

# Albicans Dışı *Candida* Türlerinin DNA Dizi Analizi ile Tanımlanması ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

## Identification of Non-Albicans *Candida* Species by DNA Sequence Analysis and Determination of Antifungal Susceptibilities

Hulusi GÜVEN<sup>1</sup>, Filiz ORAK<sup>2</sup>, Adem DOĞANER<sup>3</sup>, Kezban Tülay YALÇINKAYA<sup>2</sup>, İbrahim Seyfettin ÇELİK<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş

<sup>2</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş

<sup>3</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş

<sup>4</sup> Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Üniversite-Sanayi-Kamu İş birliği Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÜSKİM), Kahramanmaraş

### Özet

**Amaç:** Son yıllarda invazif kandidiyaz enfeksiyonlarında albicans -dışı *Candida* türleri lehine bir artış olmuş ve antifungal ilaçlara dirençli suşların ortaya çıkması ile birlikte tedaviye uygun antifungallerin seçimi daha da önem kazanmıştır. Bu çalışmada albicans dışı *Candida* türlerinin tanımlanmasında DNA dizi analizi sonuçlarının Phoenix Yeast ID Panel (BD, ABD) ticari tanımlama sistemi ile karşılaştırılması ve izolatların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya, Ekim 2019-Ekim 2021 tarihleri arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 82 albicans dışı *Candida* türü dahil edildi. İzolatları tanımlamak için geleneksel yöntemlerle birlikte BD Phoenix Yeast ID (BD, ABD) otomatik tanımlama sistemi ve DNA dizi analizi yapıldı. İzolatların amfoterisin B, itraconazol, flukonazol ve vorikonazol için duyarlılıkları EUCAST tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı.

**Bulgular:** BD Phoenix™ Yeast ID Panel otomatize sistem ile izolatların 26 (% 31,7%)'si *C. tropicalis*, 25 (% 30,5%)'i *C. parapsilosis* kompleks, 17 (% 20,7)'si *C. glabrata* kompleks, 4 (% 4,9)'ü *C. kefyr*, 4 (4,9%)'ü *C. firmetaria*, 3 (% 3,7)'ü *C. krusei*, 2 (% 2,4)'si *C. norvegensis* ve 1 (% 1,2)'i *C. lambica* olarak tanımlandı. BD Phoenix™ Yeast ID Panel otomatize sistem moleküler yöntem ile karşılaştırıldığında; 82 türden 62 (% 75,61)'sinin doğru tanımlandığı saptandı ( $p<0,001$ ,  $\kappa=0,655$ ). Uyumlu tanımlama bulgularına göre en sık izole edilen türler *C. tropicalis* (n= 24, % 80), *C. parapsilosis* kompleks (n= 22, % 88) ve *C. glabrata* kompleks (n= 11, % 57,9) bulundu. Uyum oranı, sık izole edilen türler için (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. glabrata* kompleks) % 77, seyrek izole edilen türler için (*C. kefyr* ve *C. krusei*) ise %50 olarak belirlendi ( $p= 0.194$ ;  $\chi^2=2.768$ ). Antifungal duyarlılık testine göre; izolatların 6 (% 7,3)'sı amfoterisin B'ye, 22 (% 26,8)'si flukonazole, 16 (% 19,5)'si itraconazole ve 9 (% 10,9)'u vorikonazole dirençli bulundu.

**Sonuç:** Moleküler testlerin yapılamadığı laboratuvarlarda fenotipik testler *Candida* türlerinin tanımlanmasında tek başına yeterli olmayıp, lam kültürü gibi morfolojiyi belirlemeye yönelik testlerle birlikte değerlendirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Albicans dışı *Candida*, Antifungal, Duyarlılık testi, DNA Dizi Analizi

### Abstract

**Objective:** In recent years, there has been an increase in invasive candidiasis infections in favor of non-albicans *Candida* species, and with the emergence of strains resistant to antifungal drugs, the selection of antifungals suitable for treatment has become more important. This study aimed to compare the results of DNA sequence analysis with the Phoenix Yeast ID Panel (BD, USA) commercial identification system in identifying non-albicans *Candida* species and to determine the antifungal susceptibilities of the isolates.

**Material and Methods:** A total of 82 non-albicans *Candida* species isolated from various clinical samples sent to the Microbiology Laboratory of Kahramanmaraş Sütçü İmam University between October 2019 and October 2021 were included in the study.

The BD Phoenix Yeast ID (BD, USA) automated identification system and DNA sequencing were performed, along with conventional methods, to identify the isolates. The susceptibility of the isolates for amphotericin B, itraconazole, fluconazole, and voriconazole was studied using the broth microdilution method recommended by EUCAST.

**Results:** By the BD Phoenix™ 100 automatic identification system 26 (31.7%) of the isolates were identified as *C. tropicalis*, 25 (30.5%) were *C. parapsilosis* complex, 17 (20.7%) were *C. glabrata* kompleks, 4 (4.9%) were *C. kefyr*; 4 (4.9%) were *C. firmetaria*, 3 (3.7%) were *C. krusei*, 2 (2.4%) were *C. norvegensis* and 1 (1.2%) was identified as *C. lambica*.

Compared to the molecular method of the BD Phoenix™ Yeast ID Panel automated system; it was determined that 62 of 82 species (75.61 %) were correctly identified ( $p<0.001$ ,  $\kappa=0.655$ ). According to concordant identification findings, the most frequently isolated species were *C. tropicalis* (n=24, 80 %), *C. parapsilosis* complex (n=22, 88 %), and *C. glabrata* complex (n=11, 57.9 %). The agreement rate was determined as 77 % for frequently isolated species (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex, and *C. glabrata* complex) and 50 % for rarely isolated species (*C. kefyr* and *C. krusei*) ( $p= 0.194$ ;  $\chi^2=2.768$ ). According to the antifungal susceptibility test; 6 (7.3 %) of the isolates were resistant to amphotericin B, 22 (26.8 %) to fluconazole, 16 (19.5 %) to itraconazole and 9 (10.9 %) to voriconazole.

