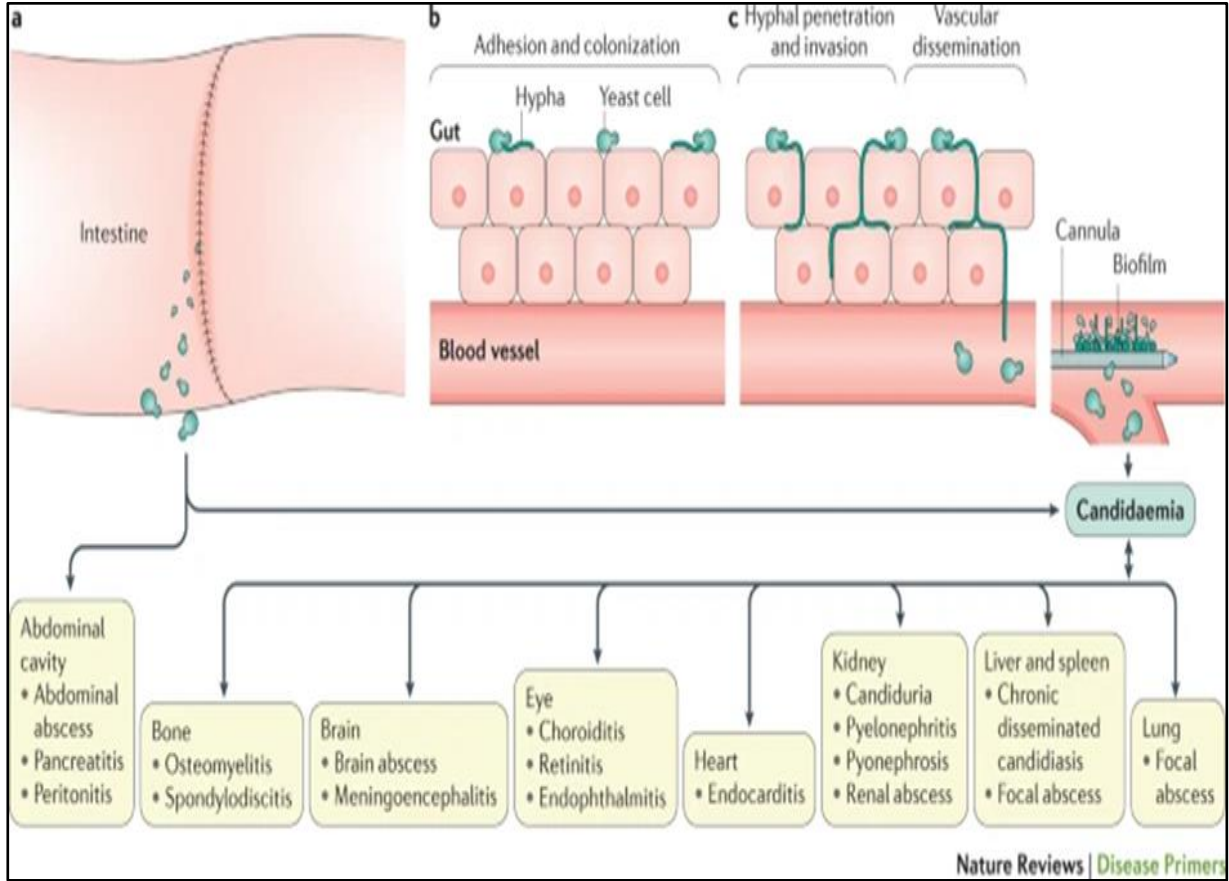
Nadir bir türü olan *C. rugosa*'ya bağlı enfeksiyon insidansının son yıllarda arttığı görülmektedir. *C. rugosa* diyabetik hastaların ağız boşluğunun %1,1'inden izole edilmiştir

(74). Aynı zamanda çoğu ülkede kateterle ilişkili kan enfeksiyonları ile ilişkilendirilmektedir (74). *C. rugosa* mastitli ineklerden izole edilen yaygın mayalardan biridir ve dolayısıyla kontamine süt veya süt ürünü tüketiminin *C. rugosa* enfeksiyonu kaynağı olduğu düşünülmektedir. Başlangıçta bir hayvan ve bitki saprofiti olarak kabul edilen *C. lipolytica*, intravenöz flukonazol tedavisi alan bir kanser hastasında kandidemi nedeni olarak bildirilmiştir (73). Ayrıca *C. lipolytica*'nın neden olduğu bir kateter ilişkili bir kandidemi vakası bildirilmiştir (75). *C. pelliculosa*, *C. norvegenesis* ve *C. inconspicua* gibi türler insanlarda nadiren enfeksiyona neden olmaktadır. *C. inconspicua* ve *C. norvegenesis* fenotipik olarak *C. krusei*'ye benzer (73). Majoras ve ark., *C. inconspicua*'nın solunum yolu, yara, kan ve cinsel organlardan izole edildiğini bildirmiştir (73). Klinik örneklerden *C. norvegenesis* izolasyonu ilk olarak Norveç'ten bildirilmiştir (73). *C. norvegenesis* solunum yolu örneklerinden, kandan, idrardan ve periton sıvısından izole edilmiştir (73). Shivprakasha ve ark. *C. pelliculosa*'yı, kandidemi olgularında saptamışlardır (75). Azol profilaksisi ve tedavisi, *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisini değiştirmiştir. Bir zamanlar patojenik olmayan ve saprofitik olarak kabul edilen NAC türleri önemli fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmıştır. Sadece dünyanın farklı ülkelerinde değil, aynı coğrafi bölge içindeki farklı sağlık kurumlarında da tür dağılımında büyük bir çeşitlilik görülmektedir. Bu nedenle kurumsal epidemiyolojik faktörler tedavi kararlarında önemli rol oynamaktadır.

2.6. *Candida* Enfeksiyonları

Albicans dışı kandidiyazisin klinik özellikleri ve komplikasyonları genellikle *C. albicans*'ın neden olduğu kandidiyazis ile çok benzer veya ayırt edilmesi zordur. Kandidiyazis, *Candida* cinsi mantarların neden olduğu, her yaşta ortaya çıkabilen ve genellikle risk faktörlerinin bulunduğu ortamlarda ortaya çıkan kutanöz, mukozal ve derin yerleşimli organ enfeksiyonlarını ifade eden geniş bir terimdir. İnvaziv kandidiyaz, *Candida* türleri ile kan dolaşımı enfeksiyonları ve karın içi apse, peritonit (periton iltihabı, karın ve karın organlarının iç duvarını kaplayan doku) veya osteomyelit (kemiklerin enfeksiyonu) gibi derin yerleşimli enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır (1, 2, 76, 77) (Şekil 1). Tüm dünyada sistemik kandidiyaza neden olan *C. krusei*, *C. glabrata* kompleks, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks prevalansının arttığı bildirilmektedir (78,79). En az 15 farklı *Candida* türü insanlarda hastalık yaparken, invazif enfeksiyonların çoğuna beş patojen neden olur: *Candida albicans*, *Candida glabrata* kompleks, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* kompleks ve *Candida krusei* (1, 80).

Malignite, altta yatan başlıca nedenlerden biridir; sistemik kandidiyaz, kanser hastalarında %30-50'lik bir ölüm oranı ile ilişkilidir (81). Diğer risk faktörleri arasında kinolonlara veya β -laktamaz inhibitörlerine maruz kalma ve santral venöz kateterlerin varlığı yer almaktadır (82).



Şekil 1. *Candida* türlerinin yerleşim yüzeylerinin gösterimi. *Candida* türleri sağlıklı insanların yaklaşık %50-70'inin mukozal yüzeylerinde yer alır. **A.** Gastrointestinal cerrahiden sonra bağırsak bariyerlerinde perforasyon oluştuğunda, *Candida spp.* doğrudan karın boşluğuna yayılabilir ve kan dolaşımını invaze edebilir **B.** Normal koşullar altında mantar, hastalığa neden olmadan kommensal bir organizma gibi davranır. **C.** Diğer faktörlerin yanı sıra bağışıklık tepkisinin bozulması, bağırsakta mantarın aşırı büyümesini ve çeşitli organlarda derinlere yerleşmiş fırsatçı enfeksiyonlara (invaziv kandidiyazis) yol açabilen kandidemiye teşvik edebilir (82).

2.6.1. Vulvovajinal kandidiyazis

Vulvovajinal kandidiyazis, yetişkin kadınların yaşadığı en sık enfeksiyonlardan biridir (60). Vulval tahriş, kaşıntı, ağrı, cinsel aktivitede rahatsızlık (disparoni) ve beyaz vajinal akıntı ile kendini gösterir (60). Çoğu vaka *C. glabrata* kompleks, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. dubliniensis* ile ilişkili olmak üzere vulvovajinal kandidiyazda

birçok albicans olmayan tür tanımlanmıştır. *C. glabrata* kompleks, bildirilen *albicans* dışı vulvovajinal kandidiyazisin %50-67'sini oluşturmaktadır (60). NAC türleri, asemptomatik kadınlarda vulvovajiniti olan kadınlardan daha sık izole edilmektedir. Tedavi başarısızlığı ortak bir özelliktir (60).

2.6.2. Oral kandidiyaz

Candida türleri, sağlıklı bireylerin normal ağız florasının bir parçasıdır. Oral kandidiyaz, ağızda *Candida* türlerinin aşırı çoğalmasından kaynaklanır. İki ana form, beyaz oral kandidiyaz (psödomembranoz kandidiyaz, hiperplastik kandidiyaz) ve eritematöz oral kandidiyazdır (atrofik kandidiyaz, medyan eşkenar dörtgen glossit, açılal keilitis, lineer dişeti eritemi). Diğer formlar kronik mukokutanöz kandidiyazis, keilokandiyazis (dudakları etkileyen *Candida*) ve kronik multifokal kandidiyazdır (83). Oral kandidiyazda rol oynayan *albicans* dışı türler şunlardır: *C. dubliniensis*, *C. glabrata* kompleks, *C. kefir*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* (83).

2.6.3. Sistemik kandidiyaz

Sistemik kandidiyaz (invaziv kandidiyaz), *Candida* türlerinin organ sistemlerine veya kan dolaşımına (kandidemi) invazyonudur. En yaygın etken *Candida albicans*'tır. İnvaziv kandidiyaz hastalığının spektrumu, minimal semptomatik kandidemiden fulminan sepsise kadar değişir ve buna bağlı mortalite %70'i geçmektedir. Deri ve gastrointestinal bariyerlerdeki bozulmalar (örneğin, gastrointestinal perforasyon nedeniyle) invaziv hastalığa zemin hazırlamaktadır

2.6.4. Ülkemizde Candida enfeksiyonlarının epidemiyolojisi

Yapar ve ark. çalışmalarında, 10.000 hastada kandidemi görülme sıklığını 5,6 olarak bulmuşlardır (84). Ener ve ark. ise 10.000 başvuruda görülme sıklığını 22 olarak bildirmişlerdir (85). Ülkemizde *Candida* tür dağılımı ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Yapar, 2009 yılında yaptığı çalışmada, 2000-2003 yılları arasında *Candida* kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının görülme sıklığını 0,56/1000 olarak bildirmiştir. Ayrıca çalışmada 2000-2003 yılları arasındaki hastalık etkenlerinin tür dağılımına bakılmış ve olguların %57,7'sinde *C. albicans*, %20,2'sinde *C. tropicalis*, %12,5'inde *C. parapsilosis* kompleks, %3,8'inde *C. guilliermondii*, %3,8'inde *C. glabrata* kompleks olduğunu belirlemişlerdir.

Aynı araştıracının 2008-2009 yıllarında yaptığı çalışmada etkenler sırasıyla; %45,8'i *C. albicans*, %24,1'i *C. tropicalis*, %14,5'i *C. parapsilosis* kompleks, %4,8'i *C. glabrata* kompleks olarak saptanmıştır (86).

2.7. *Candida* Türlerinin Laboratuvar Tanısı

2.7.1. Fenotipik yöntemler

2.7.1.1. Germ tüp testi, klamidospor oluşumu ve büyüme sıcaklığı

Germ-tüp (çimlenme borusu testi) testi, *C. albicans*'ı diğer *Candida* türlerinden ayırt etmek için basit, ekonomik ve etkili bir yöntemdir (87- 89). *C. albicans*'ın serumda 2-4 saat 37°C'de inkübe edildiğinde oluşturduğu çimlenme borusu (tüp benzeri yapılar) gözlemine dayanmaktadır (87, 89, 90). Bir germ tüp veya psödohifa yapısı, mayanın hücreye bağlanma noktasında herhangi bir daralmaya sahip olmayan uzantı ile gerçek hiften ayrılmaktadır. Bu teknik *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks gibi bazı NAC türlerinin de serumda germ tüpü veya psödohifa oluşturabilmesi sebebiyle test süresine dikkat etmek gerekir (63, 89, 91- 93). Klamidospor oluşumu, *C. albicans*, *C. dubliniensis* ve çok nadiren bazı *C. tropicalis* izolatlarının bir özelliğidir (63, 89, 92, 93). Moska ve arkadaşları. *C. dubliniensis*'in kazein agar üzerinde bol miktarda klamidospor ürettiğini ve bu testin *C. dubliniensis* ile *C. albicans* arasında ayırım yapmak için faydalı bir test olduğunu belirtmiştir (94). *C. dubliniensis*'in klamidospor oluşumunu sağlayan diğer ortamlar ayçiçeği tohumu agar, tütün agar ve Staib agardır (45, 89, 95). Ancak, *C. dubliniensis*'i *C. albicans*'tan ayırt etmek için germ tüpü testi yeterli olmayabilir ve ek testler gerekmektedir (45, 89, 93). 42°C veya 45°C gibi farklı sıcaklıklarda gelişebilen *C. albicans*'ın aksine, *C. dubliniensis* izolatları zayıf büyür veya hiç büyümmez (63, 89, 96).

2.7.1.2. Karbon ve nitrojen asimilasyonu

Belirli bir izolatın, tek karbon kaynağı olarak belirli bir karbonhidratı özümseme yeteneği, tür tanımlamasında uzun zamandır geleneksel olarak kullanılmıştır. Bu testin çokça tercih edilmesinin nedeni, yöntemin göreceli basitliğinden, düşük maliyetinden ve standart protokollerin mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır (89, 97). Karbonhidratın özümsemesi iki farklı yöntemle belirlenebilir.

Birinci yöntem olan oksanografik yöntemde; şeker çözeltilerinin karbon dışında gerekli diğer besinleri içeren bir jel içinde kesilmiş kuyulardan emdirilmesi tekniği kullanılır ve zaman alıcı bir teknik olarak kabul edilmektedir (89, 98, 99). İkinci yöntemde *Candida* türünün büyümesi farklı karbon kaynaklarına sahip sentetik bir bazal ortam içeren tüpler kullanılmaktadır. Tüpler inkübe edilir ve büyüme için incelenir. Nitrat özümsemesi, a-naftilamin ve sülfanilik asit reaktifleri kullanılarak et suyu ortamında test edilebilir. Bu yöntem, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle tercih edilmektedir (89, 98).

2.7.1.3. Karbonhidrat fermantasyonu

Fermentasyon testleri genellikle sıvı ortamda gerçekleştirilir ve ortamda asit ve/veya karbon dioksit üretiminin gösterilmesine dayanmaktadır (89, 100). Karbonhidrat fermantasyonu *Candida* türlerini ayırt etmek için faydalı bir test olmasına rağmen, karbonhidrat asimilasyon testine göre duyarlılığı düşüktür (89, 98). Rutin tanı laboratuvarlarında gerçekleştirilmesi zaman alıcı ve zahmetlidir (89, 101).

2.7.2. Hızlı ticari sistemler

2.7.2.1. API 20C Aux sistem

API 20C AUX, 20 kuyucuklu 19 karbonhidrat asimilasyon testinden oluşan plastik bir şerittir. 30°C'de (24, 48 ve 72 saat) inkübasyondan sonra, kuyucukların bulanıklığı değerlendirilerek, bir profil numarası oluşturulur. Bilgisayar destekli sayısal yaklaşım, profil numarasını 'mükemmel', 'çok iyi', 'iyi' veya 'kabul edilebilir' şeklinde sınıflandırarak tanımlamaktadır (89, 102). Salkin ve ark., API 20C Aux metodu ile ksiloz ve a-metil-D-glukoziti asimile edememesi nedeniyle *C. dubliniensis*'in *C. albicans*'tan ayırt edilebileceğini bildirmişlerdir (89, 103). Öte yandan, *C. krusei*'yi tanımlama yeteneğiyle ilgili sorunlar olduğu görülmüştür (89,104, 105). Liguori ve ark. göre standardizasyon ve inokulum ekimi sırasında hassasiyet gereklidir, bulanıklık seviyesinin doğru yorumlanması beceri gerektirir. Ayrıca okuma süresinin 72 saate kadar uzaması gibi dezavantajları olduğu bildirilmişlerdir (89, 106).

2.7.2.2. ID 32C sistemi

ID 32C sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), 48-72 saatlik inkübasyondan sonra %92'lik doğru tanımlama oranıyla Avrupa'da yaygın olarak kullanılmaktadır (89, 107, 108). Bu sistem 63 farklı tür için bir veri tabanı içerir ve toplam 29 asimilasyon testi

gerçekleştirmek için 32 oyuklu tek kullanımlık plastik şeritten oluşan kolorimetrik bir testtir (89, 90, 108). Öte yandan, ID 32C sisteminin diğer biyokimyasal sistemlere (Auxacolor ve Vitek 2 YST) ve kütle spektrometrisi yaklaşımlarına göre daha düşük özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur (89, 109, 110). ID 32C ve API 20C Aux kitlerinin veri tabanlarına *C. dubliniensis* karbonhidrat asimilasyon profillerinin yakın zamanda dahil edilmesi, bu türün tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Cardenes-Perera ve ark. ID 32C sisteminin *C. dubliniensis*'i %96 oranında doğru tanımladığını göstermişlerdir (89, 111, 112).

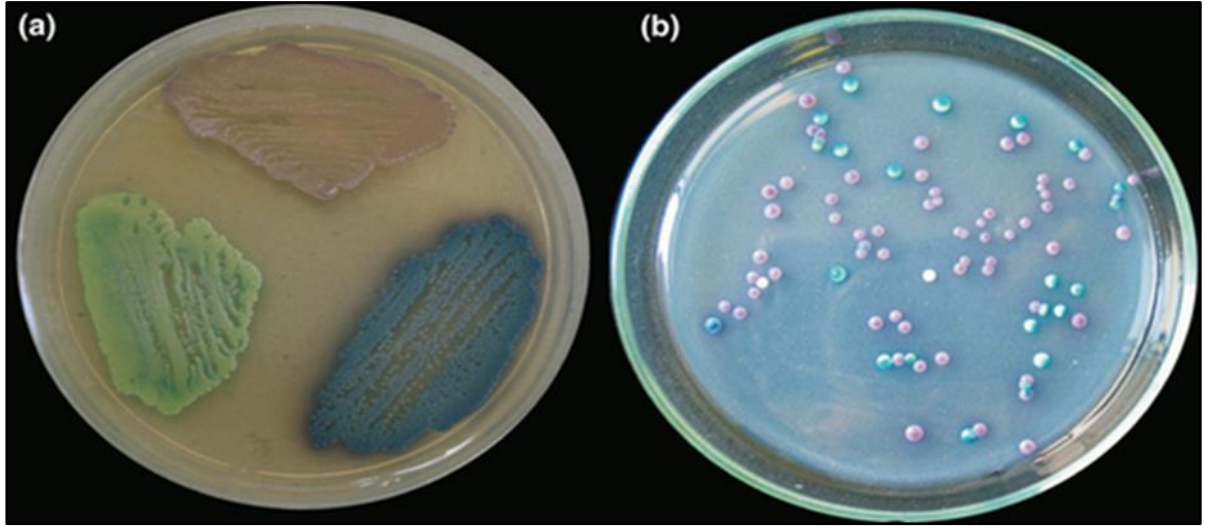
2.7.2.3. API Candida sistemi

API *Candida* sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) 12 tanımlama testine izin veren 10 tüplük bir şeritten oluşur: beş karbonhidrat fermentasyon ve yedi enzimatik testi içermektedir (89, 113-115). 35°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra 15 maya türünün tanımlanmaktadır (89, 113, 115). Bu sistem ile ekstra testlere gereksinim duyulmaz ve NAC tanımlama oranları sırasıyla; *C. tropicalis* %86,7, *C. parapsilosis* kompleks %89,7, *C. lusitaniae* %91,2, *C. glabrata* kompleks %96,8, %96,9, *C. guilliermondii* %100 ve *C. kefyr* %100'dür. API *Candida* sisteminin kullanımı ve yorumlanması kolaydır (89, 113, 114).

2.7.3. Kromojenik ortam tabanlı ticari sistemler

2.7.3.1. CHROM agar Candida sistemi

CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Paris, Fransa), üç *Candida* türünün izolasyonu ve tanımlanması için seçici ve ayırt edici bir besiyeridir: *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* (87, 89, 116). Test, mayanın 24-48 saat (35°C veya daha yüksek) inkübasyonundan sonra türe özgü enzimlere dayalı kromojenik substratların kullanımıyla renkli kolonilerin oluşumuna dayanmaktadır (89, 96, 117). Bu besiyerinde, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* kolonileri sırasıyla yaprak yeşili, koyu mavi-gri, mor haleli ve pembe renkte koloni oluşturmaktadır (Şekil 2). Diğer türler, rengi beyazdan koyu pembeye değişen koloniler şeklinde görünmektedir (89, 116). Ayrıca *C. dubliniensis*'in koyu yeşil görünümünün, *C. albicans*'ın renginden güvenilir bir şekilde ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir (92, 96, 89, 118). Bununla birlikte, karakteristik koyu yeşil *C. dubliniensis* kolonisi, alt kültür veya -70°C'de stoklama-pasajlama sonrası görünümü kaybolabilmektedir (96, 89, 116, 119, 120).



Şekil 2. Chromagar plak görseli; *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* kompleks sırasıyla yeşil, mavi ve mor koloniler olarak görünür. (a) referans suşlardan kültürler; (b) protez stomatitli bir hastadan alınan klinik örnekleri (89, 116).