**Conclusion:** In laboratories where molecular tests cannot be performed, phenotypic tests alone are insufficient to identify *Candida* species and should be evaluated together with tests to determine morphology, such as slide culture.

**Keywords:** non-albicans *Candida*, Antifungal, Susceptibility testing, DNA Sequence Analysis

**Yazışma Adresi:** Filiz ORAK, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

**Telefon:** +90 506 337 1046 **e-mail:** drfilizorak@hotmail.com

**ORCID No (Sırasıyla):** 0000-0001-9987-2164;0000-0001-5153-7391;0000-0002-0270-9350; 0000-0002-6324-4585; 0000-0001-6946-4477

**Geliş tarihi:** 16.03.2023

**Kabul tarihi:** 29.04.2023

**DOI:** 10.17517/ksutfd.1266358

## GİRİŞ

İnvazif fungal enfeksiyon etkenleri arasında *Candida* türleri arasında yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonların % 18'inden sorumlu tutulmaktadır (1). *C. albicans* en sık tanımlanan tür olmasına rağmen son yıllarda *albicans* dışı *Candida* (NAC) türlerinin neden olduğu sistemik mantar enfeksiyonlarının insidansının arttığı bildirilmektedir (1).

*Albicans* dışı *Candida* türlerinin sıklığındaki artışta prematürite, bağışıklık baskılanması, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve ampirik antifungal ilaç kullanımı gibi birçok etkenin ilişkili olabileceği belirtilmektedir (2). Ancak klinik örneklerde bakteri ve mantar kontaminasyonunun sıklıkla görülmesi nedeni ile ayırımın doğru yapılması gerekmektedir (3).

Genel olarak, NAC türlerine bağlı enfeksiyonların belirgin klinik belirtileri yoktur. Bunun yanında bazı NAC türleri, başta azol türevleri gibi antifungal ajanlara doğal olarak dirençlidir veya daha sonra direnç kazanabilir (2). Bu durum, antifungal ilaç seçimini daha da önemli hale getirmiştir (1). Duyarlılık testlerinin referans yöntem olan mikrodilüsyon yöntemi ile yapılması, antifungal tedaviye yön vermenin yanı sıra *in vitro* olarak dirençli izolatların belirlenmesini de sağlamaktadır (4).

Klinik laboratuvarlarda tanımlama, morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre geleneksel fenotipik yöntemlerle yapılmaktadır (5). *Candida* enfeksiyonunu tanımlamada kullanılan mannan antijeni, anti-mannan ve  $\beta$ -D-glukan antikoru içeren biyobelirteçler, değişkenlik göstermekle birlikte birçok hastada tanı özgüllükleri ve duyarlılıkları sınırlıdır (6).

Son yıllarda fenotipik maya tanı yöntemlerinin sınırlamalarının üstesinden gelmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı moleküler tanımlama yöntemleri, özellikle PCR-RFLP, gerçek zamanlı PCR veya diğer ileri moleküler teknikler geliştirilmiştir. Ribozomal DNA genlerinin (rDNA) özellikle dahili transkripsiyonlu ayırıcı (ITS) bölgesinin dizi analizi, nadir maya türlerini daha iyi ayırt edilmesine olanak sağlamıştır. Tüm bunlara rağmen, mayaların tür düzeyinde doğru olarak tanımlanması, genellikle geleneksel ve moleküler yöntemlerin bir kombinasyonunu gerektirmektedir (7).

Bu çalışmada, NAC türlerinin tanımlanmasına yönelik DNA dizi analizi ile Phoenix Yeast ID Panel (BD, ABD) otomatize tanımlama sistemlerinin karşılaştırılması ve antifungal ajanlara *in vitro* duyarlılıklarının referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ) Etik Kurulu'nun 03.04.2020 tarihli ve

2020/05-38 no'lu kararı ile onaylanmıştır. Çalışmaya, Ekim 2019-Ekim 2021 tarihleri arasında KSÜ Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen farklı klinik örneklerden (54 kan, 25 idrar, 1 katater ve 2 yara yeri) izole edilen toplam 82 *albicans* dışı *Candida* türü dahil edildi.

## Candida Türlerinin İzole Edilmesi ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Klinik örnekler % 5 koyun kanlı (BD, USA) ve Sabouraud's dekstroz agar (SDA) (GBL, Türkiye)'a ekilerek, 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen maya kolonileri, üreaz aktivitesi, Gram boyanma, germ tüp oluşumu ve lam kültüründe morfolojik görünüm açısından incelendi. Saf olduğu belirlenen koloniler, BD Phoenix Yeast ID Panel (BD, ABD) otomatik tanımlama sistemi ile tanımlandı ve moleküler çalışma öncesinde -80°C'de yağsız süt içeren elüsyon tüplerde saklandı.

İzolatların flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B'ye *in vitro* duyarlılıkları the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document E.DEF 7.3.1 rehberine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı (8). Bu amaçla, besiyeri olarak L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız morfolinopropansulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış RPMI-1640 besiyeri (pH:7.0) kullanıldı. Düz tabanlı mikropaklar kullanılarak kuyucuklara amfoterisin B (Discovery Fine Chemicals, UK) için 0.0156-8 µg/ml, flukonazol (Discovery Fine Chemicals, UK) için 0.125-64 µg/ml; itrakonazol (Discovery Fine Chemicals, UK) için 0.0156-8 µg/ml, vorikonazol (Discovery Fine Chemicals, UK) için de 0.0156-8 µg/ml konsantrasyon arasında değişen çift kat seri sulandırılmalar yapıldı ve eşit hacimlerde maya inokulumu eklendi. Mikropaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda değerlendirildi. Antifungal içermeyen kontrol kuyucuğu, üremeye kıyasla amfoterisin B için % 90, azol türevleri için ise üremenin %50 azalma gösterdiği en düşük antifungal konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

## DNA Dizi Analizi

Genomik DNA elde etmek için SDA'da büyüyen 24 saatlik taze koloniler seçildi. DNA izolasyonu daha önce Zhang ve ark.'nın belirttiği şekilde yapıldı (9).

*Candida* türlerinin tanımlanmasında mantar rDNA'sı 5.8S bölgesinde ITS genini amplifiye etmek için tüm mantarlara özgü universal primerler olan ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ve ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Oligomer, Türkiye)

kullanıldı. PCR ile gen bölgelerinin çoğaltılmasında ticari kit (QIAGEN, cat. no. 201443) ve PCR cihazı kullanıldı. PCR karışımı; her primerden 2 µL, MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 3 µL, Taq polimeraz 0,4 µL, 10x tampon 5 µL, ultra saf su 24,6 µL, 10 µL loading dye ve 2 µL DNA olacak şekilde toplam 50 µL olacak şekilde hazırlandı.

Termalcyler cihazında (The Eppendorf Vapo.protect Mastercycler® Pro, Eppendorf, ABD) program 96°C'de 5 dakika ve 30 sn 1 döngü, 54°C 45 sn ve 72°C 1dk 35 döngü ve 72°C'de 10 dk 1 döngü olacak şekilde ayarlandı. Amplikonların 8 µL'lik hacmine 3/4 µL bromofenol mavisi eklendi ve % 1,5 etidyum bromür ile boyanmış agaroz jel (Vivantis, Malezya) kuyucuklarında 80V'de 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV transillüminatör (UVP EC3 Chemi HR 410 Bioimaging System, Cambridge, UK) altında görüntülendi.

PCR ürünlerinden reaksiyona girmemiş primer ve dNTP'leri çıkarmak için saflaştırma kiti (EXOSAP ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup, Fisherscientific, ABD) kullanıldı. Temizleme adımının ardından jel elektroforezinde net bant veren ürünler alınarak AB 3130 XL 16 kapiller cihaz (ThermoFisher Scientific, İsveç) ile DNA dizi analizi yapıldı. Sanger yöntemi ile belirlenen nükleotit dizileri, MEGA 7 (TreeView) ile referans dizilerle karşılaştırıldı ve BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) programı yardımıyla analiz edildi.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi için nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smir-

nov testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde istatistiksel parametreler median (% 25 quartile-% 75 quartile) ile tanımlandı. Nitel değişkenlerde istatistik parametreleri n (%) olarak belirtildi. Nitel değişkenler arasındaki frekans dağılımı ilişkisi ise Chi-Square test ve exact test ile değerlendirildi. İki yöntemin bulguları arasındaki uyum iyiliği için kappa katsayısı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS versiyon 22 ve R 3.3.2 istatistik analiz programlarından yararlanıldı.

### BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 82 albicans dışı *Candida* türünün 54 (% 65,85)'si kan, 25 (% 30,49)'i idrar, 2 (% 2,44)'si yara ve 1 (% 1,22)'i ise kateter örneklerinden izole edildi. Örneklerin % 48,80'i erkek, % 51,20'si kadın hastalardan elde edildi ve erkek hastaların yaş ortalaması 59,77±27,49, kadın hastaların yaş ortalaması ise 55,55±25,40 olarak hesaplandı. İzolatların 62 (% 75,61)'si yoğun bakım ünitelerinden, 5 (% 6,10)'i hematoloji ve onkoloji kliniği ve 15 (% 18,29)'i ise diğer kliniklerden gönderilen örneklerden elde edildi.

BD Phoenix™Yeast ID Panel otomatize tanımlama yöntemiyle tanımlanan 82 albicans dışı *Candida* izolasyonunun tür dağılımı; *C. tropicalis* (n=26, % 31,7), *C. parapsilosis* (n= 25, % 30,5), *C. glabrata* kompleks (n=17, % 20,7), *C. kefyr* (n=4, % 4,9), *C. firmeteria* (n=4, % 4,9), *C. krusei* (n=3, % 3,7), *C. norvegensis* (n=2, % 2,4) ve *C. lambica* (n=1, % 1,2) olarak belirlendi (**Tablo 1**).

DNA dizi analizi altın standart yöntem olarak kabul edildiğinde; bu yöntemin tanımlama sonucu "doğru" olarak kabul edildi ve fenotipik tanımlama yönteminin

Tablo 1. BD Phoenix Otomatize sistemi ve DNA dizi analizi ile *Candida* türlerinin tanımlanması

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

doğruluğu ve yanlışlığı hesaplandı. Buna göre otomatik tanımlama sistemi ile *C. tropicalis* türlerinin % 80 (n=24)'i, *C. parapsilosis* kompleks türlerinin % 88 (n=22)'i ve *C. glabrata* kompleks türlerinin % 57,9 (n=11)'ü doğru tanımlanırken; seyrek izole edilen *C. kefyur* türünün % 60 (n=3)'ü ve *C. krusei* türünün % 33,3 (n=1)'ü doğru olarak tanımlandı (Tablo 2).