2.7.3.2. Candida ID sistemi

Candida ID Sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), turkuaz veya mavi çözünmeyen bir ürün vermek üzere *C. albicans* tarafından hidrolize edilen bir kromojenik indolil glukozaminid substratına dayanmaktadır. Bu besiyerinde *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* kolonileri pembe, diğer *Candida* türleri beyaz görünümündedir (89, 121).

2.7.3.3. Baxter MicroScan maya tanımlama paneli

Baxter MicroScan YIP (Baxter MicroScan, W. Sacramento, Calif., ABD), 13 amino asit, β -naftilamidler, dokuz nitrofenil bağlı karbonhidrat, üç karbonhidrat, üre ve indoksil fosfat substratlarının kullanımını içeren bir testtir (89, 122). Sistem, 4 saat içinde sonuç verme avantajına sahiptir. Plakaların inokülasyonu kolaydır ve pozitif reaksiyonlar kısa sürede saptanabilmektedir (122). Bu sistemin duyarlılığı %82 ve %94 olarak bildirilmiştir (89, 100, 122).

2.7.3.4. Vitek YBC sistemi ve Vitek 2 ID-YST sistemi

Vitek sistemi (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, ABD), 22-24 saat içinde tıbbi açıdan önemli 27 maya türünün tanımlanması için kullanılan maya biyokimyasal kartı (YBC); programlanmış bir bilgisayar, bir okuyucu-inkübatör ünitesi, bir doldurma modülü, bir

mühürleyici modül ve bir yazıcı içeren Vitek Sistemi ile birlikte kullanılan birkaç test paketinden oluşmaktadır (89, 123-125). Genel olarak, *C. albicans* ve albicans olmayan *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. glabrata* kompleks gibi yaygın klinik izolatlar, Vitek YBC sistemi kullanılarak yüksek oranda %86-99.2 tanımlanmıştır (89, 123, 125, 126). El-Zaatari ve ark. Vitek YBC sisteminin yaygın olmayan mayaların tanımlanması için yetersiz olduğunu bildirilmiştir (89, 123). Vitek 2 ID-YST sistemi ise, 47 floresan biyokimyasal teste sahip 64 kuyudan oluşan ikinci nesil otomatik bir sistemdir. İkincisi, 20 karbonhidrat asimilasyon testi, altı organik asit asimilasyon testi, 4-metilumbelliferon ile birleştirilmiş oksidazları tespit etmek için sekiz substrat, yedi amino-metilkumarin ile birleştirilmiş arilamidazlar için özel olarak dokuz substrattan oluşur (89, 111, 127, 128). Maya izolatları 15 saat içinde tanımlanabilmektedir (89, 111, 127). Ancak 24 saatten eski kültür kolonilerinin kullanımı şüpheli sonuçlara yol açabilmektedir. (89, 128).

2.7.4. Biyotipleme

2.7.4.1. Tween 80 opaklık testi

Tween 80 Opaklık testi, birkaç bakterinin ve çeşitli *Chrysosporium* türlerinin lipolitik aktivitelerini saptamak için kullanılmıştır (89, 129). Patojenik *candida* türlerinin birçoğu aynı zamanda esterazlar ve fosfolipazlar gibi lipolitik enzimler salgıladığı için *Candida* türlerini ayırt etmek için yararlı bir test olarak önerilmiştir (130, 131). Tween Opaklık testi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'i ayırt etmede iyi bir performansa sahiptir (89, 130).

2.7.5. PCR tabanlı olmayan yöntemler

2.7.5.1. Peptit nükleik asit floresan *In Situ* hibridizasyon protokolü

Floresan etiketli oligonükleotid problemlerle floresan in situ hibridizasyon (FISH), saf kültüre ihtiyaç duyulmadan mayaları tanımlanabilmektedir. Yeni peptit nükleik asit (PNA) problemlerinin kullanılması, yüksek düzeyde yapılandırılmış rRNA bölgesinin hedeflenmesi yöntemin tanıdaki potansiyelini artırmaktadır (89, 132). *Candida* PNA FISH testi *Candida albicans* için %95,9 ve NAC için %86,5'e kadar değişen oranlarda tanımlama yapabilmektedir (89, 133).

2.7.5.2. BD Phoenix cihazı ile identifikasyon yöntemi

BD Phoenix, son jenerasyon kültür ve antibiyogram sistemidir. Sistem, içerdiği kromojenik ve florojenik substratlarla cins ve tür düzeyinde bakteri ve maya identifikasyonu yapabilmektedir. Bu sistemler identifikasyon ve antimikrobial duyarlılık testlerini birlikte yapabilir, içerdikleri “uzman” (expert) sistem yazılımları ile sonuçları yorumlar ve onaylanan sonuçları LIS/HIS bağlantısı ile tetkiki isteyen klinisyene kısa sürede ulaştırabilmektedir. Ayrıca epidemiyolojik verileri ulaşılabilir durumda belleğinde saklamaktadır.

2.7.6. Moleküler tanımlama yöntemleri

2.7.6.1. Multipleks-PCR

Yaygın patojenik mantarları hızlı ve eşzamanlı olarak tanımlama özelliği ile tek bir PCR tüpünde farklı türe özgü primerler kullanılmaktadır (89, 134, 135). Bu yöntemdeki en yaygın sorun, farklı primer dizileri arasında hibridizasyon olasılığıdır. Carvalho ve ark. sekiz *Candida* türünü, (*C. albicans* ve *albicans* olmayan *C. glabrata* kompleks, *C. parapsilosis* kompleks, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis*) multipleks PCR ile çalışmışlardır (136). Romeo ve ark. 81 NAC (*C. glabrata* kompleks, *C. nivariensis* ve *C. bracaren* gibi) izolatını %100 duyarlılık ve %100 özgüllük ile tanımlayabildiklerini bildirmişlerdir (137).

2.7.6.2. Nested-PCR

Bu teknik, *Candida spp.*'nin DNA'larının spesifik amplifikasyonu için iki set primer kullanılmaktadır. Tanıda özgüllük ve duyarlılığı artırmak için iki ardışık PCR çalışması yapılmaktadır (138, 139). İlk olarak, dış primerler, geniş bir bölgeyi hedefleyerek amplifikasyon gerçekleşmektedir. Ardından, önceki reaksiyondan elde edilen ürün kullanılarak hedef dizinin gerçek amplifikasyonu yapılmaktadır. Nested-PCR çok özel bir teknik olarak kabul edilir. Çünkü ilk çalıştırmada yanlış PCR fragmanı amplifiye edilirse, bölgenin ikinci primer çifti tarafından tekrar amplifiye edilme olasılığı çok düşüktür.

2.7.6.3. Gerçek zamanlı PCR (Real time PCR)

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), PCR'nin her döngüsünde amplifiye edilmiş DNA'nın gerçek zamanlı nicelleştirilmesine izin veren standart PCR tekniğinin bir çeşididir (89, 140). Gerçek

zamanlı PCR yönteminde, floresan bileşiğinin tipine ve işlem sırasındaki davranışına göre iki yöntemi vardır. Böylece, amplifikasyon süreci, ya yeni oluşturulmuş ampikon moleküllerine özel olarak hibridize olan etiketli probolar kullanılarak (TAQMAN gibi) ya da yeni oluşturulmuş çift sarmallı boyaların (SYBR Green I, BEBO veya LC Green gibi) boyanmasıyla izlenebilir (89, 132). Trtkova ve Raclavsky'ye göre, amplifikasyonun başarılı olması için ampikon ve prob arasında ek bir dizi homolojisi gerektiğinden proboların kullanımı PCR'nin özgülüğünü artırmaktadır (89, 132).

Candida türlerini tanımlamak için bazı gerçek zamanlı prosedürler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi olan TaqMan probu (Perkin-Elmer Corp., Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) ile *C. albicans* ve NAC türlerinden *C. parapsilosis* kompleks, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* ve *C. glabrata* kompleks olmak üzere çeşitli türleri hızlı tanısı sağlanmaktadır (89, 141, 142). Bu durum, laboratuvar kontaminasyonu riskini önemli ölçüde azaltır ve numunelerin ortalama 4 saatte tanımlanmasına olanak sağlar. Guiver ve ark. TaqMan PCR yöntemini kullanarak *C. albicans* ve NAC'lardan *C. glabrata* kompleks, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. kefyr* %100 özgülükle tanımladıklarını bildirmiştir (141). Aynı şekilde Shin ve arkadaşları, *Candida* türlerinin (*C. albicans*, *C. glabrata* kompleks, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* kompleks) %95,1'ini doğru bir şekilde tanımladıklarını bildirmişlerdir (89, 143, 144).

2.8. Kandidiyazis Tedavinde Kullanılan Antifungal İlaçlar

2.8.1. Amfoterisin B

Polien sınıfı antifungal ilaçlardandır. Mantar hücre duvarındaki ergosterole bağlanarak ve geçirgenliği artırarak etki etmektedir (145). Amfoterisin B, 1955 yılında Squibb For Medical Research Institute'de Venezüella'daki Orinoco nehir yatağından elde edilen *Streptomyces nodosus*'tan izole edilmiş ve 1958'de tıbbi kullanıma girmiştir (146, 147). Amfoterisin B, ciddi mantar enfeksiyonları ve leishmaniasis için kullanılmaktadır (WHO, 2010). *Mukormikoz*, *aspergilloz*, *blastomikoz*, *kandidiyaz*, *koksidioidomikoz* ve *kriptokokoz* tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı enfeksiyonlarda flusitozin ile birlikte verilmektedir. İntravenöz olarak kullanılmaktadır. Amfoterisin B, yaşamı tehdit eden mantar enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili antifungal ajanlardan biridir. Ateş, titreme ve baş ağrısı ile nefrotoksite gibi yan etkilere sahiptir. Anafilaksi dahil alerjik semptomlar ortaya

ıkabilmektedir. Bu ilaç grubunun lipid içeren formülasyonlarının nefrotoksik etkisi nispeten düşüktür.

2.8.2. Azol bileşikleri

Azol bileşikleri, ergosterol sentezinde rol alan bir enzim olan sitokrom P-450 bağımlı lanosterol 14 α -demetilazı ve 24 metilen dihidro lanosterol demetilazı inhibe ederek antifungal etki göstermektedir. *ERG II* geni sayesinde lanosterol ergosterol dönüşüm basamağını inhibe etmektedir (148).

2.8.3. Flukonazol

Flukonazol, azol grubu antifungal ilaçlardandır. Flukonazol, kandidiyaz, blastomikoz, koksidiyodomikoz, kriptokokoz, histoplazmoz, dermatofitoz ve pitriyazis versikolor enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Flukonazol aspergilloz, mukormikoz veya *Scedosporium apiospermum* enfeksiyonlarının tedavisinde etkisizdir. Ayrıca *Candida glabrata* kompleks ve *Candida krusei* türlerine karşı diğer yeni azollere göre daha az etkilidir. Aynı zamanda, transplantasyon sonrası, düşük doğum ağırlıklı bebekler ve düşük kan nötrofil sayısı olanlar gibi kandidiyaz riski taşıyan kişilerde profilaktik amaçla kullanılmaktadır. Oral ve parantral kullanım şekilleri vardır. Kusma, ishal, döküntü ve karaciğer enzimlerinde artış yaygın görülen yan etkilerdendir. Ciddi yan etkiler arasında karaciğer sorunları, QT uzaması ve nöbetler sayılabilmektedir. Hamilelik sırasında düşük yapma riskini artırabilirken, yüksek dozlarda doğum kusurlarına neden olabilir (148).

2.8.4. Vorikonazol

Triazol grubu azol ilaçlardandır (146, 149). Vorikonazol, flukonazolden türetilen ve eski triazollere kıyasla gelişmiş bir antifungal spektruma sahip olan ikinci nesil bir triazoldr (148). Kandidiyazis, koksidiyoidomikoz, histoplazmoz, penisilyoz ve *Scedosporium* veya *Fusarium* enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Oral ve parantral kullanım şekilleri vardır. Yaygın yan etkiler arasında görme sorunları, mide bulantısı, karın ağrısı, döküntü, baş ağrısı ve olmayan şeyleri görme veya duyma yer almaktadır. Hamilelik sırasında kullanılması önerilmemektedir.

2.8.5. İtrakonazol

Triazol antifungal ilaç ailesindendir. Oral yolla kullanılmaktadır. Yaygın yan etkiler mide bulantısı, ishal, karın ağrısı, döküntü ve baş ağrısıdır. Ciddi yan etkiler arasında karaciğer sorunları, kalp yetmezliği, Stevens-Johnson sendromu ve anafilaksi dahil alerjik reaksiyonlar sayılabilir. Hamilelik veya emzirme döneminde güvenli kullanımı şüphelidir (150).

2.8.6. Posakonazol

Posakonazol, bir triazol mantar önleyici ilaçtır (151). Ağır bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Candida* türlerinin neden olduğu istilacı enfeksiyonları tedavi etmek için de kullanılır (153, 154). Posakonazol; *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Zygomycetes spp.*, mikroorganizmalara karşı aktiftir (152). Posakonazol, fosfolipidlerin asil zincirlerinin yakın paketlenmesini bozarak, ATPaz gibi belirli membrana bağlı enzim sistemlerinin ve elektron taşıma sisteminin enzimlerinin işlevlerini bozar, böylece mantarların büyümesini engeller. Bunu, lanosterol 14a-demetilaz enzimini inhibe ederek ve metillenmiş sterol öncüllerinin birikimini önleyerek ergosterol sentezini bloke ederek yapar. Posakonazol, 14-alfa demetilazı inhibe etmede itrakonazolden önemli ölçüde daha güçlüdür (152).

2.9. Mayalar İçin Antifungal Duyarlılık Testleri

Standart antifungal duyarlılık testi yöntemlerinin geliştirilmesi, son 15 yıldır yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur. Mayalar (CLSI M27-A3, EUCAST E.DEF 7.3.1) ve küfler (CLSI M38-A2, EUCAST E.DEF 9.3.1) için referans yöntemler mevcuttur (155, 248). Bu yöntemlerin geliştirilmesi, araştırmacılara yalnızca test için standartlaştırılmış yöntemler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği etkileyen değişkenlerin anlaşılmasını sağlamaktadır (155).

2.9.1. Mayalar için CLSI sıvı besiyerinde dilüsyon

1992 yılında önerilmiş ve 1995 yılında geçerli belge olma aşamalarından geçtikten sonra mayaların test edilmesi için metodolojisi haline gelmiştir. Yüksek laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik avantajına sahiptir. M27 yöntemi geliştirilmeye devam etmektedir. M27-A belgesi, amfoterisin B, flusitozin, flukonazol, ketokonazol ve itrakonazol için 48 saatte Kalite Kontrol (QC) sınırlarını sağladığı bilinmektedir (155).

2.9.2. Ticari sıvı besiyerinde dilüsyon

Yakın zamanda incelenen et suyu bazlı ticari sistemler arasında Candifast (Fransa), Integral Systems Yeasts (İtalya) ve Fungitest Paris (Fransa) bulunmaktadır. Bu kitler, kritik kırılma noktası değerleri olarak seçilen sınırlı sayıda ilaç konsantrasyonunu test etmek için reaktifler sağlar. Doğrudan karşılaştırmalar, bu yöntemlerin M27-A referans yöntemiyle sınırlı bir korelasyona sahip olduğunu bilinmektedir (155).

2.9.3. E-test

E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç), antimikrobiyal duyarlılık testi için tescilli, ticari olarak temin edilebilen bir yöntemdir. *Candida spp.* için kabul edilebilir testtir. E-test, amfoterisin B MIC'lerinin belirlenmesi için önemli bir değere sahiptir ve dirençli izolatları tanımlamanın daha güvenilir bir yöntemdir. Amfoterisin B, flusitozin, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazole karşı iki NCCLS M27 QC izolatu için QC E test limitleri önerilmiştir (155).

2.9.4. Diğer agar bazlı test yöntemleri

Disk tabanlı duyarlılık testi kullanışlı ve ekonomiktir. Flukonazol için referans sıvı besiyerinde dilüsyon yöntemleriyle iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (155).

2.9.5. Akan hücre sitometrisi ve vital boyaların kullanımı

Akan hücre sitometrisi, uzun zamandır antifungal duyarlılık testi için olası bir araç olarak kabul edilmiştir ve esas olarak mayalar için geliştirilmiştir. (155). Uygun boyalarla boyama hasarlı mantarların hızlı tespitine izin verir. Akan hücre sitometrisinin amfoterisin B direncinin saptanması için özellikle yararlı olabileceğini bildirilmiştir (155).

2.9.6. Azole etkisinin doğrudan ölçümü: ergosterol sentezinin kantitasyonu

Azol antifungal ajanlarının ergosterol sentezini inhibe ederek etki gösterdiği göz önüne alındığında, ergosterol sentezindeki değişikliklerin doğrudan ölçülmesi uygun görünmektedir. Arthington-Skaggs ve ark. bu tür testler *Candida spp.* için uygulanabilir bir laboratuvar yöntemi olduğunu bildirilmiştir (155).

2.9.7. Mayalar ve küfler için diğer antifungal duyarlılık test yöntemleri

Antifungal duyarlılık testi için birçok alternatif yöntem önerilmiştir. Agar bazlı yöntemler, basitlikleri nedeniyle çekicidir. Kromojenik CHROMagar *Candida* besiyeri ile kombinasyon halinde belirli bir flukonazol konsantrasyonu (8 µg/ml) içeren agar seyreltme bazlı bir yöntem, flukonazol direnci için yararlı bir tarama aracıdır (155).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazların Listesi

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz Marka Model	Üretim Tarihi	Üretim Yeri
Pipet Gilson 10 µl	2007	Fransa
Pipet Gilson 100 µl	2007	Fransa
Pipet Gilson 1000 µl	2007	Fransa
Pipet Axygen 10 µl (8kanallı)	2007	İtalya
pH metre Thermo Scientific Orion Star A211	2013	ABD
Su Banyosu Wids WiseBath WSB-30	2013	G. Kore
Vorteks Wids WiseMix VM-10	2013	G. Kore
Hassas Terazı OHAUS A.Pro AV264C	2013	İsviçre
Biogüvenlik Telsa Class Iı 12469	2013	İspanya
PCR Eppendorf Vapo. Protect	2008	Almanya
Jel Görüntüleme Sistemi UVP Bioimaging System	2008	ABD
Santrifüj Sigma 1-14 K	2013	Almanya
Derin Dondurucu Bosch Aa++	2008	Türkiye
Buzdolabı Bosch A++	2008	Türkiye
Mikrodalga Fırın Arçelik Ecot20	2008	Türkiye
Elektroforez Sistemi Thermo Scientific Qwleasycast	2008	ABD
Güç Kaynağı Thermo Scientific Ec-300xl	2008	ABD
Spektrofotometre NanoDrop 2000	2009	ABD

3.2. Maya Türlerinin İzole Edilmesi ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmaya, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli kliniklerdeki 82 hastaya ait kan, idrar, katater ve yara yerinden alınan örneklerinden elde edilen izolatlar dahil edilmiştir. Klinik örneklerden Sabouraud Dekstroz agar (SDA) (GBL, Türkiye)'a ekimler yapılmıştır. 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından *Candida* olduğu düşünülen kolonilere Gram boyama yapılarak morfolojik olarak tanımlanmıştır. Stok kültürler için steril eküvyonlar ile alınan örnekler SDA besiyerine tek koloni düşecek şekilde pasajlanıp ve 24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen koloniler, maya tanımlarının doğrulanması için mikroskopta x400 büyütmede incelendi. Çalışmaya dahil edilen tüm *Candida* izolatları saf kültür olarak test edilmiş ve tür tanımlaması yapılmıştır. Suşların antifungal duyarlılık testleri sıvı

mikrodilüsyon yönteminde referans yöntemlerden biri olan The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document E.DEF 7.3.1 kılavuzu önerilerine göre gerçekleştirilmiştir. Yöntemin uygulanışı aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (248).

3.2.1. Besiyerinin hazırlanması

Besiyeri olarak glutaminli, bikarbonatsız (%2) glikozlu RPMI 1640 kullanılması tavsiye edilmektedir. Besiyerinin hazırlanış formülü aşağıdaki gibidir.

Tablo 3. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması (glikozlu %2) (247).

Component	Double strength concentration
Distilled water	900 mL
RPMI 1640	20.8 g
MOPS	69.06 g
Glucose	36 g

Belirtilen bileşenler 900 ml distile su içinde çözdürülmüş ve pH 7.0'a ayarlamak için 1M Sodyum Hidroksit eklenmiştir. Son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Sterilizasyonu sağlamak amacıyla hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtre kullanılarak süzölmüştür.

3.2.2. Stok solüsyonlarının hazırlanması

Antifungal ilaç çözeltileri, antifungal ilacın tozunun potensi dikkate alınarak hazırlanmıştır. Standart bir çözelti hazırlamak için gereken toz veya seyreltici miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır:

Tablo 4. Standart bir çözelti hazırlamak için gereken toz veya seyreltici miktar hesaplama fomülü (247).

$$\text{Weight (g)} = \frac{\text{Volume (L)} \times \text{Concentration (mg/L)}}{\text{Potency (mg/g)}}$$
$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Weight (g)} \times \text{Potency (mg/g)}}{\text{Concentration (mg/L)}}$$

Antifungal tozlar (Discovery Fine Chemicals, UK) analitik terazi üzerinde tartılmıştır. Antifungal ilaç stok çözelti konsantrasyonu 200 kat yüksek konsantrasyonda hazırlanmıştır. Antifungal ilaçları çözebilmek için gerekli olan solvent miktarları aşağıda belirtilmiştir (247).

Tablo 5. Antifungal ilaçları eritebilmek için gerekli olan solvent miktarlar tablosu (247).

Antifungal agent	Solvent	Characteristics	Test range (mg/L)
Amphotericin B	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Anidulafungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Caspofungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Fluconazole	DMSO/Water ^a	Hydrophobic/hydrophilic	0.125 - 64
Flucytosine	Water	Hydrophilic	0.125 - 64
Isavuconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Itraconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Micafungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Posaconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Voriconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4

DMSO, dimetil sülfoksit stok solüsyonu

Stok solüsyonu için sterilizasyon normalde gerekli değildir ama istenirse filtre yardımıyla sterilizasyon yapılabilir. Stok solüsyonu küçük hacimlere bölünerek steril polipropilen ya da polietilen tüplerde -70°C’de saklanmıştır.

3.2.3. Çalışma solüsyonunun hazırlanması

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması için gerekli adımlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Stok tüpleri dondurucudan çıkartılmıştır.
2. Dokuz farklı tüpe her antifungal için ayrı ayrı belirtilen solvent miktarlarından uygun hacimlerde dağıtılmıştır.
3. İki kat güçte hazırlanmış besiyeri olan RPMI (%2) G’den 9.9 mL alınarak on farklı tüpe dağıtılmıştır.
4. Antifungal ilaçlardan 100 ml alınıp 9.9 mL RPMI konulan tüplerin içlerine aktarılmıştır (1:100 dilüsyon).

3.2.4. Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması

Steril plastik, düz tabanlı, tek kullanımlık 96 kuyucuklu 300 µL kapasiteye sahip plaklar kullanılmıştır. Mikroplağın 1-10 kuyucuklarına 2x final konsantrasyonda hazırladığımız antifungal ilaç içeren besiyerinden 100 µL dağıtılmıştır. 11. plak sırası üreme kontrol ve 12. plak sırası negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 6. Antifungal dilüsyon serileri ve final konsantrasyon hazırlanması (247).

Step	Concentration (mg/L)	Source	Volume of antifungal (µL)	Volume of solvent ^a (µL)	Intermediate concentration (mg/L)	Concentration (mg/L) after 1:100 dilution with double strength RPMI 2%G ^b
1	12 800 ^c	Stock	200	0	12,800	128
2	12 800	Stock	100	100	6,400	64
3	12 800	Stock	50	150	3,200	32
4	12 800	Stock	50	350	1,600	16
5	1600	Step 4	100	100	800	8
6	1600	Step 4	50	150	400	4
7	1600	Step 4	50	350	200	2
8	200	Step 7	100	100	100	1
9	200	Step 7	50	150	50	0.5
10	200	Step 7	25	175	25	0.25

3.2.5. Mikrodilüsyon plaklarının saklanması

Plaklar alüminyum folyo ile kapatılarak – 20⁰C’de saklanmıştır. Gerekğinde -70⁰C’de altı ay kadar saklanabilmektedir.

3.2.6. Maya inokulumünün hazırlanması

Maya inokulumü 18-24 saatlik taze kültürden alınan kolonilerin distile su içinde iyice çözdürülerek elde edilmiş ve son inokulum miktarı 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 µL/cell olacak şekilde ayarlanmış ve inokulum yapılacak plaklara uygun miktarlarda dağıtılmıştır.

3.2.7. Mikrodilüsyon plaklarının inokülasyonu

Koloni süspansiyonu iyice vortekslendikten sonra son inokulum miktarı 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 µL/cell olacak şekilde hazırlanan süspansiyondan plağın 11.kuyucuğu (üreme kontrolü) da

dahil olmak üzere inoküle edilmiştir. 12. kuyucuğa ise distile su eklenmiştir (sterilite kontrolü amacıyla).

3.2.8. Mikrodilüsyon plaklarının inkübasyonu

Alüminyum folyo ile kaplanan mikrodilüsyon plakları 35⁰C’de ya da 37⁰C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.9. Sonuç okuma

İnkübasyonun ardından plaklar mikrodilüsyon plak okuyucusu cihazında okutulmalıdır. Sonuç okuturken önerilen dalgaboyu 530 nm ancak 450 ve 405 nm dalgaboyunda ölçüm yapan spektrofotometre de kullanılabilir. Çalışmamızda 450 nm dalga boyunda ölçüm yapan spektrofotometre kullanılmıştır.

3.2.10. Amfoterisin B

24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan okuma sonucuna göre amphotericin B için ilaçsız kontrol kuyucuguna göre kıyaslandığında üremenin %90 inhibe olduğu kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.2.11. Azol grubu antifungaller

24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan okuma sonucuna göre azol grubu antifungaller için ilaçsız kontrol kuyucuguna göre kıyaslandığında üremenin %50 azaldığı kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.3. Tanımlama

3.3.1. BD Phoenix 100 otomatize tanımlama sistemi

Kültürden izole edilen non-albicans *Candida* izolatlarının tanımlanması amacı ile BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) tam otomatize maya identifikasyon sistemi kullanıldı (Tablo 7). Tek kullanımlık steril eküvyonlu çubukla alınan koloniler Phoenix ID besiyeri (4,5 ml) içinde süspanse edildi. Mayaların identifikasyonunda hazırlanan koloni süspansiyonu 2 McFarland bulanıklığına uygun olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra Phoenix yeast panel ID kısmına dökülüp yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı.

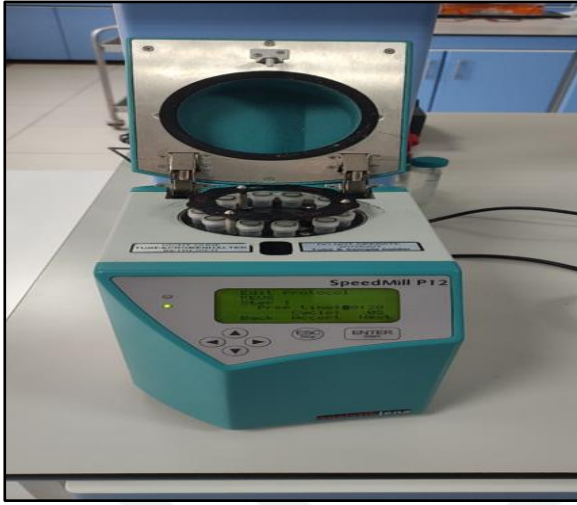
Tablo 7. Phoenix otomatize maya identifikasyon sisteminde kullanılan biyokimyasal reaktifler.

A_Aspargine-7-Amido-4-Methylcoumain	C-Fruktoz
A_Benyl-l_Cysteine7-A-4-M	C-Sükroz
A_Glycine-Arginine-7-A-4-M	D-Fruitoz
A_Glycine-Proli-7-A-4-M	D-Galaktoz
A_Glycine-7-Amido-4-Methylcoumain	D-Dextroz
A_H-B-Alanine-7-Amido-4-ethylcoumain	T-Esculin
A_l-Alanine-7-Amido-4-Methylcoumain	S-Ürea
A_l-Arginine-7-Amido-4-Methylcoumain	A_l-Arginine-7-Amido-4-Methylcoumain
A_l-Sitruline-7-Amido-4-Methylcoumain	A_l-Sitruline-7-Amido-4-Methylcoumain
S-Glicine-Thiamine-Nsa	S-Glicine-Thiamine-Nsa
A_l-Glutamine-7-Amido-4-ethylcoumain	A_l-Glutamine-7-Amido-4-ethylcoumain
A_l-Proline-7-Amido-4-Methylcoumain	A_l-Proline-7-Amido-4-Methylcoumain
N-1-Proline-P-Nitroanilide-Nh	N-1-Proline-P-Nitroanilide-Nh
A_l-Tryptophane-7-A-4-M	A_l-Tryptophane-7-A-4-M
A_l-Valine-7-Amido-4-Methylcoumain	A_l-Valine-7-Amido-4-Methylcoumain
O-Nitrophenyl-B-D-Glucosine	O-Nitrophenyl-B-D-Glucosine
A_l-Lysine-Alanin-7-A-4-M	A_l-Lysine-Alanin-7-A-4-M
A_Ornithine-7-Amido-4-Methylcoumain	D-Tagatoz
A_Threonine-7-Amido-4-Methylcoumain	C-Mannitol
C- Dekstroz	Polimiksin
D-Glukonik Asit	3-Metil Glutarik Asit

3.4. *Candida* İzolatlarının Homojenizasyon Basamağı

Örneklerdeki *Candida* izolatlarının DNA'larını izole etmek amacıyla mayalar homojenize edilmiştir. Homojenizasyon basamakları şu şekildedir; 2 ml vidalı tüplere 400 µl otoklavlanmış steril deiyozize saf su ve boncuk konularak kontaminasyon ortadan kaldırılması amacıyla vidalı tüpler yarım saat UV lamba altında bırakılmıştır. Saf kültür haline getirilmiş mantar örneklerinden sınıf 2 biogüvenlik kabini içerisinde tek kullanımlık öze kullanılarak mantar örnekleri 2 ml lik vidalı tüplere transfer edilmiştir. Homojenizasyon işleminde Analitik Jena Homojenizasyon cihazı (Analitik Jena, Almanya) (Şekil 3.A) kullanılmıştır. Cihaz çalkalama hızı olarak 4 m/s 20 saniye ve ısı kaynaklı örnek hasarını önlemek maksadı ile soğutmalı olarak ayarlanmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 (g)'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmıştır (Şekil 3.B). Süpernatant kısmına DNA izolasyonu için

CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide / Setil-trimetil-amonyum bromit) metodu uygulanmıştır (249,250).



Şekil 3. A. Analitik Jena cihazı.

B. Santrifüj cihazı

3.5. DNA İzolasyon Basamağı

Hastalardan alınan örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin DNA'sının izolasyonunda CTAB metodu kullanılmıştır. İşlem basamakları şu şekilde uygulanmıştır;

CTAB Solüsyonunun Hazırlanması:

CTAB BUFFER: (100ml İçin), TRIS-HCL- 100Mm, EDTA- 25Mm, NaCl- 1.5M, C-TAB- %2, Double Distilled Water ile 100 ml'ye tamamlanır. CIA: Chloroform: izoamil alkol (24:1) oranında hazırlandı. B- Merkaptotanol, %70 etanol, TE (1:10), Tüm kimyasal magnetik karıştırıcıda karıştırılarak pH 8'e ayarlanarak otoklavlanmıştır. Otoklavdan sonra 400 µl merkaptotanol eklenmiştir (249,250).

İzolasyon basamakları;

1. Süpernatanı alınan örneklerin üzerine 1000 µl extraction buffer eklendi ve 65⁰ C'de 1 saat çalkalamalı ısıtıcı blokta (Analitik Jena, Almanya) inkübe edilmiştir (Şekil. 4).
2. Kloroform izoamilalkol (24/1) (96 ml kloroform 4 ml izoamilalkol) 1000 µl üzerine eklenerek 12000 (g)'de 10 dk sanrifüj edilerek süpernatant yeni bir 2 ml'lik tüpe alındı. Ardından bunun üzerine 1000 µl kloroform izoamilalkol eklenerek 12000 (g)'de 10 dk santrifüj edilerek üst kısım yeni bir 2 ml'lik tüpe aktarılmıştır.

3. Tüpteki sıvı kısmın üzerine 1000 µl propanol eklenerek 45 dk -20⁰C'de bekletilmiştir.
4. Daha sonra 12000 (g)'de santrifüj yapıldı ve süpernatant atılmıştır.
5. Pellet üzerine 500 µl %70'lik etanol koyarak 13000 (g)'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant atılarak etanolün tamamen uçması için 10 dk steril kabin içerisinde yanında bekletilmiştir.
7. Tüpler üzerine 100 µl deiyonize ultra safsu eklenerek DNA elde edilmiştir.



Şekil 4. Analytik Jena TMix çalkalamalı ısıtıcı blok

3.5.1. DNA saflığının belirlenmesi

DNA saflığını ölçmek için Nanodrop cihazı kullanıldı. 260/280 oranı 1,8-2,0 olacak şekilde kontrol edildi, uygun aralıkta olmayanlar yeniden ekstrakte edildi. Çalışma koşullarının eşit olması için DNA konsantrasyonları 30 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.5.2. PCR ile gen bölgelerinin çoğaltılması

Candida türlerinin tanımlanmasında mantar rDNA'sının 5.8S bölümünde ITS genini amplifiye etmek için tüm mantarlara özgü universal primerler olan ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ve ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') kullanıldı. PCR ile gen bölgelerinin çoğaltılmasında ticari kit (QIAGEN, Cat. No: 201443) ve PRC cihazı (Şekil. 5) kullanıldı. PCR protokolü kitin önerdiği şekilde yapılmıştır. PCR da kullanılacak mix karışımının 1 kuyucuk için gerekli miktarı Tablo 9. da belirtilmiştir.



Şekil 5. *Candida* DNA'larının çoğaltılmasında kullanılan PCR cihazı

Tablo 8. Kullanılacak PCR mix karışım hazırlama tablosu

Kimyasal	Son hacim (µl)	Son konsantrasyon
10X PCR tamponu	5	1X
Forward primer (5 pmol/µl)	2	5 pmol
Reverse primer (5 pmol/µl)	2	5 pmol
Deoksi NTPs (25 mM)	1	0.25 mM
MgCl ₂ (50 mM)	3	1.5 mM
Genomik DNA (30 ng/µl)	2	30 ng
TaqDNA polimeraz (5 U/µl)	0,4	1U
Loding Dye	10	1 X
Steril bidistile su	24,6	
Total Hacim	50	

PCR cihazında uygulanacak amplifikasyon basamak protokolünde annealing sıcaklığının optimizasyonu için gradiyent yöntemi kullanılarak farklı annealing sıcaklıkları (52°C, 54°C 56°C, 58°C, 60°C, 62°C) kullanıldı. Elde edilen ürünler jel elektroforezinde yürütülerek en uygun sıcaklık (54°C) belirlendi ve PCR cihazında uygulanacak amplifikasyon basamak protokolünde ise Tablo 9.'da belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Tablo 9. PCR amplifikasyon basamak protokolü

Basamak I		Basamak II		Basamak III	Basamak IV
(1 defa)		(35 defa)		(1 defa)	(1 defa)
96.0 °C	96.0 °C	54.0 °C	72.0 °C	72 °C	4.0 °C
5 dk	30 sn	45 sn	1 dk	10 dk	∞

3.5.3. Agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyonla elde edilen PCR ürünün 8 µl'sine 3/4 µl bromfenol mavisi eklendi. %1,5'lik etidyum bromid ile boyanan agaroz jel (Vivantis, Malezya) içindeki kuyucuklara yerleştirilerek 1X TBE tampon ile doldurulmuş tank içinde 80V'ta 30 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur.

3.5.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV transillüminatör (UVP EC3 Chemi HR 410 Bioimaging System, Cambridge, UK) altında görüntülenip fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. DNA Dizi Analizi

Bu tez çalışmasında sekans ve DNA gen dizi analizi işlemleri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi ÜSKİM (Üniversite- Sanayi- Kamu İş birliği Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi)'den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada DNA gen dizi analizi için AB 3130 XL 16 kapiller cihazı (Hitachi, Japonya) kullanıldı. PCR işlemleri içinde Ependorf AG – Vapo Protect cihazı kullanılmıştır. Dizi analizinde cihaz protokolüne göre sırasıyla pürifikasyon basamakları uygulanmış, ardından PCR uygulaması yapılmıştır. PCR ürünlerinin %2 lik agarose (Vivantis, Malezya) jel elektroforezinde yürütülmesinden sonra net bant veren ürünler dizi analiz protokolüne tabi tutulmuştur. Dizi analizi işlemi için ilk olarak enzimatik temizleme yapılmıştır. İzolatlardaki DNAların sekans analizi yapılmadan önce EXOSAP ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup ticari kiti kullanılarak izolatlar içerisindeki reaksiyona girmeyen primer ve dNTP'lerin giderilmesi için kullanılmıştır. Bu amaç için kitin protokolü uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa daha önce çoğaltılan edilen DNA'dan 2,5 µL konulup üzerine Exosap kitinin reaktifinden 1 µL ilave edilmiş ve pipetajla karışması sağlanmıştır (Tablo 10). Ardından bu örnekler PCR cihazına yerleştirilerek Tablo 11'de belirtildiği üzere cihaz ayarlanmış ve temizleme basamağı PCR protokolü uygulanmıştır.

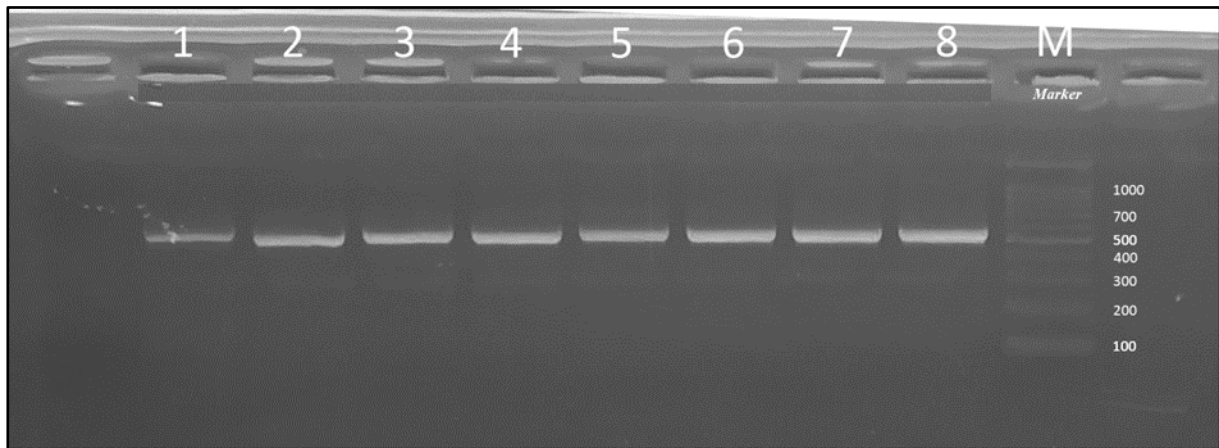
Tablo 10. EXOSAP reaksiyon mixin hazırlanması

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
PCR ürünü	2,5
Exosap	1
Total hacim	3,5

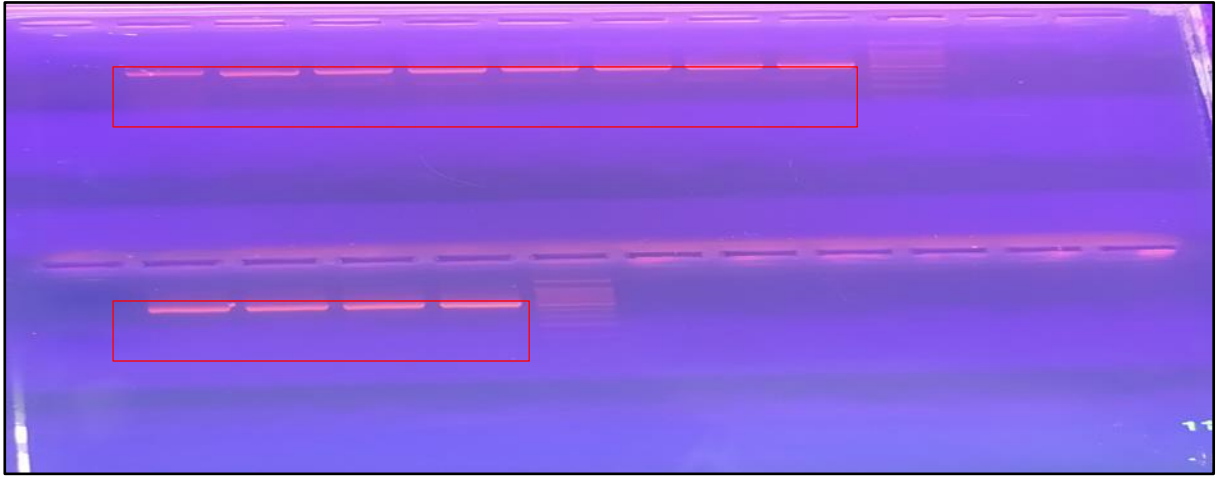
Tablo 11. EXOSAP temizleme basamağı PCR protokolü

Basamak I	Basamak II	Basamak III
37°C	80°C	4°C
30 dk	15 dk	∞

Temizleme basamağından sonra jel elektroforezinde net bant veren ürünler alınarak DNA dizi analizi işlemlerinde kullanılmıştır (Şekil 7). BD Phoenix 100 cihazında tanımlanan *Candida* türlerine ait ITS1 ve ITS4 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Cycle Sequencing PCR Mix'i Tablo 3.10'da belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Cycle Sequencing işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından PCR Mix ile SAM solüsyonundan Tablo 12'de belirtilen oranlarda alınarak SAM mixi hazırlanmıştır. Son olarak örneklerin yüklendiği 96 kuyucuklu plaklar 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sekans cihazına yüklemeden önce tüm örnekler sigma 3-16p plate santrifüjde 3000 rpm'de 3 dk spin down işlemine tabi tutulmuş ve ardından sekans cihazına yüklenmiştir. Sekans cihazı Tablo 12 Big Dye 3.1. PCR protokolüne uyarlanarak dizi analizi yapılmıştır.



Şekil 6. ITS1 ve ITS4 primerleri ile çoğaltılan DNA bölgesine ait PCR ürünleri (1. *C. firmetaria* (*C. parapsilosis* kompleks), 2. *C. glabrata* kompleks, 3. *C. kefyr*, 4. *C. krusei*, 5. *C. lambica*, 6. *C. norvegensis*, 7. *C. parapsilosis* kompleks, 8. *C. tropicalis*, M: Marker)



Şekil 7. Temizleme basamağından sonra PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü

Tablo 12. Cycle Sequencing PCR Mix hazırlanma protokolü

Reaksiyon Karışımı Miktar (µl)	Miktar (µl)
PCR ürünü	3,5
Big Dye	2
Buffer(5x)	2
Steril distile su	0,5
Primer (F, R,2 ng/ul)	2
Total Hacim	10

Tablo 13. SAM mixi hazırlanma protokolü

Her 10 ul cycle sequencing ürünü için	
Sam solution	45 ul
BigDye XTerminator™ Solution	10 ul
Total	65 ul

Tablo 14. BigDye v 3.1. PCR protokolü

Basamak I		Basamak II		Basamak III
(1 defa)		(25 defa)		(1 defa)
96.0 °C	96.0 °C	50.0 °C	60.0 °C	4.0 °C
1:00dk	0:10dk	0:05dk	4:00dk	∞

Elde edilen diziler analiz edildi ve BLAST dizi arama aracı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kullanılarak GenBank veri tabanından elde edilen referans verilerle karşılaştırılmıştır.