Moleküler yöntem referans alındığında, BD Phoenix™ Yeast ID Panel otomatize tanımlama yönteminin 82 albicans dışı *Candida* türünden 62 (% 75,61)'ini doğru tanımladığı değerlendirildi. Buna göre iki yöntem arasında uyum anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ,  $\kappa = 0,655$ ). BD Phoenix tanımlama sisteminin toplam doğruluk oranı 0,756 olarak hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 2. Yöntemlerin karşılaştırılmasında uyumlu olmayan sonuçlar

Moleküler Tanımlama Sistemi (DNA Dizi Analizi) Sonucu	BD Phoenix Otomatize Tanımlama Sistemi Sonucu
<b>Sık İzole Edilen Türler (n)</b>	
<i>C. glabrata</i> kompleks (n=8)	<i>C. firmetaria</i> (n=3)
	<i>C. norvegensis</i> (n=2)
	<i>C. parapsilosis</i> kompleks (n=3)
<i>C. tropicalis</i> (n=6)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=2)
	<i>C. krusei</i> (n=2)
	<i>C. firmetaria</i> (n=1)
	<i>C. kefyur</i> (n=1)
<i>C. parapsilosis</i> kompleks (n=3)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=2)
	<i>C. lambica</i> (n=1)
<b>Seyrek İzole Edilen Türler (n)</b>	
<i>C. kefyur</i> (n=2)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=1)
	<i>C. tropicalis</i> (n=1)
<i>C. krusei</i> (n=1)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=1)

Tablo 3. 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. kefyur</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. kefyur</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



İki tanımlama sistemi arasındaki uyuma göre, en sık izole edilen ilk üç tür (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. glabrata* kompleks) için % 77 (57/74); seyrek rastlanan diğer türler (*C. kefyr* ve *C. krusei*) için ise % 50 (4/8) olarak belirlendi ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ( $p=0,194$ ,  $X^2=2,768$ ).

Albicans dışı *Candida* izolatlarının EUCAST mikrodilüsyon yöntemi ile amfotersin B, flukonazol, itra-konazol ve vorikonazol için, 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen MİK aralığı, MİK<sub>90</sub>, MİK<sub>50</sub> ve geometrik ortalama (GM) değerleri hesaplandı (Tablo 4).

Mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerlerine göre; izolatların 6 (% 7,3)'sı amfoterisin B'ye (1 *C. glabrata* kompleks, 4 *C. parapsilosis* kompleks ve 1 *C. tropicalis* izolatı); 22 (% 26,8)'si flukonazole (7 *C. parapsilosis* kompleks, 6 *C. glabrata* kompleks ve 9 *C. tropicalis* izolatı); 16 (% 19,5)'sı itra-konazole (11 *C. tropicalis* ve 9 *C. parapsilosis* kompleks izolatı) ve 9 (% 10,9)'u vorikonazole (6 *C. tropicalis* izolatı ve 3 *C. parapsilosis* kompleks izolatı) dirençli bulundu. Ayrıca bu dirençli kökenler arasından 5 *C. parapsilosis*, 6 *C. tropicalis* ve 1 *C. glabrata* kompleks izolatının en az iki triazole çapraz dirençli (% 14,6) olduğu saptandı (Şekil 1).

## TARTIŞMA

Son on yılda NAC türlerine bağlı enfeksiyonlar, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda morbidite ve mortaliteye neden olması ve mevcut antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimi nedeniyle önem kazanmıştır (10,11). Bazı NAC türleri (*C. krusei* ve *C. lusitaniae*) iki veya üç antifungal ilaca karşı doğası gereği dirençlidir ve bu da tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlandırılmaktadır (11-13). *Candida* türleri arasında antifungal ajanlara duyarlılık farklılıkları göz önüne alındığında, tür düzeyinde doğru tanımlama, hızlı ve uygun tedavinin sağlanması açısından önemlidir (10,11). EUCAST veya CLSI rehberleri tarafından belirlenen antifungal duyarlılık sınır değerleri türe göre değişkenlik göstermektedir (8,14).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen albicans dışı *Candida* türlerinin DNA dizi analizi ile tanımlanması, sonuçların BD Phoenix 100 otomatik tanımlama sistemi ile karşılaştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

*Candida* türleri ve diğer maya mantarlarının tanımlanmasında genotipik yöntemler tercih edilmekle birlikte, rutin laboratuvarlarda morfoloji ve biyokimyasal temele dayanan fenotipik tanımlama yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyokimyasal analize dayalı birçok ticari sistemin cins ve tür düzeyinde tanımlama yetenekleri, kullandıkları substrat, veri tabanı

ve algoritma sayısı gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kolay uygulanabilirlik, hızlı sonuç verme ve maliyet etkinliği bu sistemlerin seçiminde rol oynamaktadır (15). Tanımlama amacıyla VITEK ve API 20C AUX fenotipik yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmada, mayalar en sık idrar (% 62,1), kan (% 13,6) ve trakeal aspirat (% 8,7) örneklerinden izole edilmiştir (16). Aynı çalışmada sıklık sırasına göre; *C. albicans* (% 53,3), *C. tropicalis* (% 14,5), *C. glabrata* (% 12,2), *C. parapsilosis* kompleks (% 6,5), *C. kefyr* (% 3,9) ve *C. krusei* (% 1,6) izole edilmiştir (16). Sida ve ark. kandidüriye neden olan etkenleri sırasıyla *C. tropicalis* (% 42,15), *C. albicans* (% 36,27), *C. guilliermondii* (% 13,72), *C. parapsilosis* (% 3,92) ve *C. krusei* (% 3,92) olarak bulmuşlardır (10). Bizim çalışmamızda da NAC türleri sıklıkla idrar ve kan örneklerinden izole edilmiştir. En sık tanımlanan ilk üç tür *C. tropicalis* (% 36,5), *C. parapsilosis* kompleks (% 30,5) ve *C. glabrata* kompleks (% 23,2) olmuştur. İzolatların elde edildiği hastaların yaş ortalaması  $57,61 \pm 26,36$  olup, çoğunluğunun kadın hastalar olduğu (% 51,20) belirlenmiştir. Benzer şekilde, Al-ruwaili ve ark. çalışmalarında NAC izolatlarını en sık kadın hastalardan izole etmişlerdir (17). Kandidüri için, kadın cinsiyet, nefrolitiazis, idrar yolu tıkanıklığı, taş varlığı ve benign prostat hiperplazisi predispozan faktörler olarak belirlenmiştir (18). *Candida* türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarında ise sıklık sırasına göre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleksi ve *C. glabrata* türleri izole edilmektedir (19). Bazı çalışmalarda ise kandideminin en sık nedenleri olarak *C. parapsilosis* kompleks ve *C. tropicalis* saptanmıştır (20,21). Seyoum ve ark. VITEK2 yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada en yaygın NAC türleri sırasıyla *C. krusei* (% 15,6), *C. famata* (% 14,4), *C. rugosa* (% 11,1) ve *C. lusitaniae* (% 10) bulunmuştur (22).