3.7. Filogenetik Analiz

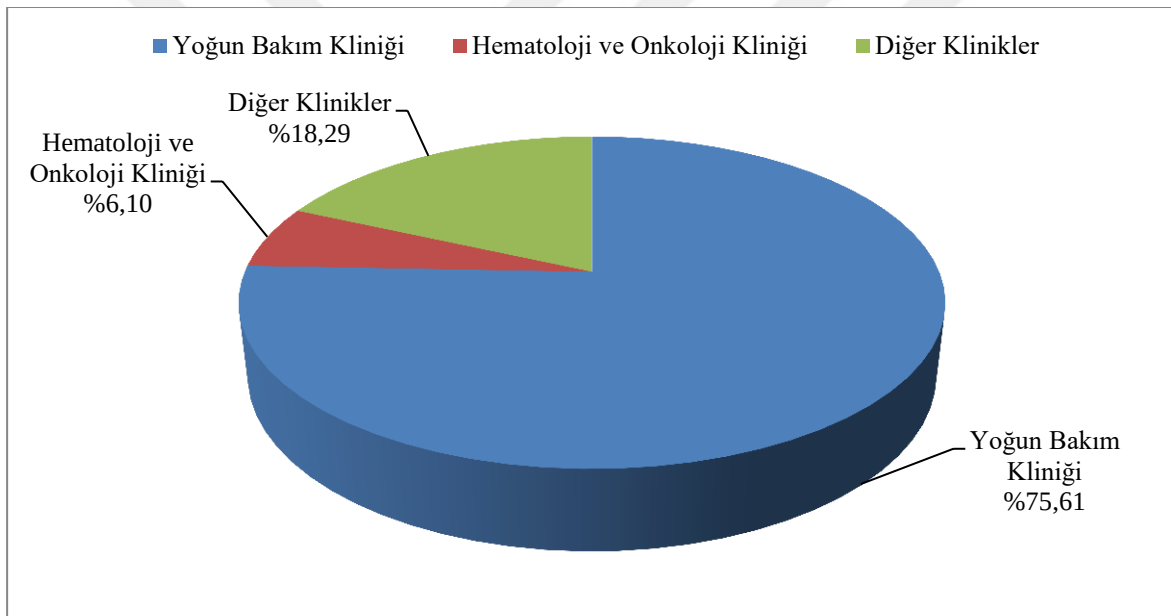
ITS-1 ve ITS-4 alanlarının dizileme sonuçları değerlendirilmiş ve MEGA 7 (TreeView yazılımı) kullanılarak komşu birleştirme yöntemiyle referans dizilerle karşılaştırılarak tür tanımlaması yapılmıştır.



4. BULGULAR

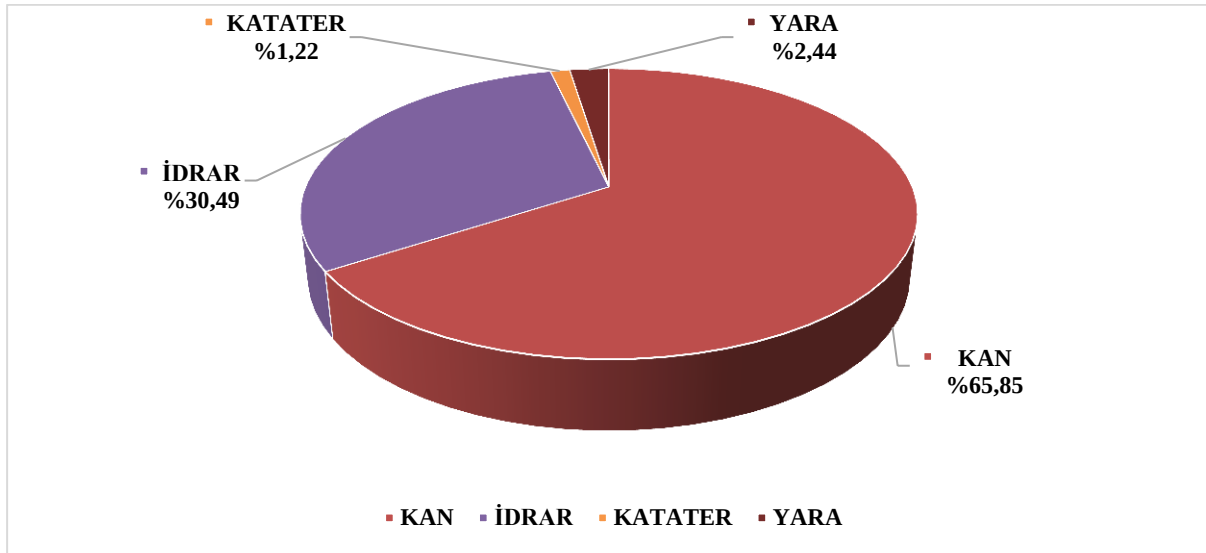
Çalışmada 82 klinik izolat ve standart bir suş olan *C. albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan örneklerin alındığı hastaların sosyodemografik bilgileri istatistiksel olarak incelendiğinde hastaların yaş ortalaması $59,77 \pm 27,49$ olarak hesaplanmıştır. Örneklerin alındığı hastaların %48,80'ini erkekler, %51,20'sini kadınların oluşturduğu belirlenmiştir. Erkek hastaların yaş ortalaması $59,77 \pm 27,49$ ve kadın hastaların yaş ortalaması $55,55 \pm 25,40$ olarak hesaplanmıştır.

Örneklerin 62 (%75,61)'si yoğun bakım ünitelerinden, 5 (%6,10)'i Hematoloji ve Onkoloji Kliniği ve 15 (%18,29)'i diğer kliniklerden gönderilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Çalışmada kullanılan klinik örneklerin bölümlere göre dağılımı

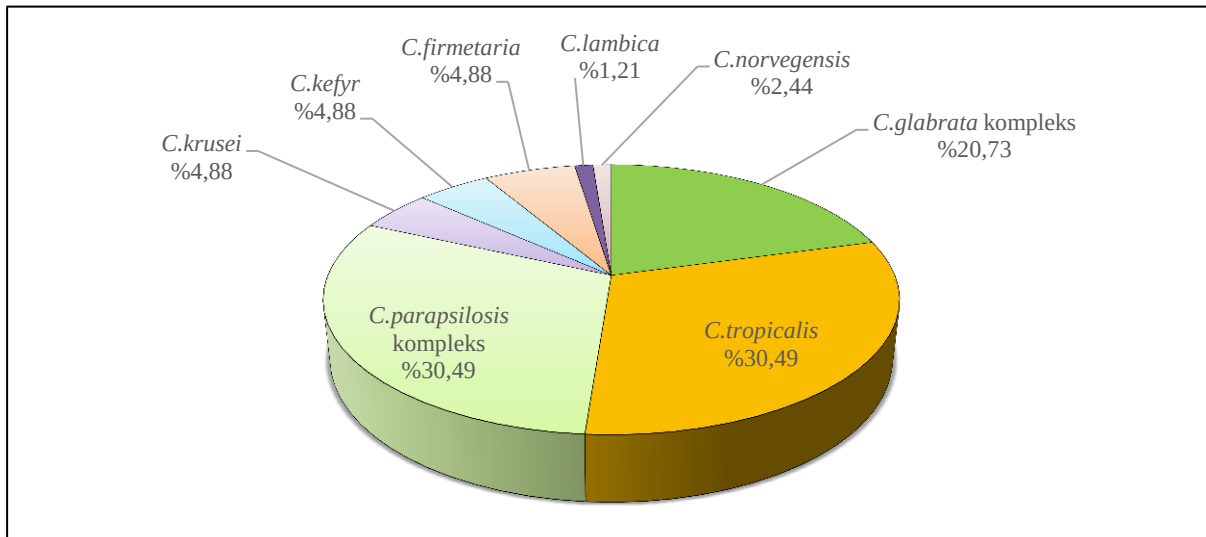
İzolatların 54 (%65,85)'ü kandan, 25 (%30,49)'i idrardan, 2 (%2,44)'si yaradan ve 1 (%1,22)'i ise kateterden elde edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Klinik örneklerin dağılımı

4.1. BD Phoenix 100 Tanımlama Sistemi ile İdentifikasyon

BD Phoenix 100 otomatize tanımlama sistemi NAC türleri içinde en sık *C. tropicalis* 25 (%30,49) ve *C. parapsilosis* kompleks 25 (%30,49) türleri tanımlanmıştır. Daha sonra sırasıyla; *C. glabrata* kompleks 17 (%20,73), *C. krusei* 4 (%4,88), *C. kefyr* 4 (%4,88), *C. firmetaria* 4 (%4,88), *C. lambica* 1 (%1,21) ve *C. norvegensis* 2 (%2,44) tespit edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. BD Phoenix 100 otomatize tanımlama cihazı ile tanımlanan türlerin dağılımı

4.2. DNA Dizi Analiz Sonuçları

DNA dizi analizinde sıklık sırasına göre; 30 (%36,59) *C. tropicalis*, 25 (%30,49) *C. parapsilosis* kompleks, 18 (%21,95) *C. glabrata* kompleks, 5 (%6,10) *C. kefyr* ve 3 (%3,66) *C. krusei* tanımlanmıştır (Tablo 15).

Tablo 15. İzolatların tür düzeyinde tanımlama sonuçları

Non-albicans <i>Candida</i> Tür Tipleri	Tespit edilen türün sayısı (n)	Yüzdelik oranı (%)
<i>C.glabrata</i> kompleks	19	23,17
<i>C.tropicalis</i>	30	36,58
<i>C.parapsilosis</i> kompleks	25	30,49
<i>C.krusei</i>	3	3,66
<i>C.kefyr</i>	5	6,1
<i>C.firmitaria</i>	0	-
<i>C.lambica</i>	0	-
<i>C.norvegensis</i>	0	-

4.2.3.Tanımlama yöntemlerinin karşılaştırılması

İzolatların tanımlanmasında altın standart yöntem olarak DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Altın standart yöntemin sonucu “doğru” kabul edilerek, her bir türün tanımlanması için ayrı ayrı olmak üzere her testin doğruluğu ve yanlışlığı hesaplanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. *Candida* türlerinin moleküler tanımlama sistemi ve BD Phoenix Otomatize sisteme göre tanımlama oranları

Tür	BD Phoenix100		Moleküler Yöntem	
	n	%	n	%
<i>C. firmetaria</i>	4	4,9	0	0
<i>C. glabrata</i> kompleks	17	20,7	19	23,2
<i>C. kefyr</i>	4	4,9	5	6,1
<i>C. krusei</i>	3	3,7	3	3,6
<i>C. lambica</i>	1	1,2	0	0
<i>C. norvegensis</i>	2	2,4	0	0
<i>C. parapsilosis</i> kompleks	25	30,5	25	30,5
<i>C. tropicalis</i>	26	31,7	30	36,6

Moleküler yöntem referans alındığında, BD Phoenix tanımlama yönteminin 82 örnekten 62'sini (%75,60) doğru sınıflandırdığı görülmüştür. Buna göre BD Phoenix 100 otomatize sistem ile 4 izolat *C. firmetaria* olarak saptanmış iken, moleküler yöntemde 3 izolat *C. glabrata* kompleks ve 1 izolat *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır.

Benzer şekilde BD Phoenix 100 otomatize sistem ile 6 örnek *C. glabrata* kompleks olarak tanımlanmış iken, moleküler tanımlama (DNA dizi analizi) ile örneklerden ikisi *C. tropicalis*, bir örnek *C. parapsilosis* kompleks, bir örnek *C. metapsilosis* (*C. parapsilosis* kompleks), bir örnek *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyr*) ve diğer örnek ise *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei* telemorf) olarak değerlendirilmiştir. Yine otomatize sistem ile 3 örnek *C. parapsilosis* kompleks olarak tespit edilmiş iken moleküler yöntemle aynı örnekler *C. glabrata* kompleks olarak tanımlanmıştır.

Moleküler yöntem, BD Phoenix 100 otomatize sistem ile tanımlanan *C. tropicalis*'i *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyr*) olarak, *C. kefyr*'i *C. tropicalis* olarak, *C. lambica*'yı *C. parapsilosis* kompleks olarak ve *C. norvegensis*'i *C. glabrata* kompleks olarak analiz edilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Yöntemlerin karşılaştırılmasında uyumlu olmayan sonuçlar

Stok No	BD Phoenix Otomatize Tanımlama Sistemi Sonucu	Moleküler Tanımlama Sistemi (DNA Dizi Analizi) Sonucu
1025	<i>C.firmetaria</i>	<i>C.tropicalis</i>
1055	<i>C.firmetaria</i>	<i>C.glabrata</i> kompleks
1033	<i>C.firmetaria</i>	<i>C.glabrata</i> kompleks
1081	<i>C.firmetaria</i>	<i>C.glabrata</i> kompleks
980	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>C.metapsilosis</i> (<i>C. parapsilosis</i> kompleks)
1068	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>C.kefyr</i>)
1070	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>C.tropicalis</i>
1073	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>C.tropicalis</i>
1048	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>C.krusei</i> telemorf)
1052	<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
1027	<i>C.kefyr</i>	<i>C.tropicalis</i>
1043	<i>C.krusei</i>	<i>C.tropicalis</i>
1074	<i>C.krusei</i>	<i>C.tropicalis</i>
1079	<i>C.lambica</i>	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
1005	<i>C.norvegensis</i>	<i>C.glabrata</i> kompleks
1026	<i>C.norvegensis</i>	<i>C.glabrata</i> kompleks
982	<i>C.parapsilosis</i> kompleks	<i>C.glabrata</i> kompleks
1013	<i>C.parapsilosis</i> kompleks	<i>C.glabrata</i> kompleks
975	<i>C.parapsilosis</i> kompleks	<i>C.glabrata</i> kompleks
1020	<i>C.tropicalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>C.kefyr</i>)

İki yöntem arasındaki kappa katsayısı 0,655 olarak elde edilmiştir. Kappa katsayısına göre iki yöntem arasında önemli derecede uyum sağlandığı gözlemlenmiştir. BD Phoenix tanımlama sisteminin toplam doğruluk oranı 0,756 olarak elde edilmiştir ($p < 0.001$). Otomatize tanımlama sistemi *C. glabrata* kompleks türlerinin 11 (%57,9)'ini, *C. kefyr* türlerinin 3 (%60)'ünü, *C. krusei* türlerinin 1 (%33,3)'ini, *C. parapsilosis* kompleks türlerinin 22 (%88)'sini ve *C. tropicalis* türlerinin ise 24 (% 80)'ünü doğru şekilde tanımlamıştır (Tablo 18).

Tablo 18. Moleküler tanımlama sistemi (DNA dizi analizi) ve BD Phoenix 100 otomatize tanımlama sistemi sonuçlarının karşılaştırılması

BD Phoenix 100		DNA Dizi Analizi				
		<i>C.glabrata</i> kompleks	<i>C.kefyr</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i> kompleks	<i>C.tropicalis</i>
<i>C.firmetaria</i>	n	3	0	0	0	1
	%	15,80%	0,00%	0,00%	0,00%	3,30%
<i>C.glabrata</i> kompleks	n	11	1	1	2	2
	%	57,90%	20,00%	33,30%	8%	6,70%
<i>C.kefyr</i>	n	0	3	0	0	1
	%	0,00%	60,00%	0,00%	0,00%	3,30%
<i>C.krusei</i>	n	0	0	1	0	2
	%	0,00%	0,00%	33,30%	0,00%	6,70%
<i>C.lambica</i>	n	0	0	0	1	0
	%	0,00%	0,00%	0,00%	4%	0,00%
<i>C.norvegensis</i>	n	2	0	0	0	0
	%	10,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>C.parapsilosis</i> kompleks	n	3	0	0	22	0
	%	15,80%	0,00%	0,00%	88,00%	0,00%
<i>C.tropicalis</i>	n	0	1	1	0	24
	%	0,00%	20,00%	33,30%	0,00%	80,00%

4.4. Antifungal Duyarlılık Testi

4.4.1. Amfoterisin B ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları

Amfoterisin B duyarlılık testi, klinik örneklerden izole edilen 82 NAC izolatu için çalışılmıştır. Buna göre 17 *C. glabrata* kompleks türünden 1 (%5,88) tanesi dirençli bulunmuştur ($MİK_{90}=4 \mu\text{g/mL}$). İzole edilen 4 adet *C. krusei* türünün tamamı (%100) amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur ($MİK_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$). 25 *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanan 21 izolatu amfoterisin B'ye duyarlı olduğu, 4 (%16) izolatu ise amfoterisin B'ye dirençli olduğu belirlenmiştir ($MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 2, 2, 8 ve 8 $\mu\text{g/mL}$). 25 *C. tropicalis* izolatından 1 (%4)'i amfoterisin B'ye dirençli bulunmuştur ($MİK_{90}=2 \mu\text{g/mL}$). Kalan 24 *C. tropicalis* izolatu ise amfoterisin B'ye duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen $MİK$ değerleri Tablo 19'da belirtilmiştir.

Tablo 19. *Candida* türlerine göre amfoterisin B direnç durumu ve MİK değerleri

Sıra No	Stok No	Amfoterisin B		NAC türleri
		MİK 90	Direnç	
1	1025	0.0625	—	<i>C.firmetaria</i>
2	1055	0.5	—	<i>C.firmetaria</i>
3	1033	0.25	—	<i>C.firmetaria</i>
4	1081	0.125	—	<i>C.firmetaria</i>
5	978	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
6	980	4	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
7	995	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
8	935	1	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
9	977	0.25	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
10	1028	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
11	1056	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
12	1057	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
13	1023	0.25	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
14	1031	0.25	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
15	1068	1	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
16	1070	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
17	1073	1	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
18	1039	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
19	1045	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
20	1048	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
21	1052	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
22	1006	1	—	<i>C.kefyr</i>
23	1027	0.5	—	<i>C.kefyr</i>
24	1059	1	—	<i>C.kefyr</i>
25	1075	0.25	—	<i>C.kefyr</i>
26	992	0.0312	S	<i>C.krusei</i>
27	1043	0.5	S	<i>C.krusei</i>
28	1047	0.5	S	<i>C.krusei</i>
29	1074	1	S	<i>C.krusei</i>
30	1079	0.125	—	<i>C.lambica</i>
31	1005	0.5	—	<i>C.norvegensis</i>
32	1026	0.0156	—	<i>C.norvegensis</i>
33	982	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
34	983	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
35	990	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
36	1000	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
37	1002	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
38	1015	2	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
39	1013	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
40	955	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
41	958	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
42	925	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
43	926	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
44	929	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
45	933	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
46	959	2	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
47	973	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
48	975	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
49	1024	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
50	1064	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
51	1060	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
52	928	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
53	1040	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
54	1072	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
55	1049	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
56	1077	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
57	1076	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
58	981	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
59	989	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
60	991	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
61	997	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
62	1001	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
63	1011	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
64	957	1	S	<i>C.tropicalis</i>
65	930	1	S	<i>C.tropicalis</i>
66	941	1	S	<i>C.tropicalis</i>
67	960	2	R	<i>C.tropicalis</i>
68	972	1	S	<i>C.tropicalis</i>
69	1058	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
70	1063	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
71	1051	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
72	1041	0.25	S	<i>C.tropicalis</i>
73	1042	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
74	1020	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
75	1046	0.58	S	<i>C.tropicalis</i>
76	1044	0.25	S	<i>C.tropicalis</i>
77	1053	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
78	1004	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
79	1069	1	S	<i>C.tropicalis</i>
80	1061	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
81	1071	1	S	<i>C.tropicalis</i>
82	1050	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>

Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

EUCAST 10.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri tüm türler için amfoterisin B için $1 \leq$ duyarlı; $1 >$ dirençli olarak değerlendirilmektedir. S: Duyarlı, R: Dirençli.

4.4.2. Flukonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları

Flukonazol ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 82 adet NAC izolatı dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda *C. glabrata* kompleks türüne ait 17 örneğin 6 (%35,29) tanesi flukonazole dirençli bulunmuştur (MİK₅₀ değerleri sırası ile 32, 128, 128, 32, 32, 128 µg/mL olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 25 *C. tropicalis* izolatının 9 (%36) tanesinin flukonazole dirençli olduğu görülmüştür. MİK₅₀ değerleri sırası 8, 8, 8, 16, 16, 32, 8, 8, 8 µg/mL, olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde izole edilen *C. parapsilosis* komplekse ait 25 izolattan 7 (%28) izolatın flukonazole dirençli olduğu saptanmıştır. Dirençli izolatların MİK₅₀ değerleri sırasıyla, 8, 8, 8, 8, 8, 16, 32 µg/mL olarak belirlenmiştir. İzole edilen *C. krusei* türü için duyarlılık sonucu elde edilememiştir. Çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri Tablo 20’de belirtilmiştir.

Tablo 20. *Candida* türlerine göre flukonazol direnç durumu ve MİK değerleri

Sıra No	Stok No	Flukonazol		NAC türleri
		MİC 50	Direnç	
				BD Phoenix 100
1	1025	0.25	—	<i>C.firmetaria</i>
2	1055	0.5	—	<i>C.firmetaria</i>
3	1033	16	—	<i>C.firmetaria</i>
4	1081	16	—	<i>C.firmetaria</i>
5	978	32	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
6	980	4	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
7	995	8	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
8	935	128	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
9	977	16	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
10	1028	0.5	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
11	1056	0.25	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
12	1057	128	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
13	1023	1	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
14	1031	16	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
15	1068	0.25	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
16	1070	4	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
17	1073	8	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
18	1039	32	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
19	1045	32	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
20	1048	128	R	<i>C.glabrata</i> kompleks
21	1052	4	S	<i>C.glabrata</i> kompleks
22	1006	1	—	<i>C.kefyr</i>
23	1027	0.25	—	<i>C.kefyr</i>
24	1059	4	—	<i>C.kefyr</i>
25	1075	0.5	—	<i>C.kefyr</i>
26	992	64	—	<i>C.krusei</i>
27	1043	2	—	<i>C.krusei</i>
28	1047	16	—	<i>C.krusei</i>
29	1074	4	—	<i>C.krusei</i>
30	1079	16	—	<i>C.lambica</i>
31	1005	16	—	<i>C.norvegensis</i>
32	1026	0.5	—	<i>C.norvegensis</i>
33	982	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
34	983	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
35	990	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
36	1000	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
37	1002	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
38	1015	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
39	1013	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
40	955	4	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
41	958	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks

Sıra No	Stok No	Flukonazol		NAC türleri
		MİC 50	Direnç	
				BD Phoenix 100
42	925	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
43	926	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
44	929	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
45	933	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
46	959	4	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
47	973	0.5	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
48	975	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
49	1024	4	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
50	1064	8	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
51	1060	16	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
52	928	2	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
53	1040	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
54	1072	32	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
55	1049	4	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
56	1077	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
57	1076	1	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
58	981	8	R	<i>C.tropicalis</i>
59	989	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
60	991	4	S	<i>C.tropicalis</i>
61	997	8	R	<i>C.tropicalis</i>
62	1001	1	S	<i>C.tropicalis</i>
63	1011	2	S	<i>C.tropicalis</i>
64	957	8	R	<i>C.tropicalis</i>
65	930	16	R	<i>C.tropicalis</i>
66	941	4	S	<i>C.tropicalis</i>
67	960	16	R	<i>C.tropicalis</i>
68	972	32	R	<i>C.tropicalis</i>
69	1058	1	S	<i>C.tropicalis</i>
70	1063	4	S	<i>C.tropicalis</i>
71	1051	1	S	<i>C.tropicalis</i>
72	1041	4	S	<i>C.tropicalis</i>
73	1042	1	S	<i>C.tropicalis</i>
74	1020	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
75	1046	8	R	<i>C.tropicalis</i>
76	1044	2	S	<i>C.tropicalis</i>
77	1053	8	R	<i>C.tropicalis</i>
78	1004	1	S	<i>C.tropicalis</i>
79	1069	8	R	<i>C.tropicalis</i>
80	1061	8	S	<i>C.tropicalis</i>
81	1071	0.5	S	<i>C.tropicalis</i>
82	1050	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>

Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

EUCAST 10.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri *C. glabrata* kompleks için flukonazol 0.001 ≤ S: Duyarlı, 16> R: dirençli. *C. parapsilosis* kompleks için flukonazol 2 ≤ S: Duyarlı, 4> R: Dirençli. *C. tropicalis* için flukonazol 2 ≤ S: Duyarlı, 4> R: Dirençli değerlendirilmiştir.

4.4.3. İtrakonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları

İtrakonazol ile yapılan çalışmaya 82 adet NAC izolatu dahil edilmiştir. Çalışmamızda *C. glabrata* kompleks ve *C. krusei* türlerinin itrakonazol duyarlılığına dair yeterli veri elde edilememiştir. İzole edilen *C. tropicalis*'e ait 25 izolattan 11 (%44)'inin itrakonazole dirençli olduğu görülmüştür. MİK₅₀ değerleri sırası ile 0.25, 0.5, 1, 0.5, 0.25, 0.25, 1, 0.25, 0.5, 0.5, 0.5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde *C. parapsilosis* kompleks'e ait 25 izolattan 9 (%36)'unun itrakonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dirençli izolatların MİK₅₀ değerleri sırası ile 0.5, 0.5, 0.25, 0.25, 4, 0.25, 0.25, 0.25, 0.25 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri Tablo 21'de belirtilmiştir.

Tablo 21. *Candida* türlerine göre itrakonazol direnç durumu ve MİK değerleri

Sıra No	Stok No	İtrakonazol		NAC türleri
	İzolat	MİK 50	Direnç	BD Phoenix 100
1	1025	0.0156	—	<i>C.firmetaria</i>
2	1055	0.5	—	<i>C.firmetaria</i>
3	1033	0.5	—	<i>C.firmetaria</i>
4	1081	4	—	<i>C.firmetaria</i>
5	978	1	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
6	980	0.25	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
7	995	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
8	935	8	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
9	977	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
10	1028	0.0312	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
11	1056	0.25	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
12	1057	0.0625	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
13	1023	0.0312	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
14	1031	0.5	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
15	1068	0.0312	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
16	1070	0.5	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
17	1073	1	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
18	1039	1	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
19	1045	0.0625	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
20	1048	0.25	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
21	1052	0.25	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
22	1006	0.0625	—	<i>C.kefyr</i>
23	1027	0.0156	—	<i>C.kefyr</i>
24	1059	0.25	—	<i>C.kefyr</i>
25	1075	0.0312	—	<i>C.kefyr</i>
26	992	0.0625	IE	<i>C.krusei</i>
27	1043	0.125	IE	<i>C.krusei</i>
28	1047	1	IE	<i>C.krusei</i>
29	1074	0.25	IE	<i>C.krusei</i>
30	1079	4	—	<i>C.lambica</i>
31	1005	0.0156	—	<i>C.norvegensis</i>
32	1026	0.0156	—	<i>C.norvegensis</i>
33	982	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
34	983	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
35	990	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
36	1000	0.5	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
37	1002	0.5	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
38	1015	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
39	1013	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
40	955	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
41	958	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
Sıra No	Stok No	İtrakonazol		NAC türleri
	İzolat	MİK 50	Direnç	BD Phoenix 100
42	925	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
43	926	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
44	929	4	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
45	933	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
46	959	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
47	973	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
48	975	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
49	1024	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
50	1064	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
51	1060	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
52	928	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
53	1040	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
54	1072	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
55	1049	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
56	1077	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
57	1076	0.25	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
58	981	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
59	989	0.25	R	<i>C.tropicalis</i>
60	991	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
61	997	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
62	1001	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
63	1011	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
64	957	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
65	930	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
66	941	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
67	960	1	R	<i>C.tropicalis</i>
68	972	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
69	1058	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
70	1063	0.25	R	<i>C.tropicalis</i>
71	1051	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
72	1041	0.25	R	<i>C.tropicalis</i>
73	1042	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
74	1020	1	R	<i>C.tropicalis</i>
75	1046	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
76	1044	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
77	1053	0.25	R	<i>C.tropicalis</i>
78	1004	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
79	1069	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
80	1061	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
81	1071	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
82	1050	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>

Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

EUCAST 10.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks türlerinde itrakonazol için ≤ 0.125 ise S; duyarlı; >0.125 ise R; dirençli olarak kabul edilmektedir. IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yetersiz kanıt.

4.4.4. Vorikonazol ile yapılan antifungal duyarlılık çalışma sonuçları

Vorikonazol ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 82 adet NAC izolatı dahil edilmiştir. NAC türlerinden *C. glabrata* kompleks ve *C. krusei* için vorikonazol duyarlılığına dair yeterli veri elde edilememiştir. İzole edilen *C. tropicalis*'e ait 25 izolattan 6 (%24) tanesinin vorikonazole dirençli olduğu belirlenmiştir. Dirençli izolatların MİK₅₀ değerleri sırası ile 0.5, 1, 0.5, 1, 0.5 ve 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde izole edilen *C. parapsilosis* kompleks'e ait 25 izolattan 3 (%12) tanesinin vorikonazole dirençli olduğu saptanmıştır. Dirençli izolatların MİK₅₀ değerleri sırası ile 1, 1, 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri Tablo 22'de belirtilmiştir.

Tablo 22. Candida türlerine göre vorikonazol direnç durumu ve MİK değerleri

Sıra	Stok No	Vorikonazol		NAC türleri
No	İzolat	MİK 50	Direnç	BD Phoenix 100
1	1025	0.0156	—	<i>C.firmetaria</i>
2	1055	0.0156	—	<i>C.firmetaria</i>
3	1033	0.125	—	<i>C.firmetaria</i>
4	1081	0.125	—	<i>C.firmetaria</i>
5	978	0.5	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
6	980	0.0625	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
7	995	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
8	935	4	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
9	977	1	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
10	1028	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
11	1056	0.0625	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
12	1057	0.0625	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
13	1023	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
14	1031	0.5	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
15	1068	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
16	1070	0.25	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
17	1073	0.5	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
18	1039	2	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
19	1045	2	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
20	1048	1	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
21	1052	0.0156	IE	<i>C.glabrata</i> kompleks
22	1006	0.0156	—	<i>C.kefyr</i>
23	1027	0.0156	—	<i>C.kefyr</i>
24	1059	1	—	<i>C.kefyr</i>
25	1075	0.0156	—	<i>C.kefyr</i>
26	992	0.0312	IE	<i>C.krusei</i>
27	1043	0.0156	IE	<i>C.krusei</i>
28	1047	0.0625	IE	<i>C.krusei</i>
29	1074	0.0312	IE	<i>C.krusei</i>
30	1079	0.25	—	<i>C.lambica</i>
31	1005	0.0156	—	<i>C.norvegensis</i>
32	1026	0.0156	—	<i>C.norvegensis</i>
33	982	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
34	983	1	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
35	990	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
36	1000	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
37	1002	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
38	1015	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
39	1013	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
40	955	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
41	958	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks

Sıra	Stok No	Vorikonazol		NAC türleri
No	İzolat	MİK 50	Direnç	BD Phoenix 100
42	925	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
43	926	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
44	929	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
45	933	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
46	959	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
47	973	0.25	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
48	975	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
49	1024	0.0312	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
50	1064	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
51	1060	1	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
52	928	0.0625	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
53	1040	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
54	1072	1	R	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
55	1049	0.125	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
56	1077	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
57	1076	0.0156	S	<i>C.parapsilosis</i> kompleks
58	981	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
59	989	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
60	991	0.25	S	<i>C.tropicalis</i>
61	997	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
62	1001	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
63	1011	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
64	957	0.25	S	<i>C.tropicalis</i>
65	930	0.25	S	<i>C.tropicalis</i>
66	941	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
67	960	1	R	<i>C.tropicalis</i>
68	972	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
69	1058	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
70	1063	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
71	1051	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
72	1041	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
73	1042	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
74	1020	1	R	<i>C.tropicalis</i>
75	1046	0.5	R	<i>C.tropicalis</i>
76	1044	0.0312	S	<i>C.tropicalis</i>
77	1053	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
78	1004	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
79	1069	0.125	S	<i>C.tropicalis</i>
80	1061	0.0625	S	<i>C.tropicalis</i>
81	1071	0.0156	S	<i>C.tropicalis</i>
82	1050	1	R	<i>C.tropicalis</i>

Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur. EUCAST 10.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* kompleks türlerinde itraconazol için ≤ 0.125 ise S: Duyarlı; >0.25 ise R: Dirençli olarak kabul edilmektedir. IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yetersiz kanıt.

4.4.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi için nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde istatistiksel parametreleri median (%25 quartile-%75 quartile) ile ifade edilmiştir. Nitel değişkenlerde istatistik parametrelerin (%) ile ifade edilmiştir. Nitel değişkenler arasındaki frekans dağılımı ilişkisi Chi-Square test ve exact test ile değerlendirilmiştir. İki yöntemin değerlendirme bulguları arasındaki uyum iyiliği Kappa katsayısı ile incelenmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS versiyon 22 ve R 3.3.2 istatistik analiz programlarından yararlanılmıştır. BD Phoenix 100 ile tanımlanan NAC türlerinin antifungal duyarlılık test sonuçlarına göre; amfoterisin B'ye direnç oranları incelendiğinde; *C. parapsilosis* kompleks'in %16, *C. glabrata* kompleks'in %5,88 ve *C. tropicalis*'in %4 dirençli olduğu belirlenmiştir. Türlerin flukonazole karşı dirençleri incelendiğinde; *C. tropicalis*'in %36, *C. glabrata* kompleks'in %35,29 ve *C. parapsilosis* kompleks'in %28 dirençli olduğu belirlenmiştir. Türlerin itrakonazole karşı dirençleri incelendiğinde; *C. tropicalis*'in %44 ve *C. parapsilosis* kompleks'in %36 dirençli olduğu belirlenmiştir. Türlerin vorikonazole karşı dirençleri incelendiğinde; *C. tropicalis*'in %24 ve *C. parapsilosis* kompleks'in %12 dirençli olduğu belirlenmiştir. (Tablo 23). İzole edilen NAC türlerinin, amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri tablo 24-27'de belirtilmiştir.

Tablo 23. NAC izolatlarının antifungal ajanlara direnç oranları

BD Phoenix 100	Amfoterisin B_Direnc				Flukonazol_Direnc				İtrakonazol_Direnc						Vorikonazol_Direnc					
	R		S		R		S		IE		R		S		IE		R		S	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C.firmetaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.glabrata kompleks	1	5,88	16	94,12	6	35,29	11	64,71	17	100	0	0	0	0	17	100	0	0	0	0
C.kefyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.krusei	0	0	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0	0	0
C.lambica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.norvegensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.parapsilosis kompleks	4	16	21	84	7	28	18	72	0	0	9	36	16	64	0	0	3	12	22	88
C.tropicalis	1	4	24	96	9	36	16	64	0	0	11	44	14	56	0	0	6	24	19	76

R: Dirençli; S: Duyarlı; IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yetersiz kanıt

Tablo 24. *C. glabrata* kompleks izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

<i>C. glabrata</i> kompleks	Sınır Değerleri		MİK Aralığı (MİK ₅₀)	MIC ₅₀	MİK Aralığı (MİK ₉₀)	MIC ₉₀	GM
	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Antifungal	S≤	R>					
Amfoterisin B	1	1	0,0156-1,0000	0,125	0,0156-1,0000	0,5	0,5651
Flukonazol	0.001	16	0,2500-128,0000	16	0,50-128,00	32	8
İtrakonazol	IE	IE	0,0156-8,0000	0,0625	0,0156-8,0000	0,125	0,1803
Vorikonazol	IE	IE	0,0156-4,0000	0,0625	0,0156-8,0000	0,75	0,1731

S: Duyarlı; R: Dirençli; MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₅₀: Mikroorganizma üremesini %50 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₉₀: Mikroorganizma üremesini %90 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt yok; GM: Geometric mean

Tablo 25. *C. krusei* izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

<i>C. krusei</i>	Sınır Değerleri		MİK Aralığı (MİK ₅₀)	MIC ₅₀	MİK Aralığı (MİK ₉₀)	MIC ₉₀	GM
	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Antifungal	S≤	R>					
Amfoterisin B	1	1	0,0312-0,5000	0,25	0,0312-0,5000	0,5	0,2971
Flukonazol	—	—	16,0000-128,0000	64	—	—	9,5136
İtrakonazol	IE	IE	0,0625-1,0000	0,25	0,0625-2,0000	1	0,2102
Vorikonazol	IE	IE	0,0312-1,0000	0,0625	4,0000-4,0000	4	0,0312

S: Duyarlı; R: Dirençli; MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₅₀: Mikroorganizma üremesini %50 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₉₀: Mikroorganizma üremesini %90 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt yok; GM: Geometric mean

Tablo 26. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

<i>C. parapsilosis</i> kompleks	Sınır Değerleri		MİK Aralığı (MİK ₅₀)	MIC ₅₀	MİK Aralığı (MİK ₉₀)	MIC ₉₀	GM
	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Antifungal	S≤	R>					
Amfoterisin B	1	1	0,0312-1,0000	0,25	0,0625-8,0000	1	0,6597
Flukonazol	2	4	0,5000-32,0000	4	0,5000-128,0000	16	2,639
İtrakonazol	0.125	0.125	0,0156-4,0000	0,125	0,0156-8,0000	0,5	0,0973
Vorikonazol	0.125	0.25	0,0156-1,0000	0,0625	0,0156-8,0000	0,5	0,0642

S: Duyarlı; R: Dirençli; MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₅₀: Mikroorganizma üremesini %50 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₉₀: Mikroorganizma üremesini %90 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt yok; GM: Geometric mean

Tablo 27. *C. tropicalis* izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

<i>C. tropicalis</i>	Sınır Değerleri		MİK Aralığı (MİK ₅₀)	MIC ₅₀	MİK Aralığı (MİK ₉₀)	MIC ₉₀	GM
	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
Antifungal	S≤	R>					
Amfoterisin B	1	1	0,0156-1,0000	0,375	0,0625-2,0000	0,5	0,4892
Flukonazol	2	4	0,0312-32,0000	4	1,0000-128,0000	16	2,5666
İtrakonazol	0.125	0.125	0,0156-1,0000	0,125	0,0156-8,0000	0,5	0,1436
Vorikonazol	0.125	0.25	0,0156-1,0000	0,0625	0,0156-8,0000	0,5	0,1058

S: Duyarlı; R: Dirençli; MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₅₀: Mikroorganizma üremesini %50 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; MİK₉₀: Mikroorganizma üremesini %90 oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon; IE: Organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt yok; GM: Geometric mean

5.TARTIŞMA

Geçtiğimiz on yılda, *Candida* cinsinin neden olduğu enfeksiyonların insidansı, immünosupresif durumlar nedeniyle önemli ölçüde artmıştır ve bir zamanlar patojenik olmayan türler artık fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir (156, 157). *Candida* cinsinin 200'den fazla türü bilinmekle beraber son zamanlarda en sık izole edilen NAC türleri; *C. krusei*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. kyfy*, *C. lusitaniae*, *C. dublinensis* ve *C. glabrata* kompleks olmuştur (64, 156, 157). NAC türlerine bağlı gelişen komplikasyonlu veya komplikasyonsuz mantar enfeksiyonu (endokardit, endoftalmi veya osteomiyelit) iki nedenden dolayı bir endişe kaynağı olmuştur: Birincisi bazı NAC türlerine bağlı virülans ve patojenite faktörleri nedeniyle özellikle bağışıklığı baskılanmış konakçıda morbidite ve mortalite nedeni olması ve ikincisi, mevcut kullanılan antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimidir (157, 158). Bu faktörler, NAC fungemisinde hastanede kalış süresini uzatmakta ve dolayısıyla ekonomik bir yük de getirmektedir. Ayrıca, NAC suşlarının antifungallere direnci, gelecekteki terapötik ve profilaktik stratejiler için büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Bazı NAC türleri (*C. krusei* ve *C. lusitaniae*) iki veya üç antifungal ajana dirençlidir ve bu durum tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlayabilmektedir (55, 157, 159). *Candida* türleri arasında antifungal ajanlara duyarlılıktaki farklılıklar göz önüne alındığında, tür düzeyinde tanımlama, hızlı ve uygun tedaviyi sağlamak için önemlidir (157, 158).

Bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen NAC türlerinin DNA dizi analizi ile belirlenmesi, sonuçların BD Phoenix 100 otomatik tanımlama sistemi ile karşılaştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

BD Phonex 100 otomatize tanımlama sistemi ile izolatların NAC türü olduğu belirlendikten sonra, fungal rDNA'sının 5.8S bölümünde bulunan ITS geni PCR yöntemi ile amplifiye edilerek dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatlar çeşitli vücut örneklerinden (kan, idrar, yara ve katater) elde edilmiştir. Çalışmamızda NAC türleri tüm örnekler içinde en sık idrar ve kan örneklerinden izole edilmiştir.

Rasoul ve ark.'da benzer şekilde NAC izolatlarını sıklıkla kan ve idrar örneklerinden elde ettiklerini bildirmişler (157). Yine, Al-Ruwaili ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada NAC izolatlarının idrar örneklerinden en sık izole edilen mantar türleri olduğunu

bildirmişlerdir (160). Türkiye’de Yücesoy ve ark.’nın VITEK veya API 20C AUX sistemini kullandığı çalışmada, mayaların izole edildiği en yaygın üç örnek türünün idrar %62,1, kan %13,6 ve trakeal aspirat %8,7 olduğu bildirilmiştir (161). İzolatların tür dağılımı %53,3 *C. albicans*, %14,5 *C. tropicalis*, %12,2 *C. glabrata* kompleks, %6,5 *C. parapsilosis* kompleks, %3,9 *C. kefyr*, %1,6 *C. krusei* ve %3,5 diğer türler şeklinde belirtilmiştir (161). Bir başka çalışmada, idrar kültürlerinden izole edilen mayalar arasında *C. tropicalis*’in ikinci en yaygın ve *C. glabrata* kompleks ile *C. krusei*’nin üçüncü en yaygın tür olduğu bildirilmiştir (162). Kaya ve ark. 10 aylık bir süre boyunca kandidüri etkenlerini araştırdıkları çalışmalarında %11,1 ile *C. glabrata* kompleks, %8,9 ile *C. kefyr* ve %6,7 ile *C. tropicalis* izole etmişlerdir (163). Baysan ve ark. nozokomiyal enfeksiyonu olan kandidürili hastalardan %44 *C. albicans*, %20 *C. tropicalis*, %18 *C. glabrata* kompleks, %6 *C. krusei*, %5 *C. famata*, %2 *C. parapsilosis* kompleks ile *C. kefyr* ve %1 *C. guilliermondii* izole ettiklerini bildirmişlerdir (164). Kültürlerden izole edilen *Candida* türlerinin çoğunluğunu *C. albicans* oluşturmasına rağmen, NAC türlerinin izolasyonunda artış gözlenmiştir (165).

Candida türlerine bağlı tüm kan dolaşım enfeksiyonlarının yaklaşık %95’inden *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. glabrata* kompleks türleri sorumlu tutulmuştur. Kalan %5’ten ise *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* ve diğer türlerin sorumlu olduğu görülmüştür (164). Çalışmamızda örnek alınan hastaların yaş ortalaması 57,61±26,36 olup, *Candida* izolatlarının kadın hastalardan %51,20 erkeklere göre %48,80 daha fazla izole edildiği görülmüştür. Benzer şekilde, Al-ruwaili ve ark. yaptıkları çalışmada örnekleme kadın baskınlığını bildirmişlerdir (160).

Çalışmamızda fenotipik tanımlama yöntemi ile 82 izolattan 25 (%30,49)’inin *C. tropicalis* ve 25 (%30,49)’inin *C. parapsilosis* kompleks olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan diğer türler ise sırasıyla *C. glabrata* kompleks 17 (%20,73), *C. krusei* 4 (%4,88), *C. kefyr* 4 (%4,88) *C. firmetaria* 4 (%4,88), *C. lambica* 1 (%1,21) ve *C. norvegensis* 2 (%2,44)’dir. Benzer olarak birçok çalışmada NAC izolatları arasında en sık kandidemi nedeni olarak *C. parapsilosis* kompleks, ikinci sırada ise *C. tropicalis* bildirilmiştir (166, 167, 168, 169, 170, 171, 172). Çıkman ve ark.’nın yaptıkları çalışmalarda NAC izolatları içinde en sık kandidemi etkeni olarak *C. parapsilosis* kompleks, ikinci sırada ise *C. tropicalis* bildirilmiştir (173). Kuzucu ve ark. hastalardan izole edilen 12 NAC izolatını sıklık sırasına göre *C. parapsilosis* kompleks, *C. pelliculosa* ve *C. famata* olarak saptamışlardır (174). Birçok çalışmaya göre

kan kültürlerinden izole edilen en yaygın NAC türleri *C. parapsilosis* kompleks, *C. glabrata* kompleks ve *C. tropicalis* 'tir (20, 139, 172, 175, 176, 177, 178).