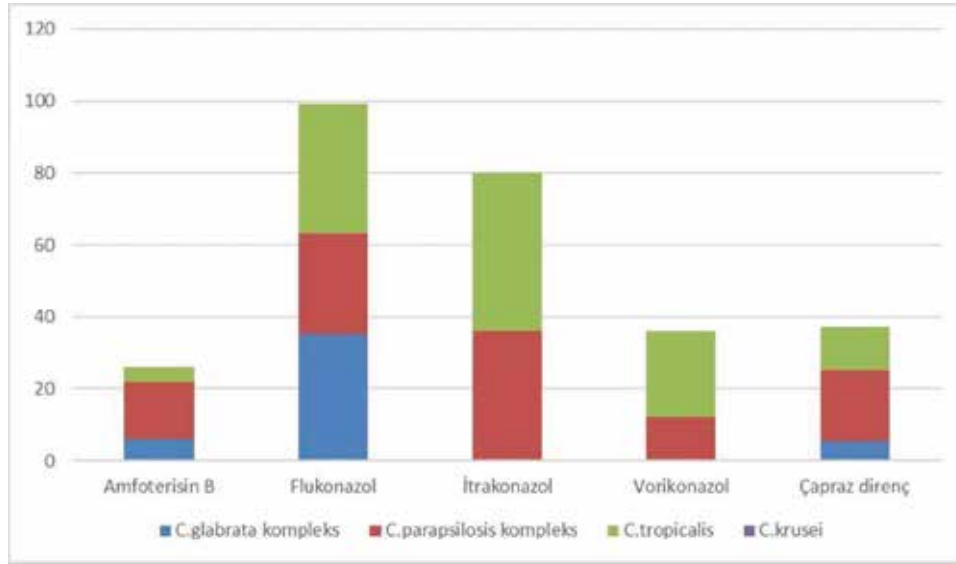
Kullanılan yöntemle ilgili olarak *C. albicans*'ın tanımlanmasında herhangi bir sorun yaşanmadığı ancak en sık yapılan yanlışlığın *C. parapsilosis* kompleksin tanımlanmasında olduğu bildirilmektedir (23). Çalışmamızda DNA dizi analizi referans test kabul edildiğinde, Phoenix maya paneli ile *C. parapsilosis* kompleks türlerinin % 88'i doğru tanımlanmıştır. Genel olarak *C. parapsilosis* türünün Kuveyt, Mısır ve Türkiye gibi ülkelerde en sık izole edilen ikinci NAC türü olduğu bildirilmektedir (24). Kuzey Amerika'da, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* kompleks NAC kaynaklı invazif kandidiyaz olgularında eşit oranda saptanmaktadır (25). Son zamanlarda çocuk ve intravenöz kateterli hastalarda, biyofilm oluşturma özelliği nedeniyle *C. parapsilosis* komplekse bağlı funge-mi gelişimi sık bildirilmektedir (26).

Gayibova ve ark. maya tanımlamasında Phoenix Yeast ID Panel sistem ile API ID32C ticari sistemini karşılaştırdıkları çalışmada, yaygın olarak izole edilen

Tablo 4. *Candida* izolatlarının, amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> ve GM değerleri

<i>Candida</i> Türü İzolot Sayısı (n)	Amfoterisin B				Flukonazol				İtrakonazol				Vorikonazol			
	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)	GM (µg/ml)	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)	GM (µg/ml)	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)	GM (µg/ml)	MİK Aralığı (µg/ml)	MİK <sub>50</sub> (µg/ml)	MİK <sub>90</sub> (µg/ml)	GM (µg/ml)
<i>C. tropicalis</i> (n=30)	0,0625-2	0,375	0,5	0,4892	0,0312-32	4	16	2,5666	0,0156-1	0,125	0,5	0,1436	0,0156-1	0,0625	0,5	0,1058
<i>C. parapsilosis</i> kompleks (n=25)	0,0625-8	0,25	1	0,6597	0,5-32	4	16	2,639	0,0156-4	0,125	0,5	0,0973	0,0156-1	0,0625	0,5	0,0642
<i>C. glabrata</i> kompleks (n=19)	0,0156-1	0,125	0,5	0,5651	0,25-128	16	32	8	0,0156-8	0,0625	0,125	0,1803	0,0156-4	0,0625	0,75	0,1731
<i>C. krusei</i> (n=3)	0,0312-0,5	0,25	0,5	0,2971	16-128	64	-	9,5136	0,0625-1	0,25	1	0,2102	0,0312-1	0,0625	4	0,0312
<i>C. kefyr</i> (n=5)	0,25-1	-	0,5	0,594	0,25-4	1,43	-	0,840	0,0156-0,25	0,089	-	0,0525	0,0156-1	0,0156	-	0,0441

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; MİK<sub>50</sub>: Mikroorganizma üremesini 50% oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon;MİK<sub>90</sub>: Mikroorganizma üremesini 90% oranında inhibe eden minimum inhibitör konsantrasyon, GM: Geometric mean