Atalay ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NAC türlerini sıklık sırasına göre *C. parapsilosis* kompleks, *C. glabrata* kompleks ve *C. krusei* olarak belirtmişlerdir (179). Bazı araştırmacılar ise NAC türleri arasında en sık *C. glabrata* kompleks türünü izole etmişlerdir (124, 125, 180, 181, 183, 184). Feyzioğlu ve ark. çalışmalarında izole edilen NAC türleri arasında *C. dubliniensis* ve *C. krusei*'nin ilk sırada yer aldığını, bunu *C. guilliermondii* ve *C. lusitaniae*'nin izlediğini bildirmişlerdir (185). Mohandes ve ark.'nın çalışmasında ise sıralama *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii* şeklinde olmuştur (186). Koçoğlu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada en sık *C. albicans* %56,8, ikinci sıklıkla *C. tropicalis* %7,7, üçüncü sıklıkla da *C. sake* %6,8 izole etmişlerdir (187). İris ve ark. ise %43 oranında *C. albicans*, %22 *C. tropicalis*, %22 *C. parapsilosis* kompleks ve %2,7 oranında diğer türler olan *C. sake*, *C. famata*, *C. krusei* ve *C. glabrata* kompleks 'i tanımladıklarını bildirmişlerdir (188). Ünlü ve arkadaşlarının çalışmasında ise klinik izolatlardan en sık *C. albicans* %36,6, ardından sırasıyla *C. glabrata* kompleks ve *C. parapsilosis* kompleks saptadıklarını bildirmişlerdir (190). Bazı araştırmacılar ise klinik örneklerden en sık *C. tropicalis*'i izole etmişlerdir (167, 191, 192, 193). Otağ ve ark. 2003-2005 yılları arasında API 20C AUX sistemi kullanarak tanımladıkları 872 örneğin %45,62'sini *C. albicans*, %18,6'sını *C. tropicalis*, %10,6'sını *C. glabrata* kompleks, %14,9'unu *C. parapsilosis* kompleks, %3,8'ini *C. kefyr*, %2,4'ünü *C. krusei*, %0,2'sini *C. lusitaniae* olarak tanımlamıştır (189).

Cömert ve ark. yaptıkları üç yıllık çalışmada klinik örneklerden izole ettikleri 320 suşu klasik yöntemle ve API 20C AUX sistemi ile tanımlamış ve izolatların dağılımını *C. albicans* %65,6, *C. parapsilosis* kompleks %11,3, *C. glabrata* kompleks %8,8, *C. tropicalis* %7,8 ve diğer *Candida* türleri %4,4 şeklinde bildirmişlerdir (194). Yine Tulumoğlu ve ark.'nın çalışmasında maya izolatlarının tür tanımlaması için API 20C AUX (Biomérieux, France) kiti kullanılmış ve ikinci sıklıkta *C. parapsilosis* kompleks %33,66, daha sonra sırasıyla *C. famata* %6,93, *C. tropicalis* %2,97 ve *C. pelliculosa* %1,98 türleri tanımlanmıştır (195). Öte yandan Özer ve ark. *Candida* izolatlarını Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) yöntemi ile tanımlamış ve antifungal duyarlılık testleri uyguladıkları çalışmalarında; *C. glabrata* kompleks'i ikinci, *C. tropicalis*'in üçüncü sık saptanan izolat olduğunu bildirmiştir. Ayrıca sırasıyla *C. parapsilosis* kompleks, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* ve *C. lyopolitica* türleri tanımlanmıştır (196).

C. parapsilosis kompleks, bazı coğrafi bölgelerde ve hastanelerde klinik örneklerden izole edilen en yaygın ikinci NAC suşu olarak tanımlanmıştır (197, 198, 199). Bu tür Güney Amerika ülkelerinde *Candida* onikomikozunun birinci veya ikinci en sık etkenidir (200). Feng ve ark. yaptıkları çalışmada hastaların kutanöz örneklerinden (deri ve tırnak) *C. parapsilosis* kompleksin çok sık izole edildiğini bildirmişlerdir (201).

Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde Baran ve ark. ayrıca 2013 yılında yaptıkları çalışmada %55,4 ile kan kültürlerinde en sık saptanan NAC'nın *C. parapsilosis* kompleks olduğunu bildirmişlerdir (202). Ekşi ve ark. 200 *Candida* izolatının %53'ü *C. albicans*, %24,5'i *C. parapsilosis* kompleks, %7,5'i *C. tropicalis*, %4,5'i *C. krusei*, %4'ü *C. kefir*, %2'si *C. glabrata* kompleks, %1,5'ini *C. famata*, %1'ini *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir (203).

İntravenöz kateterli hastalarda, biyofilm oluşturma özelliği nedeniyle *C. parapsilosis* kompleks'e bağlı fungemi gelişiminde artış olduğu bildirilmiştir (188, 204, 205). Pfaller ve ark.'nın 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Güney Amerika'yı kapsayan bir çalışmada kandidemiye neden olan 306 etkenin %46,7'sinin NAC türü olduğu ve en sık görülenin *C. parapsilosis* kompleks olduğu bildirilmiştir (125). Literatürle uyumlu olarak, çalışma sonuçlarımıza göre en fazla izole edilen NAC türlerinin *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. glabrata* kompleks olduğu görülmüştür. *C. tropicalis*, özellikle kandidüri ve kandidemi olmak üzere invaziv *Candida* enfeksiyonlarına neden olmaktadır (157, 206). Bazı araştırmacılar *C. glabrata* kompleks'in neden olduğu mukozal enfeksiyonların prevalansında artış bildirmiştir.

Çalışmamızda *C. glabrata* kompleks %20,73 oranında izole edilmiştir. Özellikle *C. glabrata* kompleks bağışıklığı baskılanmış bireylerde kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olmaktadır. İtalya'da yapılan bir çalışmada NAC türü olan *C. glabrata* kompleks'in klinik izolatlardaki prevalansı yüksek bulunmuştur (207). Bu türe bağlı enfeksiyonda morbidite ve mortalitenin yüksek olduğu belirtilmektedir (34, 207, 208, 209, 210). Çalışmamızda fenotipik yöntem ile *C. kefir* oldukça düşük %4,88 oranda tanımlanmıştır. Kiraz ve ark.'da benzer şekilde *C. kefir*'i düşük oranda saptamışlardır (158).

Bir maya enfeksiyonunun tanısı, hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerinin kullanılmasına bağlıdır. Fenotipik analiz ve serolojik testleri içeren klasik yöntemler zaman alıcıdır ve uygun tedavinin hızlı seçiminde gecikmelere neden olmaktadır. Hızlı ve güvenilir olması nedeniyle

moleküler tanımlama tekniklerinin uygulanmasına ilgi giderek artmaktadır. Ancak pahalı ve eğitilmiş personel gerektiren yöntemlerdir (211). Son on yılda patojen mantar türlerinin PCR yöntemi ile tanımlanmasında ilerleme kaydedilmiştir. Çoğunlukla, 5.8S, 18S bölgelerini veya 28S rRNA genlerini veya dahili transkript gen bölgelerini hedefleyen mantara özgü PCR testleri kullanılmaktadır (212). Çalışmamızda, mantar rDNA'sının 5.8S bölümünde ITS genini amplifiye etmek için ITS1 ve ITS4 bölgeleri çoğaltılmıştır. PCR yöntemleri, yüksek özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle umut verici yöntemler olmuştur. Örneğin; *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* ve *Candida spp.*'nin farklı gen bölgelerini hedefleyen PCR yöntemleri tarif edilmiştir. Bunun yanında karmaşık klinik örneklerden mantar DNA'sının verimli bir şekilde ekstraksiyonunun zorluğu ve *Aspergillus* gibi mantar kontaminasyonunun sık meydana gelmesi gibi rahatsız edici sorunlarla karşılaşmaktadır. En yaygın kullanılan yaklaşım *Candida* türlerinin rDNA'sının gen bölgelerinin hedeflenmesidir. Bununla birlikte, bir seferde yalnızca bir tür tanımlaması ve prob hibridizasyonu gerektirdiğinden zaman alıcıdır (134). Ayrıca yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için DNA ekstraksiyonunun suboptimal olması gerektiği bildirilmektedir (213). Güvenilir yöntem olarak bilinen ancak yüksek maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlarda uygulanması zor olan DNA dizi analizi ile aynı gün içerisinde sonuç verilmektedir. Ancak her laboratuvar test seçiminde, testin güvenilirliği kadar maliyetinin de uygun olup olmadığına karar vermek durumundadır (214).

Çalışmamızda *Candida* türlerinin tanımlanmasında altın standart yöntem kabul edilen DNA dizi analizi referans yöntem olarak değerlendirildiğinde; fenotipik tanımlama yöntemi olan BD Phoenix 100 otomatize tanımlama sisteminin 82 örnekten 62 (%75,61)'sini doğru sınıflandırdığı gözlemlenmiştir. Fenotipik tanımlama yönteminin toplam doğruluk oranı 0,756 olarak belirlenmiştir. BD Phoenix 100 otomatize sistemi *C. glabrata* kompleks izolatlarının %57,9'unu, *C. kefyr* izolatlarının %60'ını, *C. krusei* izolatlarının %33,3'ünü, *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının %88'ini ve *C. tropicalis* izolatlarının %80'ini doğru tanımladığı görülmüştür. Çalışmamızda aynı örnekler moleküler tanımlama yöntemi (DNA dizi analizi) ve BD Phoenix 100 otomatik tanımlama sistemi ile çalışılmış olmasına rağmen, 62 izolatın tanımlanmasında uyum ve 20 izolatın tanımlanmasında farklılık saptanmıştır. Otomatize tanımlama yöntemiyle *C. firmetaria* olarak tanımlanan 4 izolatın moleküler tanımlama sistemi ile 3 izolatı *C. glabrata* kompleks, 1 izolatı ise *C. tropicalis* olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde otomatize tanımlama yöntemi ile 6 örnek *C. glabrata* kompleks olarak tanımlanırken,

DNA dizi analizi ile aynı örneklerden 2 izolat *C. tropicalis*, 1 izolat *C. parapsilosis* kompleks, 1 izolat *C. metapsilosis* (*C. parapsilosis* kompleks), 1 izolat *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*) ve diğer 1 izolat ise *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei* telemorf) olarak saptanmıştır. Yine otomatize tanımlama sistemi ile *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanan 3 örneğin hepsi moleküler tanımlama yöntemi ile *C. glabrata* kompleks olarak değerlendirilmiştir. Otomatize tanımlama sistemi ile *C. krusei* olarak tanımlanan 2 izolatın hepsi moleküler tanımlama yöntemi ile *C. tropicalis* olarak değerlendirilmiştir. Otomatize tanımlama sistemi ile *C. norvegensis* olarak tanımlanan 2 izolatın hepsi moleküler tanımlama yöntemi ile *C. glabrata* kompleks olarak değerlendirilmiştir. Bunun dışında fenotipik yöntemle tanımlanan *C. tropicalis* moleküler yöntem ile; *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*), fenotipik yöntemle tanımlanan *C. kefir* moleküler yöntem ile; *C. tropicalis* olarak, fenotipik yöntemle tanımlanan *C. lambica*, moleküler yöntem ile; *C. parapsilosis* kompleks olarak analiz edilmiştir.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi Al-ruwaili ve ark. API 20C AUX sistemini DNA dizi analizi ile karşılaştırmışlar ve dizileme gibi moleküler tanımlama yöntemlerini kullanmanın daha doğru olacağı sonucuna varmışlardır (160). Çalışmamızı destekleyen benzer sonuçları farklı araştırmacılar da bildirmiştir (215, 216). Daha az yaygın olan mayaların neden olduğu enfeksiyonların giderek daha fazla gözlemlendiği ve tıbbi açıdan önemli maya türlerinin geleneksel yaklaşımlarla (kan kültürü vb.) belirlenmesinin zor olabileceği bildirilmiştir (217). Fujita ve ark. ITS1 ve ITS2 bölgelerini çoğaltarak PCR yöntemi ile 30 maya izolatını tanımlamışlardır. Ancak bu yöntemin *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerini ayırt edemediği ve karışık flora içeren örneklerden mantarların doğrudan tanımlanmasında sorunlar olduğu bildirilmiştir (218). Bu sorunu aşmak için Trost ve ark. klinik olarak yakından ilişkili mayaları ayırt etmek için PCR/RFLP yöntemini başarıyla kullanmıştır. ITS1 ve ITS2 bölgelerinin amplifikasyonundan sonra, 16 maya türünün tümü, *MwoI* ve *BsII* restriksiyon enzimleri kullanılarak fragman analizi yapılmıştır (219).

ITS-1, ITS-3 ve ITS-4 primerleri kullanılarak yapılan bir PCR çalışmasında üç *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. tropicalis*) birbirlerinden tam olarak ayırt edilemediği görülmüş ve PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimleri ile bir tür *C. lusitaniae* veya *C. intermedia* olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması için CHROMagar *Candida* besiyeri ve API ID 32C kiti birlikte değerlendirildiğinde, moleküler yöntemlerle elde edilen sonuçla (%100 uyumlu) benzer tanımlama yapılabileceği görülmüştür (220). Moleküler

yöntemler, yaygın olmayan klinik izolatları ve *Candida* kompleksleri gibi birbiriyle yakından ilişkili farklı maya alt türlerinin hızlı ve kolay tanımlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, mayaların moleküler yöntemle tanımlanmasının epidemiyolojik veri açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir (221).

AIDS, kanser, yaşlılık, diyabet, kistik fibroz ve organ nakli gibi artan sayıda immün yetmezlik vakaları ve diğer invaziv cerrahi prosedürler, maya enfeksiyonlarının son yıllarda görülme sıklığının artmasında rol oynamaktadır (222). Kapsamlı araştırmalara ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine rağmen, invazif mantar enfeksiyonlarıyla savaşmak için yalnızca sınırlı sayıda antifungal ilaç bulunmaktadır. Sistemik mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için üç farklı mantar metabolik yolunu hedefleyen sadece dört moleküler sınıf kullanılır; floropirimidin analogları, polienler, azoller ve ekinokandinler. Ayrıca morfolinler ve allilaminler sadece topikal ajanlardır ve sistemik kullanımda yetersiz etkinlik veya ciddi yan etkiler nedeniyle sistemik olarak uygulanmazlar (222). Hastanemizde polienler ve azoller hastaların tedavisinde en sık kullanılan antifungal ajanlardır. Uzun süreli ve türe özgü olmayan antifungallerin kullanılması direnç problemlerini de beraberinde getirmiştir (165). Antifungallerin artan kullanımı mantar suşları üzerinde seçici bir baskı oluşturmuş ve direnç iki ana yolla ortaya çıkmıştır; bazı suşlar ikincil direnç geliştirmiş ve duyarlı izolatların yerini dirençli suşlar almıştır. Bu durum, mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisini de değiştirmiştir. Ayrıca içsel olarak *C. glabrata* kompleks ve *C. krusei*'nin flukonazole dirençli olduğu bilinmektedir. Bu durumda uygun tedaviye tür tanımına göre karar verilmesi gerektiği görülmektedir (223). Mikrodilüsyon yöntemleri, antifungal duyarlılık testlerinde altın standart veya referans tekniklerdir. Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), antifungal duyarlılık testi için iki standart rehberdir (223). Çalışmamızda *C. firmetaria*, *C. glabrata* kompleks, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. tropicalis*'in amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol ve MİK değerlerinin belirlenmesinde referans olarak EUCAST yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda amfoterisin B test edildiğinde; *C. parapsilosis* kompleks'in direnç oranı %16 olduğu belirlenmiştir.

Hasan ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada izole edilen 100 *Candida* izolatından amfoterisin B'ye dirençli (≥ 2 µg/mL) suş bulunmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca amfoterisin B

için MİK aralığını 0.25-1 µg/mL arasında ve MİK₅₀ ile MİK₉₀'ı 1 µg/mL olarak bildirmiştir (224). Toka ve ark. hiçbir izolatta amfoterisin B'ye direnç gözlemlenmediğini bildirmiştir (225). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca benzer sonuçları Atalay ve ark.'da elde etmişlerdir (179).

Elfeky ve ark. yaptıkları çalışmada en etkili antifungalın amfoterisin B %98,4 olduğunu ve *C. albicans*, *C. glabrata* kompleks, *C. krusei*, *C. guilliermondii* türlerinde amfoterisin B'ye direnç gözlenmediğini bildirmişlerdir (226). Ayrıca Zhang ve ark. (227), Ramos ve ark. (228), Katsuragi ve ark. (242), Matsumoto ve ark. (180), Pfaller ve ark. (208) Yang ve ark. (167), Bassetti ve ark. (20), Mokaddas ve ark. (166), Gualco ve ark. (169), Matta ve ark. (193), Marco ve ark. (168), Godoy ve ark. (191), ST-Germain ve ark. (229), Öztürk ve ark. (230), Bayram ve ark. (231), Atalay ve ark. (232), Çıkman ve ark. (173), Yüksekaya ve ark. (162), Temiz ve ark. (233), Çalışkan ve ark. (171), Biçmen ve ark. (170) ile Gültekin ve ark. (172) yaptıkları çalışmalarda *C. tropicalis* suşlarında amfoterisin B direnci tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 25 *C. tropicalis* izolatından 1'inin amfoterisin B'ye direnç gösterdiği ve MİK aralığı 0,0312 - 1 mg/L, direnç oranı ise %4 olarak tespit edilmiştir.

Ancak *C. tropicalis* suşlarında amfoterisin B'ye karşı direncin gözlemlendiği çalışmalar da mevcuttur. *C. tropicalis* suşlarında amfoterisin B direncini Zer ve ark. (234), Santhanam ve ark. (235), Schmalreck ve ark. (236), Ostrosky-Zeichner ve ark. (184) sırasıyla %15,3, %26,08, %6,7, %16,4, %0,3 olarak bildirmişlerdir. Bununla birlikte *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. lusitaniae* ve *C. haemulonii* türlerinin amfoterisin B'ye sekonder direnç geliştirdiği bilinmektedir (223). Çalışmamızda 25 *C. parapsilosis* kompleks izolatından, 4'ünün amfoterisin B'ye direnç gösterdiği ve MİK aralığı 0,0156 - 1 mg/L ve direnç oranı %16 olarak belirlenmiştir, 17 *C. glabrata* kompleks izolatından 1 izolatın amfoterisin B'ye direnç göstermiştir ve MİK₉₀ değeri 4 µg/mL ve direnç oranı %5,88 olarak saptanmıştır.

Günümüzde flukonazol tedavisinde en önemli sorun NAC türlerinde direnç gelişmesidir (*C. krusei*'de doğal direnç, *C. glabrata* kompleks'te kazanılmış direnç) (237). ABD'de kandideminin ikinci en yaygın nedeni *C. glabrata* kompleks olup, bu türün önemli özelliği antifungal ajanlara direnç göstermesidir. Araştırmacılar, klinik izolatlarda *C. glabrata* kompleks'in sık görülmesinde flukonazolün yoğun kullanımının bir faktör olduğunu öne

sürmektedirler (238). Bu tür sıklıkla yaşlı hastalarda izole edilir ve kanser hastalarında endojen yolla sindirim sisteminde kandidemiye neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda da *C. glabrata* kompleks en sık %20,73 izole edilen türlerden biridir. Yapılan bir çalışmaya göre üç yıl içerisinde flukonazol direncinin %7'den %12'ye çıktığı görülmüştür (239). Latin Amerika ve Asya-Pasifik bölgelerinde yaygın olduğu bildirilen *C. tropicalis*, ülkemizden yakın zamanda yapılan bir çalışmada ikinci en sık etken olarak bildirilmiştir (70). Yazarlar bunun kısmen flukonazol profilaksisinin düşük kullanımı ve coğrafi özelliklerle ilişkilendirmiştir (70). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. tropicalis* gibi türlerde flukonazol MİK değerlerinin arttığı tespit edilmiştir (240).

Çalışmamızda flukonazol ile test edilen *C. glabrata* kompleks türüne ait 17 örneğin 6 tanesi dirençli bulunmuş ve MİK aralığı 0.25- 128 mg/L olarak direnç oranı %35,29 olarak değerlendirilmiştir. *C.tropicalis*'in ise 25 izolatından 9 (%36)'unun flukonazole dirençli olduğu belirlenmiş olup, MİK aralıkları 0.0312-32 mg/L olarak bulunmuştur. *C.tropicalis* türleri için flukonazol direncini Pfaller ve ark. %1,9 (182), Tortorano ve ark. %4,5 (175), Santhanam ve ark. %6,7 (235), Zhang ve ark. %10,7 (227), Yang ve ark. %27,8 (167), Katsuragi ve ark. %36,4 (242) olarak bildirmişlerdir. Yurdumuzda ise Temiz ve ark. (233) ve Zer ve ark. (234) yaptıkları çalışmalarda bu oranı sırasıyla %5 ve %30,4 olarak bildirmişlerdir. Çıkman ve ark. (173) ile Bayram ve ark. (231) yaptıkları çalışmalarda *C. tropicalis* suşlarının hepsini flukonazole dirençli bulmuşlardır. Yine çalışmamızda *C. parapsilosis* kompleks'e ait 25 örnekten 7 (% 28) örneğin flukonazole direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

C. krusei ve *C. glabrata* kompleks türlerinin doğal olarak (birincil olarak) veya flukonazole sekonder olarak dirençli oldukları bilinmektedir (73). Hassan tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada *Candida* türlerinin %40'ının flukonazole doza bağlı direnç gösterdiği belirlenmiş ve MİK₅₀ ve MİK₉₀ sırasıyla 4 µg/mL 64 µg/mL saptanmıştır (224).

Çalışmamızda izole edilen NAC türlerinden olan *C. parapsilosis* kompleks'e ait 25 örnekten 9 örneğin itrakonazole direnç gösterdiği tespit edilmiştir ve MİK aralığı 0.0156-4 mg/L ve direnç oranı %36 olarak belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda 25 *C. tropicalis* örneğinin 11 (%44)'i itrakonazole dirençli bulunmuş ve MİK aralığı 0,0156 - 1 mg/L olarak tespit edilmiştir. Santhanam ve ark. (235), Bayram ve ark. (231), Yang ve ark. (33), Öztürk ve ark. (230) *C. tropicalis* suşlarında itrakonazol direncini sırasıyla %13,3, %28,5, %38,9, %50

olarak bildirmişlerdir. Çıkman ve ark. (173) çalışmalarında *C. tropicalis* suşlarının tamamını itrakonazole dirençli bulmuşlardır. Bassetti ve ark. (20) ve Katsuragi ve ark. (242) direnç oranlarını sırasıyla %20 ve %72,7 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki bulguların aksine Gualco ve ark. (169), Matta ve ark. (193), Richter ve ark. (241), Matsumoto ve ark. (180) itrakonazole dirençli suş tespit etmediklerini bildirmişlerdir.