Şekil 1. Albicans olmayan *Candida* türlerinin antifungallere direnç oranları (%)

türlerde (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. kefyr*) % 81, nadir izole türlerde ise (*C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. inconspicua/C. norvegensis*, *C. catenulata*) % 38,7 oranında uyum bulunmuştur (15). Çalışmamızda BD Phoenix 100 tanımlama sisteminin 82 örnekten 62 (% 75,61)'sini doğru tanımladığı belirlenmiştir. Ayrıca iki tanımlama sistemi arasındaki uyum, en sık izole edilen ilk üç tür (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kompleks, *C. glabrata*) için % 77 (57/74) iken, bu oran seyrek rastlanan türler (*C. kefyr* ve *C. krusei*) için % 50 (4/8) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, Erdem ve ark. nın çalışmasında, 276 *Candida* türünün tanımlanmasında DNA dizi analizi referans yöntem kabul edilerek, Phoenix otomatize sistem, mısır unu-tween 80 agarda morfoloji, ID32C maya tanımlama sistemi ve MALDI-TOF yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada, *Candida* türlerinin 41 (% 56)'nin her üç yöntemle de doğru olarak tanımlandığı belirlenmiştir. DNA dizi analizi ve Phoenix otomatize sistem ile tanımlanan 27 izolattan 14 (% 52)'ünün Phoenix sistemi ile, 16 (% 59)'ünün mısır unu-tween 80 agar morfoloji yöntemi ile, 22 (% 81)'sinin MALDI-TOF ile ve 21 (% 78)'inin ise ID32C yöntemi ile doğru tanımlandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada MALDI-TOF yönteminin cihaz maliyeti hariç tutulduğunda daha maliyet etkin olduğu belirlenmiştir (23).

Çalışmamızda fenotipik yöntem ile *C. firmetaria* olarak tanımlanan 4 izolattan 3'ü *C. glabrata* kompleks, 1 izolat ise *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Yine 6 *C. glabrata* kompleks izolatının DNA dizi analizi ile 2'sinin *C. tropicalis*, birinin *C. parapsilosis* kompleks, birinin *C. metapsilosis* (*C. parapsilosis* kompleks), birinin *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyr* telemorfu) ve birinin de *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei* telemorfu) olduğu

belirlenmiştir. Ayrıca *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanan 3 izolatın tamamı *C. glabrata* kompleks, *C. krusei* olarak tanımlanan 2 izolat ise *C. tropicalis* olarak saptanmıştır.

Nadir izole edilen *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar giderek yaygınlaşırken, bu türlerin sadece geleneksel tanı yöntemleri ile tanımlanmasının zor olacağı anlaşılmaktadır (7). Çalışmamızda, mantar rDNA'sının 5.8S bölümünde ITS genini amplifiye etmek için ITS1 ve ITS4 bölgeleri çoğaltılmıştır (27). Fujita ve ark.'nın çalışmalarına göre *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinin ITS1 ve ITS2 bölgelerine göre ayırt edilemediği ve karışık flora içeren örneklerden mantarların doğrudan tanımlanmasında sorunlar yaşandığı bildirilmiştir (28). Charsizadeh ve ark. klinik olarak yakından ilişkili mayaları ayırt etmek için PCR/RFLP yöntemini başarıyla kullanmıştır. Bu çalışmada, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin amplifikasyonundan sonra, 16 maya türünün tümü, MwoI ve BslI restriksiyon enzimleri kullanılarak fragman analizi yapılmıştır (26). Ayrıca ITS-1, ITS-3 ve ITS-4 primerleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada üç *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. parapsilosis* kompleks ve *C. tropicalis*) birbirlerinden tam olarak ayırt edilemediği görülmüş ve PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Aynı çalışmada, *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması için CHROMagar *Candida* besiyeri ve API ID 32C kiti birlikte değerlendirildiğinde, moleküler yöntemlerle elde edilen sonuçlar % 100 uyumlu bulunmuştur (29).

*Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlarda uzun süreli ve türe özgü olmayan antifungallerin kullanılması direnç problemlerini de beraberinde getirmiştir (30). Antifungallerin artan kullanımı, mantar suşları üzerinde seçici bir baskı yaratmış, bazı suşlar ikincil direnç

geliştirmiş ve duyarlı izolatların yerini dirençli suşlar almıştır. Bu durum, mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisini de değiştirmiştir (31).

Efkey ve ark. yaptıkları çalışmada *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* türlerine en etkili (% 98,4) antifungalın amphotersin B olduğunu bildirmişlerdir (32). Çalışmamızda amfoterisin B'ye direnç sadece 6 (% 7,3) izolatta saptanmıştır. Hasan ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada, 100 *Candida* izolatının hiçbirinde amfoterisin B direncine rastlanmamıştır (33). Atalay ve ark. ise yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer MİK değerlerini elde etmişlerdir. Ancak çalışmamızdan farklı olarak *C. parapsilosis* kompleks türlerinde MİK90 değerleri daha düşük bulunmuştur (34). *C. parapsilosis* kompleks, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* ve *C. haemulonii* türlerinde amfoterisin B'ye sonradan direnç geliştiği bildirilmektedir (31). *C. tropicalis* türlerinde amfoterisin B direnç oranları Santhanam ve ark., (35) ile Schmalreck ve ark. (36) tarafından sırasıyla % 6,7 ve % 26,08 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda 1 *C. tropicalis* (MİK aralığı: 0,0625-2 µg/mL) ve 4 (% 16) *C. parapsilosis* kompleks türünde amfoterisin B'ye direnç (MİK aralığı 0,0156-1 mg/L) saptanmıştır.