Vorikonazol, flukonazolden türetilmiş bir triazoldür. Yapısında oluşturulan değişiklik sayesinde geniş spektrumlu hale getirilmiştir (243). Flukonazole dirençli *Candida* enfeksiyonlarında vorikonazol tercih edilmektedir. Flukonazole dirençli *Candida* izolatlarının çoğu ketokonazole direnç geliştirebilirken, vorikonazole direnç nadirdir (244).

Literatür verileri incelendiğinde, Hassa'nın 2018 yılında yaptığı çalışmada izole ettikleri *Candida* türlerinin 14 (%24,6)'ünün vorikonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir ve MİK aralığı 0,03-16 µg/mL olarak saptadıklarını bildirmiştir (224). Alpat ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *Candida* türlerinin hepsinin vorikonazole duyarlı olduğunu belirlemişlerdir (245).

Çalışmamızda *C. parapsilosis* kompleks'e ait 25 örnekten 3 (%12) örneğin vorikonazole dirençli olduğu görülmüştür. Schmalreck ve ark. (236), Ramos ve ark. (228), Bayram ve ark. (231), Çıkman ve ark. (173), Zhang ve ark. (227), Santhanam ve ark. (235), Bassetti ve ark. (20) ve Pfaller ve ark. (34) *C. tropicalis* izolatlarını vorikonazole dirençli bildirmişlerdir. Johnson ve ark. yaptıkları çalışmada *Candida* izolatlarının %9,3'ünde vorikonazole direnç rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda *C. tropicalis*'e ait 25 örnekten 6 (%24) tanesinin vorikonazole direnç gösterdiği tespit edilmiştir (246). Yang ve ark. (33), Temiz ve ark. (233), Mokaddas ve ark. (166), Katsuragi ve ark. (242), Matsumoto ve ark. (180), Çalışkan ve ark. (171), Matta ve ark. (193), Öztürk ve ark. (230), Pfaller ve ark. (34) da yaptıkları çalışmalarda *C. tropicalis* suşlarının tamamını vorikonazole duyarlı bulduklarını bildirmişlerdir. Diğer literatür verileriyle karşılaştırıldığında; bizim çalışmamızda vorikonazol direnç oranı daha yüksek bulunmuştur.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda izole ettiğimiz NAC izolatlarının %75,61'i yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmiştir.

BD Phoenix sistemi moleküler yöntemle karşılaştırıldığında; 82 örnekten 62 (%75,60) tanesinin doğru tanımlandığı değerlendirilmiştir. İki yöntem arasında önemli bir uyum olmasına rağmen, fenotipik tanımlama yönteminin genel doğruluğu 0,756 olarak bulunmuştur.

Antifungal ilaçların kullanımının artmasıyla *Candida* türlerinin epidemiyolojisi değişmekte ve daha önce patojen olmayan NAC türleri enfeksiyöz ajanlar olarak ortaya çıkmıştır.

C. tropicalis, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. glabrata* kompleks izolatlarının amfoterisin B'ye, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazole göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

C. parapsilosis kompleks ve *C. tropicalis* izolatlarının vorikonazole, itrakonazol ve flukonazole göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. glabrata* kompleks izolatlarının flukonazole, itrakonazole göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Günümüzde antifungal duyarlılık testi gibi mikrobrot seyretilme yöntemleri deneyim gerektiren yöntemler olmakla birlikte, kolorimetrik indikatörlerin kullanımına dayalı çeşitli otomatik veya yarı otomatik ticari yöntemler gibi uygulaması kolay yöntemler de bulunmaktadır.

Sonuç olarak, hastane enfeksiyonlarına neden olan *Candida* türlerinin doğru şekilde tanımlanması, etkenlerin hastalar arasında yayılmasının önlenmesi ve antifungal direnç sürveyansının yapılması için geleneksel yöntemlerin yanında moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. McCarty T. P ve Pappas P.G, 2016. Invasive candidiasis. *J. Infect. Dis. Clin. North Am.* 30; 103–124.
2. Kullberg B. J, and Arendrup M. C, 2015. Invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 373, 1445–1456.
3. Pfaller M.A, Messer S.A, Moet G.J, Jones R.N, Castanheira M, 2011. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009) *International journal of antimicrobial agents.* 38 (1):65–69.
4. Castanheira M, Messer S.A, Rhomberg P. R, and Pfaller M. A, 2016. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY antifungal surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85; 200–4.
5. Morrell M, Fraser V. J, and Kollef M. H, 2005. Delaying the empiric treatment of *candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49; 3640–45.
6. Garey K. W, et al., 2006. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin. Infect. Dis.* 43; 25–31.
7. Westh H, et al., 2009. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.* 15; 544–51.
8. Jordana-Lluch E, et al., 2015. Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology in blood specimens for the molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS ONE* 10, e0140865.
9. Chang S. S, et al., 2013. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis- a systemic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 8, e62323.
10. Desmet S, Maertens J, Bueselinck K and Lagrou K, 2016. Broad-range PCR/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of

- bacteremia and fungemia in patients with neutropenic fever. *J. Clin. Microbiol.* 54; 2513-20.
11. Metzgar D, et al., 2016. The IRIDICA BAC BSI assay: rapid, sensitive and culture-independent identification of bacteria and *Candida* in blood. *PLoS ONE*. 11; 1–16.
 12. León C, et al., 2016. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit. Care*. 20; 149.
 13. Nguyen M. H, et al., 2012. Performance of *candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 54, 1240–48.
 14. Saniç A, 2006. Mantarlar: Genel mikrobiyolojik özellikler ve sınıflandırma. Ulusoy S.(ed), Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 9-20.
 15. Çerikoğlu N, 2002. *Candida*'ların ince yapısı. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 47-54.
 16. Willke Topçu A, Çerikoğlu N, Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M(ed)., 2002. *Candida* türleri İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. *Nobel Tıp Kitabevleri*. 1797-1808.
 17. Rye C, Wise R, Jurukovski V, Jean Jung Choi D.S, Avissar Y, 2016. Biology Houston, Texas. OpenStax. Book URL: <https://openstax.org/books/biology/pages/1-introduction>. Section URL: <https://openstax.org/books/biology/pages/1-introduction>.
 18. Martin D.S, Jones C.P, 1940. Further studies on the practical classification of the Monilias. *J. Bacteriol.* 39(5): 609-30.
 19. Calderone R.A, 2002. *Candida* and Candidiasis. *ASM Press*.1-5.
 20. Barnett J.A, 2004 A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*. 21(14):1141-93.
 21. Yücel A, Kantarcıoğlu A.S, 1999. *Candida albicans*'ın Taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. *Cerrahpaşa J Med*. 30:236-46.
 22. Braude A.I, 1982. *Candida* and Torulopsis. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, editors. *Microbiology*. USA. 643-9.
 23. Dixon M.D, Fromtling R.A, 1995. Morphology, Taxonomy and Classification of the Fungi In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manuel of Clinical Microbiology*. 6 th ed. USA. *ASM Press*. 609-708.
 24. Ener B, 2004. Fırsatçı mantarlardan *Candida* türleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 18-9.

25. Georgiev V, 2003. Opportunistic Infections: Treatment and Prophylaxis. *Humana Press*. 239.
26. Koç N, 2003. Ülkemizde antifungal direnç. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, No. 46; 285-300.
27. Banerjee S.N, Emori T.G, Culver D.H, Gaynes R.P, Jarvis W.R, Horan T, Edwards J.R, Tolson J, Henderson T, Martone W.J., 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *The American Journal of Medicine*. 91(3B):86-9
28. Oriol A, Ribera J.M, Arnal J, Milla F, Batlle M, Feliu E, 1993. *Saccharomyces cerevisiae* septicemia in a patient with myelodysplastic syndrome. *American Journal of Hematology*. 43(4):325-26.
29. Hazen K.C, 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 8(4):462-78.
30. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K, 2018. *Candida albicans*—Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. *Microbial Pathogenesis*. 117:128-38.
31. Taei M, Chadeganipour M, Mohammadi R, 2019. An alarming rise of non-albicans *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Res Notes*. 12(1):779.
32. Mühlhausen S, Kollmar M, 2014. Predicting the fungal CUG codon translation with Bagheera. *BMC Genomics*. 15(1):411.
33. Yang B, Rao R, 2018. Emerging Pathogens of the *Candida* Species. In: Sandai, D., editor. *Candida Albicans* [Internet]. London: *IntechOpen*.
34. Pfaller M.A, Castanheira M, Messer S.A, ve ark., 2010a. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009) *Diagn Microbiol Infect Dis*. 68 (3): 278–83.
35. Sudbery P, Gow N, Berman J, The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004, 12, 317–324.
36. Thompson D.S, Carlisle P.L, Kadosh D, 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell* 2011, 10, 1173–1182.

37. Tümbay E, *Candida* Türleri. Ed: Ustaçelebi Ş., 1999. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Öncü Basımevi. Güneş Kitabevi*, Ankara.1081-85.
38. Akan E, 1986. *Candida* 'lar. *Tıbbi Mikrobiyoloji. Oba Kitabevi*, Konya, 609-24.
39. Kadosh D, and Mundodi V, 2020. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. *Journal of Fungi*, 6 (1); 13.
40. Gow N. A, Henderson G, Gooday G.W., 1986. Cytological interrelationships between the cell cycle and duplication cycle of *Candida albicans*. *Microbios*. 47; 97–105.
41. Sudbery P.E, 2001. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol*. 41; 19–31.
42. Warena A.J, 2002., Konopka J.B, Septin function in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*. 13; 2732–46.
43. Moran G.P, Sullivan D.J, Coleman D.C, 2002. Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens. In *Candida and Candidiasis*; Calderone, R.A., Ed.; ASM Press: Washinton, DC, USA, 2002; 37–54.
44. Sutton D.A, Fothergill A.W, Rinaldi M.G, 1998. *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed.; Williams and Wilkins: Baltimore, MD, USA.
45. Staib P, Morschhauser J, 2007. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50; 1– 12.
46. Chabasse D, Bouchara J.P, de Gentile L, Chennebault J.M, 1988. *Candida albicans* chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS. *Ann. Biol. Clin*. 46; 817–18.
47. Priest S.J, Lorenz M.C, 2015. Characterization of virulence-related phenotypes in *Candida* species of the CUG clade. *Eukaryot. Cell*. 14; 931–40.
48. Odds F.C, 1988. *Candida and Candidosis*, 2nd ed.; Baillière Tindall: London, UK, 1988; p. 468.
49. Bramley T.A, Menzies G.S, Williams R.J, Kinsman O.S, Adams, D.J, 1991. Binding sites for LH in *Candida albicans*: Comparison with the mammalian corpus luteum LH receptor. *J. Endocrinol*, 130; 177–90.
50. Caticha O, Grover S, Winge D, Odell W.D, 1992. Stimulation of *Candida albicans* transition by human chorionic gonadotrophin and a bacterial protein. *Endocr. Res*.18; 133–43.
51. Kinsman O.S, Pitblado K, Coulson C.J, 1988. Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis. *Mycoses*, 31; 617–26.

52. Brown G.D, Denning D.W, Levitz S.M, 2012. Tackling human fungal infections. *Science*, 336 (6082); 647
53. Lackey E, Vipulanandan G, Childers D.S, Kadosh D, 2013. Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species. *Eukaryot. Cell*, 12; 1356–68.
54. Banerjee M, Lazzell A.L, Romo J.A, Lopez-Ribot J.L, Kadosh D, 2019. Filamentation is associated with reduced pathogenicity of multiple non-albicans *Candida* species. *mSphere*, 4.
55. Agwu E, Ihongbe J.C, McManus B.A, et al. 2011. Distribution of yeast species associated with oral lesions in HIV-infected patients in Southwest Uganda, *Med Mycol*, 50:276-80.
56. Yue H, Bing J, Zheng Q, Zhang Y, Hu T, Du H, Wang H, Huang G, 2018. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: Passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerg. Microbes Infect.* 7; 188.
57. Yeğenoğlu Y, 2007. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İst. Tıp. Fak. Derg.*70:23-8.
58. Hilmioğlu S, 2002. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir. 125-31.
59. Warnock D.W, Fungi. In: Greenwood D., Slack R.C., Barer M.R., Irving W.L., editors., 2012. *Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. 18th ed. Churchill Livingstone/Elsevier; Edinburgh, UK: 2012. pp. 633–59.
60. Makanjuola O, Bongomin F, and Fayemiwo S. A, 2018. An Update on the Roles of Non-albicans *Candida* Species in *Vulvovaginitis*. *Journal of fungi*, 4(4); 121.
61. Sardi J.C.O, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A.M, Mendes Giannini M.J.S, 2013. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* . 62:10-24.
62. Deorukhkar S.C, Saini S, 2015. Candidiasis: Past, present and future. *Int J Infect Trop Dis*. 2:12-24.
63. Sullivan D.J, Moran G, Donnelly S et al., 1999. *Candida dubliniensis*: an update. *Rev Iberoam Micol*. 16: 72– 6.

64. Silva S, Negri M, Henriques M, et al., 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*, *FEMS Microbiol Rev.* 36;288-305.
65. Deorukhkar S.C, Saini S, Mathew S, 2014a. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Int J Microbiol.* Article ID 456878, 6 pages.
66. Bouza E, Munoz P, 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*, 32(2): 87-91.
67. Deorukhkar S.C, Saini S, Mathew S, 2014. Non-albicans *Candida* Infection: An emerging threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, Article ID 615958, 7 pages.
68. Ha J. F, Italiano C.M, Heath C.H, Shih S, Rea S, Wood F.M, 2011. Candidemia and invasive candidiasis: A review of literature for the burns surgeon. *Burns*; 37:181-95.
69. Guery B. P, Arendrup M. C, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá. M, Johnson E. M, et al, 2009. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive care medicine*, 35(1);55–62.
70. Yapar N, Pullukcu H, Avkan-Oguz V, Sayin-Kutlu S, Ertugrul B, Sacar S, et al, 2009. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. *Mycoses.* 52 (1); 61-2.
71. Deorukhkar S, Saini S, 2013. Virulence markers and antifungal susceptibility profile of *Candida glabrata*: An emerging pathogen. *British Microbiol Res J.* 3:440-7.
72. Miceli M, Diaz J, Lee S, 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 11:142-52.
73. Krcmery V, and Barnes A. J, 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *The Journal of hospital infection*, 50(4), 243-60.
74. Sullivan D.J, Westerneng T.J, Haynes K.A, Bennett D.E, Coleman D.C, 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIVinfected individual. *Microbiol.* 141:1507-21.
75. Giri S, Kindo A.J, 2012. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Ind J Med Microbiol.* 30:270-8.
76. Magill S. S, et al, 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N. Engl. J. Med.* 370; 1198–1208.

77. Cleveland A. A, et al. 2015. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS ONE* 10, e0120452.
78. Wu P. F, Liu W. L, Hsieh M. H, Hii I. M, Lee Y. L, Lin Y. T, et al 2017. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-albicans *Candida* species from cancer patients. *Emerging microbes & infections*, 6(10);87.
79. Giacobbe D.R, Maraolo A.E, Simeon V, et al., 2020. Changes in the relative prevalence of candidaemia due to non-albicans *Candida* species in adult in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Mycoses*. 63(4):334-42.
80. Wisplinghoff H, et al, 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39; 309–176.
81. Kofteridis D.P, Valachis A, Dimopoulou D, et al, 2017. Factors Influencing Non-albicans Candidemia: A Case-Case-Control Study. *Mycopathologia*.182(7-8):665-72.
82. Pappas P. G. et al, 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin. Infect. Dis.* 37; 634–43.
83. Millsop J.W, Fazel N, 2016. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 34(4):487-94.
84. Yapar N, Uysal U, Yücesoy M, et al, 2006. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. *Mycoses*, 49(2):134-8.
85. Ener B, Heper Y, Akçağlar S, Akalın H, Özakın C, Sınırtas M ve ark, 2003. Bir üniversite hastanesinde beş yıllık süreç içinde gelişen fungemiler. *Flora*. 8(2):138-43.
86. Yapar N, 2009a. *Candida* Epidemiyolojisi. BAMCAG (Batı Anadolu Mantar Çalışma Grubu), Çeşme/İzmir.
87. Hoppe J.E, Frey P, 1999. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 188-91.
88. Guzel A.B, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir S.C, 2011. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chrom ID *Candida* agar versus CHROM agar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol* 49: 16– 25.

89. Neppelenbroek K. H, Seó R. S, Urban V. M, Silva S, Dovigo L. N, Jorge J. H, et al, (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases*. 20(4), 329–44.
90. Cardenes C.D, Carrillo-Munoz A.J, Arias A, et al, 2004. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Microbiol Methods* 59: 293– 297.
91. Bowman P.I, Ahearn D.G, 1975. Evaluation of the Uni-Yeast-Tek kit for the identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2: 354– 58.
92. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez M.A, Quindos G, 2002. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* 42: 207– 27.
93. Kim D, Shin W.S, Lee K.H, Kim K, Young Park J, Koh C.M, 2002. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39 degrees C. *Yeast* 19: 957– 62.
94. Mosca C.O, Moragues M.D, Llovo J, Mosaid A. A, Coleman D.C, Ponton J, 2003. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*.41: 1259– 62.
95. Bosco-Borgeat M.E, Taverna C.G, Cordoba S et al, 2011. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia in Argentina: identification by a novel multiplex PCR and comparison of different phenotypic methods. *Mycopathologia* 172: 407– 14.
96. Campanha N.H, Neppelenbroek K.H, Spolidorio D.M, Spolidorio L.C, Pavarina A.C, 2005. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis* 11: 392– 98.
97. Latouche G.N, Daniel H.M, Lee O.C, Mitchell T.G, Sorrell T.C, Meyer W, 1997. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J Clin Microbiol* 35: 3171– 80.
98. Silverman J, Migliorati C.A, Epstein J.B, Samaranayake L.P, 1990. Laboratory diagnosis of oral candidosis. In: LP Samaranayake, TW MacFarlane eds. *Oral Candidiasis. Cambridge: Butterworth*. 13– 237.
99. Fenn J.P, Segal H, Barland B et al, 1994. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 32: 1184–87.

100. Riddle D.L, Giger O, Miller L, Hall G.S, Woods G.L, 1994. Clinical comparison of the Baxter MicroScan Yeast Identification Panel and the Vitek Yeast Biochemical Card. *Am J Clin Pathol*. 101: 438– 42.
101. Williams D.W, Lewis M.A, 2000. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis* 6: 3– 11.
102. Freydiere A.M, Guinet R, Boiron P, 2001. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*. 39: 9– 33.
103. Salkin I.F, Pruitt W.R, Padhye A.A, Sullivan D, Coleman D, Pincus D.H, 1998. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J Clin Microbiol* 36: 1467.
104. Wadlin J.K, Hanco G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I, 1999. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 37: 1967– 70.
105. Tortorano A.M, Barchiesi F, Manso E et al., 2000. Is a kit for identification of clinical yeasts correctly evaluated when released onto the market? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19: 567– 69.
106. Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A et al, 2009. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol* 24: 76– 78.
107. Buchaille L, Freydiere A.M, Guinet R, Gille Y, 1998. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 479– 88.
108. Ramani R, Gromadzki S, Pincus D.H, Salkin I.F, Chaturvedi V, 1998. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 36: 3396– 98.
109. Costa A.R, Silva F, Henriques M, Azeredo J, 2010. *Candida* clinical species identification: molecular and biochemical methods. *Ann Microbiol* 60: 105– 12.
110. Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Graser Y, Elsner P, Hipler U.C, 2011. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses* 55: 276– 80.
111. Cardenes-Perera C.D, Torres-Lana A, Alonso-Vargas R et al., 2004. Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50: 219– 21.

112. Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M, 2010. Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect* 43: 147– 54.
113. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne M.A et al, 1996. Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 34: 1846– 48.
114. Bernal S, Martin Mazuelos E, Chavez M, Coronilla J, Valverde A, 1998. Evaluation of the new API *Candida* system for identification of the most clinically important yeast species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32: 217– 21.
115. Campbell C.K, Davey K.G, Holmes A.D, Szekely A, Warnock D.W, 1999. Comparison of the API *Candida* system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 37: 821– 23.
116. Horvath L.L, Hospenthal D.R, Murray C.K, Dooley D.P, 2003. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol*. 41: 2629– 32.
117. Bauters T.G, Nelis H.J, 2002. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *J Clin Microbiol* 40: 1838–39.
118. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M, 2001. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 39: 3793– 95.
119. Schoofs A, Odds F.C, Colebunders R, Ieven M, Goossens H, 1997. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 296– 300.
120. Yucesoy M, Marol S, 2003. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2: 8.
121. Letscher-Bru V, Meyer M.H, Galois A.C, Waller J, Candolfi E, 2002. Prospective evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 40: 1508–10.
122. Land G.A, Salkin I.F, el-Zaatari M, McGinnis M.R, Hashem G, 1991. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol* 29: 718–22.

123. El-Zaatari M, Pasarell L, McGinnis M.R, Buckner J, Land G.A, Salkin I.F, 1990. Evaluation of the updated Vitek yeast identification data base. *J Clin Microbiol* 28: 1938–41.
124. St Germain G, Beauchesne D, 1991. Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification panel. *J Clin Microbiol*. 29: 2296–99.
125. Pfaller M.A, Jones R.N, Doern G.V, et al., 1998. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *J. Clin. Microbiol*. 36 (7): 1886-89.
126. Dooley D.P, Beckius M.L, Jeffrey B.S, 1994. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J Clin Microbiol* 32: 2889–92.
127. Graf B, Adam T, Zill E, Gobel U.B, 2000. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 38: 1782– 85.
128. Massonet C, Van Eldere J, Vaneechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K., 2004. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol*. 42: 2209–11.
129. Calvo R.M, Calvo M.A, Larrondo J, 1991. Enzyme activities in *Chrysosporium* strains. *Mycopathologia*. 116: 177–79.
130. Slifkin M, 2000. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 38: 4626–28.
131. Dostal J, Hamal P, Pavlickova L, et al., 2003. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol*. 41: 712– 16.
132. Trtkova J, Raclavsky V, 2006. Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repubi*, 150: 51– 61.
133. Shepard J.R, Addison R.M, Alexander B.D, et al., 2008. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* kompleks directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 46: 50–5.
134. Luo G, Mitchell T.G, 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2860–65.