Son zamanlarda klinik örneklerden *C. glabrata* kompleksin sık saptanmasında flukonazolün sık kullanımının bir etken olduğu ileri sürülmüştür (37). Bir araştırmaya göre flukonazol direnci üç yıl içinde % 7'den % 12'ye çıkmıştır (38). Çalışmamızda flukonazol direnç oranı % 23,1 olup, 7'si *C. parapsilosis* kompleks, 6'sı *C. glabrata* kompleks ve 9'u *C. tropicalis* türlerinde saptanmıştır. *C. tropicalis* türleri için flukonazol direncini Sadeghi ve ark. % 14,3 (37), Yang ve ark. % 27,8 (39), Katsuragi ve ark., % 36,4 (40) olarak bildirmişlerdir. Bir diğer azol olan itrakonazol için yapılan antifungal duyarlılık çalışmalarında; Santhanam ve ark. (35) *C. tropicalis* suşlarında itrakonazole direncini % 13,3 ve Yang ve ark. (39) % 38,9 olarak bildirmiştir. Çıkman ve ark. (41) ise *C. tropicalis* suşlarının tamamını itrakonazole dirençli bulmuşlardır. Çalışmamızda itrakonazol direnci % 19,5 (11 *C. tropicalis* ve 9 *C. parapsilosis* kompleks izolatı) olarak saptanmıştır. Vorikonazol, flukonazolden türetilmiş bir triazol olup, geniş spektrumlu bir azol olarak kullanılmaktadır (42). Johnson ve ark. yaptıkları çalışmada *Candida* izolatlarının % 9,3'ünde vorikonazole direnç bulunmuştur (43). Çalışmamızda benzer şekilde vorikonazol direnci % 10,9 (*C. tropicalis*; n=6 ve *C. parapsilosis* kompleks; n=3) olarak bulunmuştur. Ayrıca bazı izolatlarda birden fazla azol türüne karşı direnç tespit edilmektedir. İzolatlarımızdan *C. parapsilosis* kompleks (n=5), *C. tropicalis* (n=6) ve *C. glabrata* (n=1)'nin en az iki triazole (% 14,6) çapraz direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalış-

maya göre vorikonazol direnci (% 18,26) flukonazole (% 14,61) göre daha yüksek bulunmuş ve çapraz direnç %8,2 olarak saptanmıştır (44).

Sonuç olarak moleküler tanımlama yöntemlerinin yapılamadığı laboratuvarlarda ticari fenotipik tanımlama yöntemleri ile lam kültürü gibi morfolojik inceleme yöntemlerinin birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca mevcut rehberlere göre; antifungal duyarlılık testi olarak önerilen mikrodilüsyon yöntemleri zaman alıcı ve zahmetli olmasına rağmen, alternatif olarak agar difüzyonuna veya kolorimetrik göstergelerin kullanımına dayalı, bazıları antifungal duyarlılık testi olarak da kullanılabilen çeşitli otomatik veya yarı otomatik ticari yöntemler bulunmaktadır.

**Teşekkür:** Çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2020/4-1 YLS numarası ile desteklenmiştir.

**Çıkar Çatışması ve Finansman Beyanı:** Yazarlar aralarında çıkar çatışması olmadığını beyan ederler. Bu makale için hiçbir yazar tarafından finansal destek alınmamıştır.

**Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti:** Yazarlar çalışmaya eşit katkı sunmuş olduklarını beyan ederler.

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Etik Kurulu'nun 03.04.2020 tarih ve 2020/05-38 sayılı kararıyla onay alınmış olup, bu makale Hulusi Güven'in tezinden derlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Karabıçak N, Alem N. *Candida* Türlerinin Triazol Antifungal Duyarlılık Profilleri: Antifungal Direncin Belirlenmesinde Yeni CLSI Türe Özgü Klinik Direnç Sınır Değerleri ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin Uygulanması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2016;50(1):122- 132.
2. Hazırolan G. *Albicans*-Dışı *Candida* Türlerinin Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazole in vitro Duyarlılığının Referans Sıvı Mikrodilüsyon Yöntem ile Araştırılması: Yeni Türe Özgü Klinik Direnç Sınır Değerleri ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin Uygulanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2018;48(1):38- 44.
3. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*. 2017;12:2173.
4. Gülmez D, Ayçık ÖD, Akdağlı SA. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında önceki ile karşılaştırmalı olarak yeni CLSI direnç sınır değerlerinin triazol duyarlılık kategorilerinin belirlenmesine etkisi. 1. Ulusal Tıbbi Mikrobiyoloji Kongresi, 24-26 Eylül 2016, Ankara. Kongre Kitabı;78-79.



5. Karabıçak N, Altun Uludağ H, Karatuna O, Hazırolan G, Aksu N, Adiloğlu A, Akyar I. Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Maya Türlerinin Tanımlanmasında Sık Kullanılan Ticari Sistemlerin Değerlendirilmesi: Çok Merkezli Bir Çalışma. Mikrobiyoloji Bülteni. 2015;49(2):210-220.
6. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. J Clin Microbiol. 2018;56 (5): e01909-17. doi: 10.1128/JCM.01909-17.
7. Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H. Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. J Med Microbiol. 2017;66(2):126-133. doi: 10.1099/jmm.0.000426.
8. EUCAST Definitive Document E.Def 7.3.2. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts [Online] 2020 [Cited 2022 June 10]. Available from: URL: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_7.3.2\\_Yeast\\_testing\\_definitive\\_revised\\_2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7.3.2_Yeast_testing_definitive_revised_2020.pdf).
9. Zhang D, Lu X, Liao Y, Xia Z, Peng Z, Yang X, et al. Rapid and Simple Detection of Trichosporon asahii by Optimized Colony PCR. Biomed Res Int. 2019; 14: 1803278.
10. Sida H, Pethani J, Dalal P, Hiral SH. Study of Changing Trend in the Clinical Distribution of Candida Species in Various Clinical Samples at Tertiary Care Hospital, Ahmedabad, Gujarat. Ntl J Community Med. 2017;8:109-111.
11. Mohammadi R, Mirhendi H, Matehkolaei AR, Ghahri M, Mohammad RS, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of Candida species isolated from Iranian patients, Medical Mycology. 2013; 51(6):657-63.
12. Zirkel J, Klinker H, Kuhn A, Abele-Horn M, Tappe D, Turnwald D, et al. Epidemiology of Candida blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors, Med Mycol. 2012;50:50-55.
13. Agwu E, Ihongbe JC, McManus BA, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Distribution of yeast species associated with oral lesions in HIV-infected patients in Southwest Uganda, Med Mycol.2011;50:276-80.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. CLSI Document M27-S4.USA: CLSI, Wayne; 2012.
15. Gayibova Ü, Dalyan Cılo B, Ağca H, Ener B. Klinik örneklerden izole edilen Candida türlerinin tanımlanmasında Phoenix™ Yeast ID Panel ile API®ID 32C ticari sistemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2014;48(3):438-448.
16. Yücesoy M. Candida türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 3-6 Mayıs, 2005, Konya, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 49, 2005:46-58.
17. Al-ruwaili M, Khalil OM, Saad MF. Molecular Identification of Candida Species Isolated from Different Clinical Specimens at Al Jouf Area, Saudi Arabia. Pak J Med Health Sci. 2018;12;(2):862-864.
18. Gharaghani M, Taghipour S, Halvaezadeh M, Mahmoudabadi AZ. Candiduria; a review article with specific data from Iran. Turk J Urol. 2018;44(6):445-452. doi: 10.5152/tud.2018.54069.
19. Ozhak-Baysan B, Ogunc D, Colak D, Ongut G, Donmez L, Vural T, et al. Distribution and antifungal susceptibility of Candida species causing nosocomial candiduria. Medical Mycology. 2012;50(5):529-532.
20. Yang ZT, Wu L, Liu XY, Zhou M, Li J, Wu JY, et al, Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial Candida spp. Bloodstream infection in Shanghai. BMC Infectious Disease. 2014;14:241.
21. Çalışkan E, Dede A, Güven GB. Kan kültürlerinde saptanan Candida türlerinin Dağılımı ve Antifungal duyarlılıkları. AM-KEM Derg. 2013; 27 (1): 25-30.
22. Seyoum, E., Bitew, A. & Mihret, A. Distribution of Candida albicans and non-albicans Candida species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. BMC Infect Dis. 2020;20:231. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4883-5>.
23. Erdem H. Candida Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2017; 47 (3): 114-24.
24. Ghazi S, Rafei R, Osman M, El Safadi D, Mallat H, Papon N, et al. The epidemiology of Candida species in the Middle East and North Africa, Journal de Mycologie Médicale. 2019; 29(3): 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.07.006>.
25. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. Candida parapsilosis: from Genes to the Bedside. Clin Microbiol Rev. 2019;32(2): e00111-18. doi: 10.1128/CMR.00111-18.
26. Charsizadeh A, Mirhendi H, Nikmanesh B, Eshaghi H, Makimura K. Microbial epidemiology of candidaemia in neonatal and paediatric intensive care units at the Children's Medical Center, Tehran. Mycoses. 2018;61:22-29.
27. Abbasi Nejat Z, Farahyar S, Falahati M, Ashrafi Khozani M, Hosseini AF, Faiazy A, et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Pattern of Non-albicans Candida Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. Iranian Biomedical Journal. 2017;22(1);33-41.
28. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol 2001;39(10):3617-3622.
29. Sahiner F, Ergünay K, Ozyurt M, Ardic N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen Candida suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. Mikrobiyoloji Bülteni. 2011;45(3):478-88.
30. Badiee P, Badali H, Boekhout T, Diba K, Moghadam AG, Hos-saini Nasab A, et al. Antifungal susceptibility testing of Candida species isolated from the immunocompromised patients admitted to university hospitals in Iran: comparison of colonizing and infecting isolates. BMC Infectious Diseases. 2017;17:727.
31. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: Clinical and laboratory correlations in medical mycology. Rev Inst Med Trop. 2015; 57(19):57-64.
32. ElFeky DS, Gohar NM, El-Seidi EA, Ezzat MM, AboElew SH. Species identification and antifungal susceptibility pattern of Candida isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. Alexandria Journal of Medicine. 2015:269-277.
33. Hassan AB. Yoğun Bakım Hastalarının İdrar Kültüründen İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. T.C. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep. Yüksek Lisans Tezi; 2018:58-65.
34. Atalay MA, Koç AN, Sav H, Demir G. Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen Candida türleri ve antifungal duyarlılıkları. Turk Hij Den Biyol Derg. 2013;70:185.

35. Santhanam J, Yahaya N, Aziz MN. Species Distribution and Antifungal Susceptibility patterns of *Candida* species: is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med J Malaysia*. 2013;68(4):343-7.
36. Schmalreck AF, Willinger B, Haase G, Blum G, Lass-Flörl C, Fegeler W, et al. Species and Susceptibility Distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses*. 2012;55:124-137.
37. Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J Mycol Med*. 2018;28(1):51-58. doi: 10.1016/j.myc-med.2017.12.008. Epub 2018 Feb 1.
38. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselev AV, 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*. 2005;43(12):5848-5859.
39. Yang ZT, Wu L, Liu XY, Zhou M, Li J, Wu JY, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. Bloodstream infection in Shanghai. *BMC infectious Disease*. 2014;14:241.
40. Katsuragi S, Sata M, Kobayashi Y. Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates at One Institution. *Medical Mycology Journal*. 2014;55(1):1-7.
41. Çıkman A, Parlak M, Ceylan MR, Güdücüoğlu H, Berktaş M. Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* ların Tür Dağılımı ve Antifungal Direnci. *Van Tıp Dergisi*. 2014;21(1):1-5.
42. Lei J, Xu J, Wang T. In vitro susceptibility of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole and voriconazole and the correlation between triazoles susceptibility: Results from a five-year study. *J Mycol Med*. 2018;28(2):310-313. doi: 10.1016/j.myc-med.2018.03.005. PMID: 29685520.
43. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekeley A, Hockey H, Troke P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32:511-514.
44. Tasneem U, Siddiqui MT, Faryal R, Shah AA. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species in a tertiary care hospital in Islamabad, Pakistan. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(7):986-991.