135. Lau A, Sorrell T.C, Chen S, Stanley K, Iredell J, Halliday C, 2008. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. *J Clin Microbiol.* 46: 3021–27.
136. Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins M.L et al., 2007. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol* 45: 619– 27.
137. Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G, 2009. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods* 79: 117–20.
138. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, et al, 1999. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 37: 925– 30.
139. Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A, 2002. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast.* 19: 973–89.
140. Trtkova J, Raclavsky V, 2006. Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150: 51– 61.
141. Guiver M, Levi K, Oppenheim B.A, 2001. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol.* 54: 362–66.
142. Yeo S.F, Wong B, 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 15: 465–84.
143. Selvarangan R, Bui U, Limaye A.P, Cookson B.T, 2003. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 41: 5660–64.
144. Shin J. H, Nolte F. S, Holloway B. P, Morrison C.J, 1999. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol,* 37: 165–70.
145. World Health Organization (March 2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: *World Health Organization*, 55; 88-186.
146. Fischer J, Ganellin, R. C, 2006. Analogue-based Drug Discovery. *John Wiley & Sons.* 503. ISBN 9783527607495.

147. Walker S. R, 2012. Trends and Changes in Drug Research and Development. *Springer Science & Business Media*, 109. ISBN 9789400926592.
148. World Health Organization (2019). World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. Geneva: *World Health Organization*.
149. Kendig E. L, Wilmott R.W, Chernick V, 2012. Kendig and Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children. *Elsevier Health Sciences*, 539. ISBN 978-1437719840.
150. Ke L, Dengyang F, Zuming X, Runlan L, 2019. " Inhibition of the hedgehog pathway for the treatment of cancer using Itraconazole". *OncoTargets and Therapy*. 12: 6875–86.
151. Schiller D.S, Fung H.B, 2007. "Posaconazole: an extended-spectrum triazole antifungal agent". *Clinical Therapeutics*. 29(9): 1862–86.
152. Posaconazole: FDA-Approved Drugs".2020. U.S. Food and Drug Administration (FDA).
153. Walsh T.J, Raad I, Patterson T.F, Chandrasekar P, Donowitz G.R, Graybill R, et al. ,2007. "Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial". *Clinical Infectious Diseases*. 44 (1): 2–12.
154. Raad I.I, Hachem R.Y, Herbrecht R, Graybill J.R, Hare R, Corcoran G, et al, 2006. "Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions". *Clinical Infectious Diseases*. 42 (10): 1398–403.
155. Rex J. H, Pfaller M. A, Walsh T. J, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M. A, et al, 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 643–58.
156. Pfüller R, Gräser Y, Erhard M, Groenewald M, 2011. A novel flucytosine-resistant yeast species, *Candida pseudoaaseri*, causes disease in a cancer patient, *J Clin Microbiol*, 1; 49; 4195-4202.
157. Mohammadi R, Mirhendi H, Matehkolaei A.R, Ghahri M, Mohammad R.S, Jalalizand N, et al, 2013. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients, *Medical Mycology*, 51 (6);657–63.
158. Kiraz N, Oz Y, 2011. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period, *Med Mycol*, 49;126-31.

159. Zirkel J, Klinker H, Kuhn A, et al, 2012. Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors, *Med Mycol*, 50; 50-55.
160. Al-ruwaili M, Khalil O.M, Saad M.F, 2018. Molecular Identification of *Candida* Species Isolated from Different Clinical Specimens at Al Jouf Area, *Saudi Arabia. P J m*. 12;(2).
161. Yücesoy M, 2005. *Candida* türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı*; 3-6 Mayıs, 2005; Konya, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 49, 2005:46-58.
162. Yüksekaya Ş, Fındık D, Arslan U, 2010. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarından idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılıkları, *Tıbbi Mikrobiyoloji. Selçuk Üniversitesi: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi. Mikrobiyol Bul*, 1: 137- 49.
163. Kaya K, Kaya S, Avuduk A, 2004. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 10 Aylık Periyotta Saptanan Kandidüri Etkenlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 26 (2): 71 – 74.
164. Ozhak-Baysan B, Ogunc D, Colak D, Ongut G, Donmez L, Vural T, et al, (2012). Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. *Medical mycology*, 50(5); 529–32.
165. Badiie P et al, 2017. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from the immunocompromised patients admitted to ten university hospitals in Iran: comparison of colonizing and infecting isolates. *BMC Infectious Diseases*, 17:727.
166. Mokaddas E.M, Al-Sweih N.A, Khan Z.U, 2007. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *Journal of medical microbiology*, 56: 255-59.
167. Yang Z.T, Wu L, Liu X.Y, and et al, 2014 Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. Bloodstream infection in Shanghai. *BMC infectious Disease*, 14: 241.
168. Marcoa F, Danés C, Almela M, et al, 2003. Trends in frequency and in vitro susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. Results from a six-year study (1996–2001). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 46: 259-64.

169. Gualco L, Debbia E.A, Bandettini R, et al, 2007. Antifungal resistance in *Candida* spp. Isolated in Italy Between 2002 and 2005 from Children and Adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 179-84.
170. Biçmen C, Doluca M, Gülat S, ve ark, 2012. Species level identification and antifungal of yeast isolated from various clinical specimens and evalution of Integral System Yeast Plus. *New Microbiologica*, 35: 327-34.
171. Çalışkan E, Dede A, Güven G.B, 2013. Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin Dağılımı ve Antifungal duyarlılıkları. *AMKEM Derg*, 27 (1): 25-30.
172. Gültekin B, Eyigör Mete, Telli M, ve ark, 2010. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *AMKEM Derg*, 24 (4): 202-8.
173. Çıkman A, Parlak M, Ceylan M.R, ve ark., 2014. Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* ların Tür Dağılımı ve Antifungal Direnci. *Van Tıp Dergisi*, 21 (1): 1-5.
174. Kuzucu Ç, Durmaz R, Otlı B, ve ark, 2008. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiologica*. 31: 401-8.
175. Tortorano A.M, Rigoni A.L, Biraghi E, ve ark, 2003. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of *candidaemia* in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 679-82.
176. Morii D, Seki M, Binongo J.N, ve ark, 2014. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. *Journal Infect and Chemother*, 20: 558-62.
177. Çekin Y, Pekintürk N, Cekin A.H, 2015. Yatan Hasta Örneklerinden İzole Edilen *Candida* İzolatlarının Tür Dağılımı ve Antifungal Direnç Oranlarının Değerlendirilmesi. *J Clin Anal Med*, 6 (1): 8-11.
178. Pfaller M.A, Diekema D.J, Jones R.N, ve ark., 2002. Trends in Antifungal Susceptibility of *Candida* spp. Isolated from Pediatric and Adult Patients with Bloodstream Infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 40 (3): 852-56.

179. Atalay M.A, Koç A.N, Sav H, Demir G, 2013. Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Hij Den Biyol Derg.*70: 185.
180. Matsumoto E, Boyken L, Tendolkar S, ve ark., 2014. Candidemia surveillance in Iowa: emergence of echinocandin resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.*79 (2): 205–8.
181. Pfaller M.A, Diekema D.J, Gibbs D.L, Newell V.A, Ellis D, Tullio V, ve ark, 2010b. Group global antifungal surveillance, results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology.*48(4):1366-77.
182. Pfaller M.A, Messer S.A, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis R.J, ve ark., 2003. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol.* 41(12):5729-31.
183. Guinea J, 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*, 20 (6): 5-10.
184. Ostrosky-Zeichner L, Rex J.H, Pappas P.G, ve ark., 2003. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*47 (10): 3149-54.
185. Feyzioğlu B, Doğan M, Özdemir M, ve ark., 2014. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Corn Meal Agar, *Candida* ID2 Kromojenik Besiyeri ve API 32 IDC Performansının Değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg*, 30 (2): 43-45.
186. Mishra M, Agrawal S, Raut S, Kurhade A, Powar R, 2014. Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patientp. *Journal of clinical and diagnostic research.* 8(2):44-46.
187. Koçoğlu E, Bayram A, Balcı İ, 2005. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Türleri ve Antifungal Duyarlılıkları. *Van Tıp Dergisi*, 12 (3): 195-200.
188. Otağ F, Ersöz G, Doruk N, Erköse G, Erturan Z, Kaya A, 2004. Yoğun bakım ünitesi hastalarından kolonizasyon etkeni olarak soyutlanan *Candida* cinsi mantarlar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34: 91-7.
189. Otağ F, Aslan G, Şen S, Özturhan H, Emekdaş G, 2005. 2003-2005 süresinde klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi. Turkish Journal of Infection.*19 (4): 435-43.

190. Ünlü F, Özgüneş İ, Nayman A, Erben N, Kartal E.D, Usluer G, 2010. Nozokomiyal Fungal Enfeksiyon Verilerinin Değerlendirilmesi. 3. Türkiye EKMUD Kongresi 2010 12-16 Mayıs 2010, Ankara sf:266.
191. Godoy P, Tiraboschi I.N, Severo L.C, ve ark., 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98 (3): 401-5.
192. Furlaneto M.C, Rota J.F, Borsato Quesada R.M, ve ark., 2011. Species Distribution and in vitro Susceptibility of Clinical *Candida* Isolates in a Brazilian Tertiary-Care Hospital over a three year period. *Revista da Sociedade de medicina Tropical*, 44 (5): 595-99.
193. Matta D.A, Almeida L.P, Machado A.M, ve ark.,2007. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995–2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 57 (4): 399–404.
194. Cömert F, Külah C, Aktas E, 2006. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses*, 50; 52–7.
195. Tulumoğlu Ş, Karıptaş E, Erdem B, 2009. Identification and antifungal susceptibility of *candida* isolates from various clinical specimens in Doctor Behçet Uz Hospital (Anatol *J Clin Investig*, 3(3);170-73.
196. Özer B, İnci M, Duran N, ve ark., 2010. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *candida* türleri ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması 25. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 28 Nisan-02 Mayıs 2010 *Ankem Derg*. 2010; 24.
197. Tavanti A, Davidson A.D, Gow N.A, Maiden M.C, Odds F.C, 2005. *Candida* orthopsilosis and *Candida* metapsilosis spp. nov. to replace *Candida* parapsilosis groups II and III. *J Clin Microbiol*,43; 284-92.
198. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z.U, 2009. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida* parapsilosis and *Candida* orthopsilosis strains isolated from clinical specimens in Kuwait, *J Med Microbiol*, 58; 745-52.
199. De Toro M, Torres M.J, Maite R, Aznar J, 2011. Characterization of *Candida* parapsilosis complex isolates, *Clin Microbiol Infect*;17; 418-24.
200. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J.D, 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen, *Clin Microbiol Rev*, 2; 606-25.

201. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J, 1998. Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 36: 883–86.
202. Baran N, Salman I.S, Yurtsever S.G, Ozdemir R, Gungor S, Yurtsever S, et al., 2013. Typing of *Candida* species isolated from blood cultures and analysis of their in vitro antifungal susceptibilities. *Afr J Microbiol Res.* 7:4882–85.
203. Ekşi F, Gayyurhan E.D, Balcı İ, 2010. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *candida* türlerinin antifungal duyarlılıklarının değerlendirilmesi. 25. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 28 Nisan-02 Mayıs 2010 *Ankem Derg*, 2010; 24 (Ek 1).
204. Verduyn Lunel F.M, Meis J.F, Voss A., 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34(3): 213-20.
205. Clark T.A, Slavinski S.A, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs B.A, Brandt M.E, ve ark, 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol.* 42(10): 4468-72.
206. Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R, 2012. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31; 1399-1412.
207. Morace G, Borghi E, Iatta R, Amato G, Andreoni S, Brigante G, ve ark, 2011. Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. *BMC Infect Dis.* 11:130.
208. Pfaller M.A, Castanheira M., Lockhart S.R, Jones R.N, 2012. *Candida glabrata*: multidrug resistance and increased virulence in a major opportunistic fungal pathogen. *Current fungal infection reports*.6(3):154–64.
209. Taj-Aldeen S.J, AbdulWahab A, Kolečka A, Deshmukh A, Meis J.F, Boekhout T. 2014. Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. *Medical mycology*.52(5):552–56.
210. Arendrup M.C, 2013. *Candida* and *candidaemia*. Susceptibility and epidemiology. *Danish medical journal.* 60(11): B4698.
211. Paulo C, 2009. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Medical Mycology*, 47; 836–44.

212. Wellinghausen N, 2009. Rapid diagnosis of *candidaemia* by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. *Journal of Medical Microbiology*, 58;1106–11.
213. Khot P.D, 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*.7(10): 1201–21.
214. Erdem H, 2017. *Candida* Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 47(3):114-24.
215. Santos M. S, Souza E, Junior R. M. S, Talhari S, Souza J. V, 2010. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Brazilian journal of medical and biological research. *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 43(8), 712–16.
216. Taira C. L, Okay T. S, Delgado A. F, Ceccon M. E, de Almeida M. T, Del Negro G. M, 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC infectious diseases*, 14; 406.
217. Lockhart S.R, Messer S.A, Gherna M, Bishop J.A, Merz W.G, Pfaller M.A, et al, 2009. *Candida glabrata* izolatlarının geniş bir küresel koleksiyonunda *Candida nivariensis* ve *Candida bracarensis*'in tanımlanması: literatürle karşılaştırma. *Klinik mikrobiyoloji dergisi*. 47 (4):1216–17.
218. Fujita S.I, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T, 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol*; 39(10): 3617-22.
219. Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Göbel U. B, ve ark, 2004. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *Journal of microbiological methods*, 56(2); 201–211.
220. Sahiner F, Ergünay K, Ozyurt M, Ardıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T, 2011. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması [Phenotypic and genotypic identification of *Candida strains* isolated as nosocomial pathogens]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 45(3), 478–88.
221. Abbasi Nejat Z, Farahyar S, Falahati M, Ashrafi Khozani M, Hosseini A. F, Faiazy A, ve ark, 2017. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Pattern of *Non-albicans Candida Species* Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. *Iranian biomedical journal*, 22(1); 33–41.
222. Vandeputte P, Ferrari S, Coste A. T, 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012, 713687.

223. Alastruey-izquierdo A, et al, 2015. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology *Rev. Inst. Med. Trop.*, 57(19):57-64.
224. Hassan A.B, 2018. Yoğun Bakım Hastalarının İdrar Kültüründen İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi, 2018. T.C. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*; ss 58-65, Gaziantep.
225. Toka Ö. T, Durmaz S, Yula E, 2016. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. *J Infect Chemother.* 22: 629-32.
226. ElFeky D.S, Gohar N.M, El-Seidi E.A, Ezzat M.M, AboElew S.H, 2015. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovajinal candidiasis. *Alexandria Journal of Medicine.* 269-277.
227. Zhang L, Zhou S, Pan A ve ark, 2015. Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. *International Journal of Infectious Diseases*, 33:1-4.
228. Ramos I.F, Maia J.N, Ricardo E, ve ark, 2014. Species Distribution and in vitro Susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 2241-2247.
229. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, ve ark. 2001. Prevalence and Antifungal Susceptibility of 442 *Candida* Isolates from Blood and Other Normally Sterile Sites: Results of a 2-Year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 39 (3): 949-53.
230. Öztürk T, Özseven A.G, Çetin E.S, ve ark. 2013. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının Tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Medical Journal*, 14: 17-22.
231. Bayram Y, Gültepe B, Özlük S, 2012. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Kökenlerinin İdentifikasyonu ve Antifungal Duyarlılıklarının Araştırılması. *Van Tıp Dergisi*, 19(4): 177-81.
232. Atalay M.A, Sav H, Demir G ve ark, 2012. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole İn vitro Duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg*, 28 (3): 149-51.
233. Temiz H, Temiz S, Kaya Ş, 2015. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. *Okmeydanı Tıp Dergisi*; 31 (1): 13-17.

234. Zer Y, Balcı İ, 2002. Yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 32:230-34.
235. Santhanam J, Yahaya N, Aziz M. N, 2013. Species Distribution and Antifungal Susceptibility patterns of *Candida* species: is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med J Malaysia*, 68 (4):343-7.
236. Schmalreck A.F, Willinger B, Haase G, ve ark, 2012. Species and Susceptibility Distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses*, 55: 124-37.
237. Kalkancı A, 2005. Mikozların serolojik tanısında yenilikler. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 3-6 Mayıs, 2005; Konya, Türkiye. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, No. 49, 2005: 21-32.
238. Pfaller M. A, Diekema D. J, Rinaldi M. G, Barnes R, Hu B, Veselov A. V, Tiraboschi N and the Global Antifungal Surveillance Group. 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal Of Clinical microbiology*, Dec. 2005, p. 5848–59 Vol. 43, No. 12.
239. Nucci M, Anaissie E, 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis*, 33:1959-67.
240. Sulaiman S.P, Singh R, Mandal J, 2014. Fungal profile of funguria cases at a tertiary care hospital in southern India. *Indian Journal of medical Research*, 140 (4): 556-59.
241. Richter S.R, Galask R.P, Messer S.A, ve ark., 2005. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *J Clin Microbiol*. 43 (5): 2155–62.
242. Katsuragi S, Sata M, Kobayashi Y, 2014. Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates at One Institution. *Medical Mycology Journal*, 55 (1): 1-7.
243. Kebudi R, 2007. Yeni antifungaller. *Ankem Dergisi*. 21(2):210-15.
244. Arıkan S, Rex J.H, 2007. Antifungal Agents. In: Murray P.R, Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H, Pfaller M.A, (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (9 th ed). Washington DC, ASM Press, 2007:1949-1960.
245. Alpat S.N, Özgüneş İ, Ertem O.T, (2011). Kandidürisi Olan Hastalarda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 45(2):318-24.

246. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P, 2008. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amfotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32:511-14.
247. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Arendrup MC, Melatiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J et al. EUCAST definitive document EDEF 7.3.1 January 2017 : method for the determination of the broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeast.
248. Arendrup MC, Meletiadiis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, EUCAST Definitive Document E. Def 7.3.1. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts; *Basel*, Switzerland: 2014.
249. Asan A, Tuney E, Sen B, 2018. Saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofungusların ITS, β -tubulin ve Aktin gen dizilerine göre moleküler tanısı. *Mantar Dergisi*, 9 (1), 1-17.
250. Kumar M. S, Kaur G, Sandhu A. K, Genomic DNA Isolation from Fungi, Algae, Plant, Bacteria and Human Blood using CTAB. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. ISSN (Online): 2319-7064. Impact Factor (2012): 3.358 Volume 3 Issue 9, September 2014.

8. ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Candida</i> türlerinin yerleşim yüzeylerinin gösterimi.....	14
Şekil 2. Chromagar plak görseli.....	19
Şekil 3. A. Analitik Jena cihazı.B. Santrifüj cihazı.....	33
Şekil 4. Analytik Jena TMix çalkalamalı ısıtıcı blok.....	34
Şekil 5. <i>Candida</i> DNA'larının çoğaltılmasında kullanılan PCR cihazı.....	35
Şekil 6. ITS1 ve ITS4 primerleri ile çoğaltılan DNA bölgesine ait PCR ürünleri.....	37
Şekil 7. Temizleme basamağından sonra PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	38
Şekil 8. Çalışmada kullanılan klinik örneklerin bölümlere göre dağılımı	40
Şekil 9. Klinik örneklerin dağılımı	41
Şekil 10. BD Phoenix 100 otomatize tanımlama cihazı ile tanımlanan türlerin dağılımı.....	41

9.TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. NAC türlerinin neden olduğu önemli klinik belirtiler.....	11
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	27
Tablo 3. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması (glikozlu %2)	28
Tablo 4. Standart bir çözelti hazırlamak için gereken toz veya seyreltici miktar hesaplama fomülü	28
Tablo 5. Antifungal ilaçları eritebilmek için gerekli olan solvent miktarlar tablosu	29
Tablo 6. Antifungal dilüsyon serileri ve final konsantrasyon hazırlanması	30
Tablo 7. Phoenix otomatize maya identifikasyon sisteminde kullanılan biyokimyasal reaktifler.	32
Tablo 8. Kullanılacak PCR mix karışım hazırlama tablosu	35
Tablo 9. PCR amplifikasyon basamak protokolü.....	36
Tablo 10. EXOSAP reaksiyon mixin hazırlanması	37
Tablo 11. EXOSAP temizleme basamağı PCR protokolü	37
Tablo 12. Cycle Sequencing PCR Mix hazırlanma protokolü	38
Tablo 13. SAM mixi hazırlanma protokolü.....	38
Tablo 14. BigDye v 3.1. PCR protokolü	38
Tablo 15. İzolatların tür düzeyinde tanımlama sonuçları	42
Tablo 16. <i>Candida</i> türlerinin moleküler tanımlama sistemi ve BD Phoenix Otomatize sisteme göre tanımlama oranları.....	43
Tablo 17. Yöntemlerin karşılaştırılmasında uyumlu olmayan sonuçlar.....	44
Tablo 18. Moleküler tanımlama sistemi (DNA dizi analizi) ve BD Phoenix 100 otomatize tanımlama sistemi sonuçlarının karşılaştırılması.....	45
Tablo 19. <i>Candida</i> türlerine göre amfoterisin B direnç durumu ve MİK değerleri	46
Tablo 20. <i>Candida</i> türlerine göre flukonazol direnç durumu ve MİK değerleri	48
Tablo 21. <i>Candida</i> türlerine göre itrakonazol direnç durumu ve MİK değerleri	50
Tablo 22. <i>Candida</i> türlerine göre vorikonazol direnç durumu ve MİK değerleri	52
Tablo 23. NAC izolatlarının antifungal ajanlara direnç oranları.....	53
Tablo 24. <i>C. glabrata</i> kompleks izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	54

Tablo 25. <i>C. krusei</i> izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	54
Tablo 26. <i>C. parapsilosis</i> kompleks izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	55
Tablo 27. <i>C. tropicalis</i> izolatlarının, Amfoterisin B, Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol için MİK aralıkları, MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	55



10. EKLER DİZİNİ

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu	93
-------------------------------------	----



Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu

