



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KANAL TEDAVİSİ YAPILAN HASTALARDA İZOLE EDİLEN
CANDIDALARIN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ
VE AZOL DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. ZAHİDE TOPAKTAŞ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nizami DURAN**

HATAY – 2019

**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**KANAL TEDAVİSİ YAPILAN HASTALARDA İZOLE EDİLEN
CANDIDALARIN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ
VE AZOL DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. ZAHİDE TOPAKTAŞ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY – 2019

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18.U.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KANAL TEDAVİSİ YAPILAN HASTALARDA İZOLE EDİLEN
CANDIDALARIN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ
VE AZOL DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. ZAHİDE TOPAKTAŞ

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Nizami DURAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Nizami DURAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Nizami DURAN.....
2. Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN.....
3. Prof. Dr. Fatih KÖKSAL.....

III. İÇİNDEKİLER

III. İÇİNDEKİLER	III
IV.TABLO LİSTESİ.....	V
V.ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
VI. RESİM LİSTESİ.....	VII
VII. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	VIII
VIII. TEŞEKKÜR	IX
IX. ÖZET	X
X.ABSTRACT	XII
1.GİRİŞ VEAMAÇ	1
2.GENELBİLGİLER	5
2.1.Candidaların Genel Özellikleri.....	5
2.2.Patojenite	6
2.3.Candida Biyofilm Oluşumu	9
2.4.Epidemiyoloji	12
2.5. Antifungal Ajanlar	15
2.5.1.Antifungal Direnci Etkileyen Faktörler.....	16
2.5.2. Antifungal Direncin Değerlendirilmesi	17
2.6. Azol Direnci	18
2.7. Ekinokandin Direnci	19
2.8. Polyen Direnci	20
2.9.Yeni Antifungal Stratejiler.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araç ve Gereçler.....	23
3.2.Kimyasal Maddeler	23
3.3.Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon.....	24
3.4.Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	25
3.4.1. Sabouraud Dekstroz Agar	25
3.4.2.Sabouraud %2 Dextrose Broth	25
3.4.3.Gliserollü brain-heart infüzyon broth.....	25
3.5.Genomik DNA ekstraksiyonu	26
3.6.PCR Amplifikasyonu.....	26
3.7. Azol Direncinin Belirlenmesi	27
3.8. PCR Amplifikasyonu.....	28

3.9.PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi	28
3.10. Restriction Fragment Length Polymorphism	29
3.10.1. Msp I ile Restriksiyon Enzim Analizi	30
3.10.2.Kesim Ürünlerinin Analizi	30
3.11.İstatiksel Analiz	30
4.BULGULAR	31
5.TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
7.KAYNAKLAR.....	63
8.ÖZGEÇMİŞ	88
9.ETİK KURUL92.....	89



IV. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. ITS1 ve ITS4 primerleri	27
Tablo 2. Termal döngüamplifikasyon döngüsü	27
Tablo 3. Kullanılan virülans markır ve azol direnç genleri	28
Tablo 4. Kesim Karışımı (<i>Msp</i> I).....	30
Tablo 5. Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen türlerde HWP1 gen frekansının cinsiyete göre dağılımı	40
Tablo 6. Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen türlerde HWP-1 virülans geni frekansı	40
Tablo 7. Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen 124 örneğin mikrodilüsyon antifungal duyarlılık sonuçları.	41

V. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kontrol grubunun cinsiyet dağılımı.....	31
Şekil 2. Kontrol ve hasta grubunun cinsiyet oranları	31
Şekil 3. Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan fragment analizi sonucu Candidaların tür dağılımı.	33
Şekil 4. Kontrol grubunda Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan fragment analizi sonucu Candidaların tür dağılımı	34
Şekil 5. Hasta grubu ile kontrol grubunda HWP1 ve ERG11 direnç geni varlığı	35
Şekil 6. <i>Candida albicans</i> türlerinde antifungal ilaç direnç oranları	36
Şekil 7. <i>Candida glabrata</i> türlerinde antifungal ilaç direnç oranları.....	37
Şekil 8. <i>Candida parapsilosis</i> türlerinde antifungal ilaç direnç oranları.....	38
Şekil 9. Hasta örneklerinden izole edilen <i>Candida</i> türlerinde HWP-1 geni varlığının türlerine göre dağılımı.....	39

VI. RESİM LİSTESİ

Resim1. PCR Cihazı (Techne Flexigene™, İngiltere)	27
Resim 2. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez ünitesi(Wealtec, Elite 300 Plus,ABD)	29
Resim 3. Jel elektroforez sonrası PCR ürünleri görüntüleme cihazı (Wealtec Dolphin-View, ABD, UV Transillumunator)	29
Resim 4 Candidalarda ITS1-ITS4 primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri	32
Resim5. <i>Msp</i> I restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli <i>Candida</i> türlerinin kesim görüntüsü. 1000 bp DNA Ladder (1,16), <i>C. albicans</i> (2,3,5,7,8,9,10,11,13,15), <i>C. parapsilosis</i> (12), <i>Candida spp.</i> (6).	32

VII. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
AIDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
Bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
gr	: Gram
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NAC	: Non-albicans Candida
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Kesim Parçası Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Rotation per minute (dakikadaki tur sayısı)
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
sn	: Saniye
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
HWP1	: Hifal Duvar Proteini 1
°C	: Santigrat derece
cc	: Cubic centimeter
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
PID	: Pelvik İnflamatuvar Hastalık
CSH	: Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği
CADS	: <i>Candida albicans</i> 'ın protez stomatit
RIA	: İntrauterin Cihaz

VIII. TEŞEKKÜR

Gerek asistanlık sürecinde gerekse araştırma çalışmam boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini paylaşan, tez danışmanım Prof. Dr. Nizami DURAN'a,

Asistanlık eğitimim süresince bana her türlü desteği veren, benimle bilgi ve deneyimlerini sürekli paylaşan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER'e

Deneyimleriyle bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Özlem Makbule KAYA'ya teşekkür ederim.

MKÜ Merkez Laboratuvarında beraber mesai paylaştığım, her türlü bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Sayın Süreyya EZER, Sayın Dilek BİLGİN , Sayın Sema ARSLAN'a ve Sayın Hayat ASLAN MULLAOĞLU başta olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına,

Tezimin çalışması sırasında sürekli yardımını esirgemeyen Sayın Funda ÇİMEN AÇIKGÜL, Sayın Emrah AY ve Sayın Mücella BAYIRLI'ya

Uzmanlık eğitimim süresi boyunca birbirimize destek olup sırt sırta verdiğimiz Dr. Sezin Çolak HALLUM'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her şartta yanımda olan üzerimde sonsuz emekleri bulunan canım Annem, Babama ve Kıymetli Eşime ve gözlerimin nuru çocuklarıma çok teşekkür eder, minnettarlığımı sunarım.

Dr. Zahide TOPAKTAŞ
Hatay / 2019

IX. ÖZET

Giriş ve Amaç: Endodontik enfeksiyonlarda *Candida* türlerinin frekansı konusunda çok sayıda çalışmaya rastlanabilse de endodontik bir patojen olarak *Candida* türlerinin rolü hala tartışmalıdır. Biz bu çalışmamızda kök kanal tedavisi yapılan hastalardan izole edilen *Candida* izolatlarının genotiplendirmesini ve ilaç direnç profillerini belirlemeyi amaçladık.

Yöntem: Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Araştırma ve Eğitim Hastanesi Endodonti polikliniğinde kanal tedavisi gören hastalardan alınan tükürük numunelerinden izole edilen toplam 144 *Candida* suşu ile kök-kanal tedavisi öyküsü olmayan 47 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi. *Candida* izolatlarının tür düzeyinde tayini için PCR RFLP yöntemi kullanıldı. İzole edilen suşların antifungal duyarlılıkları ise otomatize kültür sistemi kullanılarak değerlendirildi. Çalışmada azol direnç geni *ERG 11* geninden polimorfizm ve *HWP1* virulans geni varlığı da PCR yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Çalışmada izolatların büyük çoğunluğunun *C.albicans* (%61.8; 89/144) olduğu tespit edilmiştir. İkinci sıklıkta izole edilen suşların ise %11.8'lik oranla *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* olduğu bulunmuştur. *C.albicans* türleri arasında en yüksek direncin azol grubu ilaçlardan flukanazole karşı (%5.6) görüldüğü saptanmıştır. *Candida glabrata* izolatlarında flusitozin direncinin %17.6 olduğu tespit edilirken, mikafungin ve amfoterisin B'ye karşı *C.glabrata* kökenlerinin %5.8'sinin dirençli olduğu tespit edilmiştir. *C. parapsilosis* kökenlerinde ise en yüksek direncin amfoterisin B (%29.4)'ye karşı görüldüğü tespit edilirken, ikinci sırada yüksek direncin flukanazole karşı (%5.8) geliştiği saptanmıştır. *C.albicans* kökenlerinde flusitozin direnci tespit edilmemiştir. Hasta grubunda *HWP1* geni frekansı %43 olarak bulunurken, sağlıklı kontrol grubundan izole edilen *Candida* kökenlerinde *HWP1* geni frekansının %26 oldu tespit edilmiştir. *HWP 1* geni varlığı açısından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Sağlıklı kontrol grubunda azol direncinden sorumlu olduğu bilinen *ERG 11* geninde herhangi bir mutasyon saptanmazken, hasta grubunda *ERG 11* geni mutasyon frekansının %22 olduğu tespit edilmiştir. *ERG 11* geni frekansı bakımından hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında da istatistiksel açıdan anlamlı derecede farkın olduğu görülmektedir ($p<0.001$).

Sonuçlar: Çalışmada izole edilen *Candida* tür dağılımı incelendiğinde *C.albicans*'ın %61.8'lik oranla en sık izole edilen köken olduğu belirlenirken, bu türü, *Candida.spp*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* nin takip ettiği saptanmıştır.*C.albicans* kökenlerinde flukanazol ilaç direnci ile *C.glabrata* kökenlerinde flusitozin (%17.6) ilaç direnci dikkat çekici oranlarda tespit edilmiştir. Son yıllarda, dünyadaki birçok ülke *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde bir değişime tanık olmuş, bu durum *C. albicans* baskınlığından *albicans* dışı türlere doğru ilerleyen bir kayma ile karakterize edilmiştir. Söz konusu suşların en sık kullanılan azol grubu ilaçlara doğal dirençli olabilmesi ya da duyarlı olarak bilinen kökenlerde artan ilaç direncinin önüne geçebilmek ve için etkenlerin hızlı ve

güvenilir yöntemlerle identifikasyon ve antifungal duyarlılık testlerinin yapılması büyük öneme sahiptir.

Anahtar kelimeler: Kök-kanal infeksiyonu, endodonti, *Candida*, infeksiyon, PCR-RFLP, ilaç, direnç.



X.ABSTRACT

Introduction and Aim: Although there are many studies on the frequency of *Candida* species in endodontic infections, the role of *Candida* species as an endodontic pathogen remains controversial. In this study, we aimed to determine genotyping and drug resistance profiles of *Candida* isolates isolated from patients receiving root canal treatment.

Materials&Methods: This study was carried out at Hatay Mustafa Kemal University Medical Faculty Department of Medical Microbiology. A total of 144 *Candida* strains isolated from saliva samples taken from patients undergoing root canal treatment in Endodontic outpatient clinic of Hatay Mustafa Kemal University Dentistry Research and Training Hospital and 47 healthy volunteers without a history of root canal treatment were included in the study. PCR RFLP method was used for determination of *Candida* isolates at species level. Antifungal susceptibility of isolated strains was evaluated by automated culture system. Polymorphism from the *erg 11* gene, which is the azole resistance gene, and the presence of the HWP1 virulence gene were also determined by PCR.

Results: The majority of isolates were *C.albicans* (61.8%; 89/144). The second most frequently isolated strains were *C.parapsilosis* and *C. glabrata* with a rate of 11.8%. Among the *C.albicans* species, the highest resistance was observed against fluconazole (5.6%) among azole group drugs. It was determined that flucytosine resistance was 17.6% in *Candida glabrata* isolates and 5.8% of *C. glabrata* strains were resistant to micafungin and amphotericin B. Among the *parapsilosis* strains, the highest resistance was found against amphotericin B (29.4%), while the second highest resistance was found against fluconazole (5.8%). No flucytosine resistance was detected in *C.albicans* strains. While the frequency of HWP1 gene was 43% in the patient group, it was found that the frequency of HWP1 gene was 26% in *Candida* strains isolated from healthy control group. There was a statistically significant difference between the patient group and the healthy control group in terms of the presence of HWP 1 gene ($p < 0.01$). While no mutation was detected in the *ERG 11* gene which is known to be responsible for azole resistance in the healthy control group, the mutation frequency of the *ERG 11* gene was 22% in the patient group. There was also a statistically significant difference between the patient and healthy controls in terms of the frequency of *ERG 11* gene ($p < 0.001$).

Conclusions: In the study, when isolated *Candida* species distribution was examined; *C.albicans* was determined to be the most commonly isolated strain with a.8%, followed by *Candida* spp, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Fluconazole drug resistance in *C.albicans* strains and flucytosine (6) drug resistance in *C. glabrata* strains were determined at remarkable rates. In recent years, many countries around the world have undergone a change in the epidemiology of *Candida* infections. It was characterized by a shift from *C. albicans* dominance to non-*albicans* species as the etiological agent. The identification of *Candida* strains with rapid and reliable methods and antifungal susceptibility tests are of great importance in order to detect natural resistant *Candida* strains to azole group drugs or to prevent increased drug resistance in known strains.

Key words: Root-canal infection, endodontics, Candida, infection, PCR-RFLP, drug, resistance.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türü mantarlar sağlıklı asemptomatik bireylerin en az %80'inde oral flora da kommensal olarak bulunmakta olup, bu prevalans oranı çocuklarda, genç erişkinlerde ve hastanede yatırılarak takip edilen hasta gruplarında daha yüksek olabilmektedir(1). Kommensal olan bu mikroorganizmalar, konağa ait oral kavitede diş ve diş eti yapısında oluşan bir dizi karmaşık predispozan faktörlerin etkisi ile savunma mekanizmalarındaki zaaf ve kolonize kandida suşunun sahip olduğu virülans faktörlerine bağlı olarak patojen hale dönerek, kök kanal infeksiyonlarına sebep olurlar. Oral kavitedeki kandida enfeksiyonları sıklıkla lokalize ve yüzeysel olmakla beraber, özellikle doğal ve kazanılmış immün sistemi baskılanmış hastalarda sistemik, invaziv Candidiyasis'e de dönüşebilir(2,3). Sağlıklı ve immunsistemi baskılanmış hastalardaki kandidanın kolonizasyon sıklığını tespit amacı ile yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, sağlıklı bireylerde *C.albicans*'ın ağız boşluğunda izolasyon sıklığının %30-45 arasında değiştiği bildirilirken, bu oranın HIV ile infekte immunsuprese konaklarda %95'lere kadar yükseldiği gösterilmiştir(4).

Kandida türleri vücudun farklı bölgelerinde kolonize olabilen bu mikroorganizmalar olup özellikle ağız boşluğu, sindirim sistemi ve ürogenital sistemin mukozal yüzeyleri doğal yerleşim alanlarıdır. Gastrointestinal sistem genelinde en yaygın ve sık izole edilen türler; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata*'dır (5) Ancak yapılan çok sayıdaki çalışmada sağlıklı ağız boşluğu florasında en sık kolonize olan türlerin; *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.inconspicua*, *C.dublinskiensis* ve *C.tropicalis* olduğu, diğer bazı türlerinde ağız infeksiyonlarından izole edildiği bildirilmektedir(6).

Oral kavitedeki kandida enfeksiyonları; psödomembranöz, eritömatous ve kronik hiperplastik olmak üzere üç klinik tablo ile karakterize edilebilir. Ancak protez stomatit, anguler cheilit, median rhomboid glossit ve lineer diş eti eritemi gibi diş eti patolojileri de kandida ile ilişkili lezyonlarla birlikte tanımlanmaktadır(2).

Diş hastalıkları insanların yaklaşık olarak %90'ını etkileyen, bütün yaş gruplarında görülmesi halinde hayat kalitesini düşüren, tedavi edilmedikleri takdirde oral kavite dışında menenjit gibi mortal seyreden sistemik enfeksiyonlara yol açabilme potansiyeli olan önemli bir sağlık problemidir (7). Bu bağlamda en sık karşılaşılan klinik yakınma olan diş çürükleri, önlenemez, kronik ve çok faktörlü oral patolojilerdir (8).

Çürük gelişimi, fermente olabilen karbonhidratlar açısından zengin diyet, kötü oral hijyen ve kavitede kariyojenik mikroorganizmaların varlığı gibi konağa ait bazı yapıcı faktörlerin varlığına bağlıdır. Diş üzerindeki asit üreten mikroorganizmaların aşırı çoğalması sonucu kandida türlerinin dahil olduğu miks floralı çok spesifik son derece kompleks bir mikrobiyal süreç başlamaktadır. Sonuç olarak kandidalar mukozal candidiyasis'e ek olarak, en sık karşılaşılan iki oral enfeksiyon olan diş çürüğü ve periodontal hastalıklarda da %0.5-55 gibi bir insidans ile ajan patojen olarak rol oynayabilmektedir (9). Kandidaların bu iki enfeksiyonun patogeneğinde primer kariyojenik mi yoksa periodontal patojen olarak mı kabul edilmeleri gerektiği konusunda kesin bir kabul bulunmamakla beraber, ağız sağlığı açısından önemlerinin büyük olduğu bütün araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. Mevcut çalışmalarda elde edilen deliller kandidaların muhtemelen klasik bakteriyel patojenlerin yanında sekonder patojenler olarak enfeksiyona katıldıkları ve lezyon patolojisinin şiddetini artırdıkları düşünülmektedir (10,11).

Endodontik hastalıklar dental hastalıkların %30-40'ını oluşturmaktadır. Endodontik enfeksiyonlar sıklıkla polimikrobiyal menşeylidir. Bu sebeple antimikrobiyal tedavi de karşılaşılan en önemli sıkıntı klinik kürün sağlanmasına rağmen bakteriyolojik kürün sağlanamamasıdır (12). Primer kök kanal enfeksiyonların da anaerobik bakterilerin baskın olarak bulunduğu bildirilse de mayalar gibi mikroorganizmalarında bu tür enfeksiyonlarda önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir(13-16). Bazı kandida türlerinin endodontik patolojilerin erken döneminde rol oynayabilecek virulans faktörlerine sahip oldukları da iddia edilmiştir (9). Kandida türlerinin sekonder endodontik enfeksiyonlarda primer enfeksiyonlardan daha yaygın olduğu da bildirilmiştir (8).

C.albicans persistant kök kanal enfeksiyon vakaları ile de ilişkilendirilmiştir. Kök kanal enfeksiyonları sıklıkla diş çürüğü, mekanik travma, diş aşınması, diş restorasyonunu veya diş kırığından kaynaklanan mikro sızıntılar sebebi ile meydana gelir (17). Dentine olan invazyon eğiliminden dolayı dentinofilik mikroorganizmalar olarak tanımlanan *C albicans*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis*, dentine kolonize olarak dentinal tübüllere invazyon gösterir ve persistan kök kanal enfeksiyonlarına yol açabilir (18-20). *C. albicans* gibi diğer patojenik türler, sahip oldukları bir nanoprotein olan adeziv, hifa duvarı proteini, HWP1, ve salgıladıkları hidrolitik enzimler yardımı ile biyofilm oluşturabilir ve böylece kanal içi tedavi ve konak savunma sistemlerinden kolaylıkla korunarak, tedaviye cevap vermeyen inatçı enfeksiyonlara sebep olabilirler (8). Konakçıdan türetilmiş transglutaminaz aktivitesi için bir substrat olan HWP1, kandidaların konakçı hücrelere, başta yanak epitelini olmak üzere, kovalent bağlar ile bağlanmasına aracılık etmektedir (21,22). Bu özellikler sebebi ile bazı kandida türlerinin obstrüktif diş kanallarının bulunduğu, tedaviye cevap vermeyen diş kökü enfeksiyonlarında yaygın olarak görülebileceği, endodontik tedaviye cevap vermeyen periradiküler lezyonlardan da sık olarak izole edildiği rapor edilmiştir (4).

Kandida maya formlarında HWP1 gen ekspresyonundaki artışın hifal yapının artmasına yol açtığı gösterilmiştir. Hifalar da insan epitel hücreleri yüzeyindeki fukozillenmiş yapılar ya da glukozamilglikozidler ile bağlantı kurabilmektedirler. Nitekim HWP1 geninin virülansa katkısını tespit amacı ile yapılan bir çalışmada, delete gene sahip mutant kandidaların fare dokularına bağlanma kapasitelerinde ciddi düşüşler görüldüğü, dolayısı ile HWP1 geninin kandidalar için patogeneizde, özellikle de ağız içi enfeksiyonların patogeneizinde, oldukça önemli olan bir virulans faktörü olduğu doğrulanmıştır (23).

Ancak günümüze kadar kandidaların endodontik enfeksiyonlardaki rolü ve insidansını belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmış endodontik hastalıklarda bir patojen olarak rolü hala net olarak ortaya konulamamıştır. Benzer şekilde kandida türlerinin kök kanalı enfeksiyonlarındaki rolünün ortaya çıkarılması için de daha ileri ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (24).

Kandidaların tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilen kültür yöntemi olsa da, transfer ve teknik hatalar gibi sebeplerle duyarlılık ve özgüllük sorunlarının olduğu bildirilmektedir (25,26). Bunun yanında kültür yöntemleri tanımlamada ve tür tespitinde zaman alıcı yöntemler arasında gösterilmektedir (27). Ayrıca, kültür tabanlı fenotipik tanımlama teknikleri yavaş olup özellikle *Candida* türlerinin tanımlanmasında problemlerle karşılaşılabilir. Geleneksel olarak maya tanımlama yöntemleri morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayalıdır. Bu analizler zaman alıcı olup çoğu mayayı doğru olarak tanımlayabilmek için yaklaşık onlarca biyokimyasal testin gerekli olduğu bildirilmektedir (27). Halbuki, moleküler teknikler hızlı ve güvenilir tanımlamaya imkan sağlamaktadır. *C. albicans* dışında *Candida* türlerinin görülme sıklığındaki artış ya da *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi *Candida* türleri ile ilişkili olan flukonazol direnci dikkate alındığında tanımlamadaki gecikmelerin önemli klinik sonuçları olabilmektedir (28,30). Son yıllarda *Candida* enfeksiyonlarını teşhis etmek için duyarlılık ve özgüllük açısından sorunsuz yöntemler arasında gösterilen DNA tabanlı RFLP gibi yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (21).

Son yıllarda hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonların sıklığı dünya çapında önemli artışlar göstermektedir. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde başta azol grubu ilaçlar olmak üzere çeşitli antifungaller başarı ile kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle azol grubu ilaçlara direnç oranlarında önemli artışlar olduğu bildirilmektedir. İlaç dirençli suşların sıklıkla uzun süreli veya profilaktik tedavi sırasında ortaya çıktığı bildirilmektedir. Flukonazol direncinin en önemli sebeplerinden birinin ERG 11 geninin ekspresyonu sonucu ilaç hedefinde meydana gelen değişiklikler (14- sterol metilaz, ERG11 geninin ürünü) olduğu bildirilmiştir (31).

Biz bu çalışmamızda kök kanal tedavisi yapılan hastalar ile herhangi bir ağız içi hastalığı yakınması olmayan sağlıklı kontrol grubu gönüllülerden topladığımız tükürük örneklerinden izole ettiğimiz *Candida* suşlarının genotiplendirmesini ve azol grubu antimikotiklere karşı duyarlılıklarını tespiti amaçladık. Bu amaçla izole edilen suşlarda ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin PCR amplifikasyonunu takiben, amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon enzimlerinden MspI ile kesimine dayalı

Restriction Fragment Length Polymorphism(MspI-RFLP) analizi yöntemini kullanarak genotiplendirilmesini yaptık. Ayrıca genotiplendirilmesi yapılan kandidaların azol direnç geni varlığı ile HWP1 geni frekansının belirlenmesi PCR yöntemiyle araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Candidaların Genel Özellikleri

Candida cinsi deuteromycetes ailesinden imperfecti arasında sınıflandırılan yaklaşık 150 türden oluşan geniş bir gruptur. (32). Yaklaşık 10 candida türünün tıbbi öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında *C.albicans*, *C. tropicalis* ve *C.glabrata* en sık tıbbi örneklerden izole edilen türler arasında yer almaktadır (%80'den daha fazla). Diğer patojenik Candida türleri arasında ise *C.parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C.guilliermondii*, *C.krusei* ve *C.pseudotropicalis* sayılabilir. Candida türleri arasında yüksek DNA homolojileri mevcut olsa da, bazı türlerin birbirlerinden farklı özellikler taşıdığı bildirilmektedir. Sözgelimi *C. stellatoidea* ile *C.albicans* arasında yüksek DNA homolojisi bulunsa da *C. stellatoidea* sükrözu kullanamaması nedeniyle *C. albicans*'dan ayrılmaktadır. Bazı bilim adamları ise (33) *C. stellatoidea*'yı, *C.albicans*'ın sükröz negatif varyantı olarak tanımlamışlardır. Deuteromycetes sınıfında yer alan candidaların *C.glabrata* dışında ayırt edici özellikleri psödohif oluşturmalarıdır (32).

Bunun yanında, belirli koşullar altında, *C.albicans*'da yuvarlak, kırılğan sporları kalın bir hücre duvarı ile kaplı olan klamidospore oluşumu gözlenebilmektedir. Bu morfolojik geçişler genellikle mayanın değişen çevresel koşullara tepkisini göstermekte ve mantarın farklı bölgelere adapte olmasını sağlamaktadır (34).

Mayalar nükleer bir zarla çevrili tanımlı bir çekirdeğe sahiptir. Hücre zarında lipitler (steroller dahil) ve glikoproteinler bulunur. Ayrıca mitokondri, golgi aparatı, ribozomlar, endoplazmik retikulum ve bir hücre duvarına sahiptirler. Mantar hücre duvarı kimyasal olarak olmasa da bitki hücre duvarı yapısına benzemektedir. N-asetilglukozamin polimeri mantar hücre duvarlarının ortak yapı bileşenidir. Bazı mantarlar hücre duvarlarında selüloz içerirler. Kitin veya selülozun mikrofibrilleri iç içe olup, bu yapıları birleştiren amorf bir matris içine gömülüdürler. Mantar hücre duvarının genellikle %80-90'ı polisakarit yapıda olup, hücre duvarını güçlendiren

matrisi oluşturan proteinler; lipitler, polifosfatlar ve inorganik iyonlarla birlikte bulunmaktadır (34).

Candidaların hücre duvarının yaklaşık %80-90'ı temel olarak 3 majör polisakaritten ibarettir: P-glukanlar (duvarın kuru ağırlığının %20-40'ı), kitin (%1-2'si) ve proteinlerle ilişkili mannandan oluşan mannoproteinler (%35-40). (10). Candidaların en önemli üyelerinden biri olan *C.albicans*'ın hücre duvarı ayrıca protein (%6-25) ve az miktarda lipit (%1-7) de içermektedir. Hücreye sertlik ve koruma sağlamanın yanı sıra fungal hücre duvarı, *C albicans*'ın biyolojisi ve patojenitesinin her alanında önemli bir rol oynamaktadır (34).

2.2. Patojenite

Candidaların neden olduğu enfeksiyonlara kandidiyazis veya kandidozis denilmektedir. Bu mantarların neden olduğu mikozlar geniş bir klinik sunum yelpazesi sergilemektedirler. Deri altı ve mukozal enfeksiyonlarda olduğu gibi yüzeysel, invaziv kandidiyazis vakasında olduğu gibi derin, yaygın ve yüksek dereceli olarak sınıflandırılmaktadır. Vücudun çeşitli anatomik bölgelerin mikrobiyotasını oluşturan Candida türleri konak immunitetesinin zayıfladığı durumlarda endojen ajanlar olarak fırsatçı patojen davranışı sergilemektedirler (35).

Candida bulaşı için bir başka mekanizma ise ekzojen mekanizmadır. Bu esas olarak başka kaynaklardan hastalara kontaminasyonla meydana gelmektedir. Hastanelerde enfeksiyonun yayılmasında kontamine kateterler ve intravenöz solüsyonlar gibi sağlık bakım malzemeleri önem arz etmektedir (36). Candida türleri çok yönlülükleri ve çeşitli anatomik bölgelerde hayatta kalma yetenekleri nedeniyle önemli patojenler olarak kabul edilir (37). On yıl kadar öncesinde mantarların, mantar enfeksiyonu oluşumundaki patogeneze sürecine pasif olarak katıldığına inanılmaktaydı. Bu nedenle yapısal zayıflık veya immün sistemi baskılanmış bir konak, fırsatçı enfeksiyonun oluşmasından sorumlu tek mekanizma olarak kabul edilmekteydi. Bugün ise bu kavramın değiştiği, bu organizmaların virülans faktörleri adı verilen patojenite mekanizmalarını kullanarak hastalık sürecinin patofizyolojisine aktif olarak katıldıkları bilinmektedir (38).

Candida türleri gastrointestinal sistemin mukozasında olduğu kadar ağız, özofagus ve vajinada da bulunmaktadır (39). Bu kommensal mikroorganizma normalde mukozal yüzeyleri asemptomatik bir şekilde kolonize etmesine rağmen, morbidite ve mortalitesi yüksek bir enfeksiyonun en önemli nedenlerinden biri olabilir (40). Önceleri mantarlar esas olarak bağışıklığı baskılanmış hastaları ya da ciddi altta yatan hastalıklar nedeniyle uzun süre hastanede kalan hastaları etkileyen, hastane enfeksiyonlarının başlıca nedenleri olarak kabul edilmekteydi (41).Sağlıklı bireylerin mikrobiyotasında bulunan Candida türleri çevresel kontaminantlar olarak doğada da bulunmaktadır. İnsanların çoğunda Candida türleri tek tip olarak mikrobiyal florada yer alabileceği gibi, bazen birden çok Candida tipinin vücudun aynı bölgesinin mikrobiyotasında da bulunabileceği de bildirilmiştir. Bu tip konakların genellikle hastanede yatan hastalar ya da hastane ilişkili kişiler olduğu bildirilmektedir (42). Bu duruma ek olarak, Candida türlerinin patojenik olma potansiyeli vardır. Patojenitenin önemli bir bileşeni de, bu organizmaların her birinin kendine özgü çevresel strese sahip, farklı yer ve farklı anatomik bölgelerde, kommensal olarak hayatta kalmasıdır (41).Candida türlerinin hastaların farklı anatomik bölgelerini enfekte edebilmelerine rağmen, immün korumanın bulunduğu bölgeye özgü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Ayrıca, kutanöz kandidiyazis ve vajinal enfeksiyonların nötrofilleri ve mononükleer fagositleri içeren fagositik immün reaksiyon ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (41).

İdrar yolu, hastanede yatan hastalarda enfeksiyon gelişimine en elverişli anatomik bölgedir, ancak bu sorgulanabilir bir öneme sahiptir (41).Bu enfeksiyonların çoğunun bakteri kökenli olmasına rağmen, en az %10'unda başlıca etiyolojik ajan olarak mantarların etken olduğu ve mantarlardan da Candida türlerinin en sık izole edildiği bildirilmektedir (43). Çalışmalarda Candida türlerinin yoğun bakım ünitelerine başvuran hastaların idrar örneklerinin %20'sinden fazlasından izole edildiğini göstermektedir (44).

Solunum yollarının candida türleri tarafından kolonizasyonu, 2 günden uzun süre mekanik ventilasyon alan hastalarda yaygındır. Bu orofarengeal veya gastrik kaynaklı içerikteki kolonilerin hematojen yayılması veya pulmoner aspirasyonu

nedeniyle meydana gelmektedir (41). Uzun süreli yoğun bakım ünitesinde kalma ve yatış süresi de önemlidir.

Candida patojenitesi bu mayaların önemli bir dizi virülans faktörlere sahip olması nedeniyle yüksektir. Bu virülans faktörler arasında en önemlileri arasında dokulara ve tıbbi cihazlara yapışmakta rol oynayan biyofilm oluşturma yetenekleri, proteazlar, fosfolipazlar ve hemolizinler gibi çeşitli hidrolitik enzim salgılayabilmeleri sayılabilir.

Mayalarda özellikle de *C. albicans*'ta patojenik faktörleri tanımlamak için kapsamlı çalışmalara rastlanabilse de, *albicans* dışı türler hakkında daha az çalışma mevcut olup nispeten daha az şey bilinmektedir (45).

Maya hücrelerinin filamantöz tarzda üremeleri konak hücreye mantar adezyonunu kolaylaştıran bir durum olarak kabul edilmektedir (46). İnsan dokularındaki mantar kolonizasyonu etkileyen birincil faktör, konakçı yüzeylere yapışmadır. Bu işlem hem mantar hem de çevrede birkaç hücrel sinyal kaskadı tarafından kontrol edilmekte ve uyarılmaktadır. Buna ek olarak, *candida* türleri tıbbi cihazların yüzeylerine yapışabilmekte ve biyofilmler oluşturabilmektedir. *Candida* hücrelerinin ilk bağlanmasına spesifik olmayan faktörler (hidrofobiklik ve elektrostatik kuvvetler) aracılık etmekte ve mantar hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik adezinler tarafından teşvik edilmektedir. Adezyon fenomeni diğer hücrelerin yüzeyindeki amino asitlere ve şekerlere spesifik olarak bağlanan veya abiyotik yüzeylere yapışmayı artıran, adezinler adı verilen özel yüzey proteinleri tarafından sağlanmaktadır (47). *Candida* türleri insan mikrobiyotasının bir parçası olduğu için genellikle biyomalzemelerde, implantlarda ve kateterlere kolayca tutunabilmekte ve ciddi problemlere yol açabilmektedirler (48). *Candidaların* ürettikleri biyofilmler endişe verici klinik problemlere neden olabilmektedir. Çünkü antimikrobiyal maddelere karşı biyofilm direncinin mekanizması tam olarak bilinmese de, bu yapıların antifungal tedaviye direnci arttırdığı bildirilmektedir. Bu konuyla ilgili bir görüşe göre biyofilm oluşumu matrisin varlığının bir difüzyon bariyerinin oluşumuna yol açarak ilaçların penetrasyonunu kısıtlamasından kaynaklanmaktadır (48).

Kandidaların hücre dışı hidrolitik enzimlerinin aderansta, doku penetrasyonunda ve istilasında, konak dokuların imhasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir (49).Candidaların en önemli hidrolitik enzimlerinin proteazlar ve fosfolipazlar olduğu bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda hücre dışı hidrolitik enzimlerin sentezindeki ve aktivitesindeki artış ile mayaların patojenik potansiyelindeki artışın bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Mayaların patojenik potansiyelindeki bu artış ile ciddi kandidiyazis klinik bulguları arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (36).

Mikrobiyal hücre dışı lipazların olası rolleri arasında besin kazanımı için lipidlerin sindirimi, konak hücreler ve dokulara yapışma, spesifik olmayan enflamatuvar immün hücreleri etkileyen süreçleri başlatma ve kendini savunmak için rekabetçi mikroflorayı parçalamak yer almaktadır (50). Bir çalışmada lipaz inhibitörlerinin insan dokularının enfeksiyonu sırasındaki doku hasarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir.

Bunun yanında, hemolizin üretimi mayaların virülansında önemli bir rol oynamaktadır. Bu protein, sağ kalım ve demir alımı ile ilgilidir (51). Hemolizinler, kırmızı kan hücrelerini yok etmek için mikroorganizmalar tarafından üretilen proteinlerdir. İnorganik bir element olan demir, maya da dahil olmak üzere mikro organizmaların gelişimi için elzemdir. Bu elementi elde etme kabiliyeti enfeksiyöz bir sürecin oluşturulması için oldukça vazgeçilmez bir gerekliliktir (52).

C. albicans tek hücreli maya hücrelerinden tersine çevrilebilir şekilde psödohifal veya hifal büyümeyle hücre farklılaşması ile özel şeklini almakta ve bu morfogenez fenomeni olarak adlandırılmaktadır. Bu fenomen, tek hücreli maya hücresi ile filamentli bir büyüme formu arasındaki geçişi ifade etmektedir. *C.albicans* ve *C.dublinsiensis*, her ikisi de filamentöz büyüme tipi gösterebilen maya mantarlarıdır. Bu mayalar izotropik (maya) veya apikal olarak (hifal ve psödohifal) üreme kabiliyetine sahiptir. Bir virülans mekanizması olan hifal büyüme, doku invazyonu ve fagositoza direnç açısından önemli bir fonksiyona sahiptir (53).

2.3. Candida Biyofilm Oluşumu

Mantarlardaki biyofilm oluşumu patogeneizde önemli bir rol oynamaktadır (54). Çalışmalar, *C. albicans* tarafından oluşturulan hastalıkların çoğunun, biyofilm büyümesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (55). Araştırmalar, mikroorganizmaların, konakçı dokularında serbest formlarında neredeyse bulunmadığını, ancak hem dokularda hem de protezlerde, kateterlerde ve diğer yüzeylerde çok hücreli bir topluluk oluşturarak birlikte gruplandığını göstermiştir (56). *Candida* türlerinin hücrelere ve materyallere veya konak hücrelere yapışması, biyofilm oluşumunda ilk adım olarak gösterilmiştir.

Biyofilmler spesifik ve organize hücre topluluklarıdır. Hücre bölünmesinden kaynaklanan hücrelerin rastgele birikimlerinden ziyade, sinyal moleküllerinin kontrolü altındadırlar. Bu biyolojik topluluklar kendi ürettikleri hücre dışı bir matriste gömülü olarak bulunmaktadır. Bir çalışmada non-*albicans* türleri arasında bulunan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Hücre dışı matris farklı türler için farklı miktarlarda protein ve karbonhidrat içermektedir. Genel olarak, biyofilm matrisi karbonhidratlar, proteinler, fosfor ve heksosaminler içermektedir. Ortam bileşimi, pH ve oksijen gibi çevresel koşullar ile fungal yük miktarı ve türü gibi etkenler biyofilm oluşumunu ve matris kompozisyonunu etkileyebilmektedir. Örneğin, *C. parapsilosis* biyofilmleri çok miktarda karbonhidrat içermekte ve protein içeriğinin *C. glabrata* ve *C. tropicalis* biyofilmlerine kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (57). Biyofilmler herhangi bir biyotik veya abiyotik nemli yüzeyde büyüebilir. Organizmaların biyofilm içinde birlikte bulunması, gelişmeleri ve korunmaları için simbiyotik ilişkileri teşvik eden ve buldukları ortamlarda hayatta kalmayı sağlayan bir koruma şeklidir (58). Biyofilmler, mantarları konakçı bağışıklık mekanizmalarından korumaktadırlar. Antifungal tedaviye direnç gelişiminde ve diğer mikroorganizmalarla olan rekabete katkıda bulunarak mayaların patojenitesine katkı sağlamaktadırlar.

Sonuç olarak, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi daha zor bir hale gelmektedir. Biyofilm üretimi aynı zamanda ilişkili mikroorganizmaların yüksek düzeyde antimikrobiyal direnci ile de ilgilidir (59).

Biyofilm oluşumu sürecindeki ilk önemli olay, biyofilm olgunlaşma sürecini izleyen mikrobiyal bağlanmadır (60). Candidalar substrat ile birleşince, birçok fiziksel ve kimyasal olay mikroorganizmanın yüzeye ilk yapışmasını sağlamaktadır. Bu katılım aşamasından sonra, biyofilmde bir maturasyon süreci başlamaktadır.

Transplantasyon prosedürleri, immünsüpresyon durumları, kalıcı cihazların kullanımı ve uzun süreli yoğun bakım ünitesinde kalma gibi sebepler maya enfeksiyonları prevalansını arttırıcı faktörler olarak bildirilmektedir (61). Santral ve periferik kateterler, hemodiyaliz ve periton diyalizi üniteleri ve intrakardiyak protez kapaklar gibi tıbbi cihazların kullanımı biyofilm oluşumunu kolaylaştıran faktörler arasındadır (61).

İnfeksiyon etkeni olan maya türleri arasında *C.albicans* en sık izole edilen tür olmasına rağmen, albicans dışı diğer türlerin etken olarak izolasyon sıklığının son yıllarda ciddi artışlar gösterdiği bildirilmiştir (62). Bu türlerin nozokomiyal enfeksiyonlarda etiyolojik ajan olarak tanımlandığı bildirilmektedir (63). Biyofilm oluşturan Candidalar özellikle de *C. albicans*'ın medikal cihazlara tutunarak biyofilm oluşturmaları insanlarda tedavisi güç enfeksiyonlara yol açmaktadır. (64). Kateter ile ilişkili enfeksiyonlar hastanede yatan hastalar arasında en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Kateter ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen mikroorganizmaların yaklaşık %90'ının biyofilm ürettikleri de bildirilmiştir. Kateterle ilişkili biyofilm üretebilen Candida türlerinin kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açabilme potansiyellerinin bulunması da önemli bir tehlikedir (65). Vücutta yabancı cisimlerle ilişkili Candida enfeksiyonlarında mortalite oranlarının %30'lara varabildiği bildirilmiştir (61). Bunun yanında antifungal ilaç tedavi maliyetlerinde son yıllarda önemli artışlar olduğu da bildirilmektedir. Sözelimi ABD'deki antifungal tedavilerin yıllık maliyetinin 2.6 milyar dolar dolaylarında olduğu tahmin edilmektedir (65).

Candidalar hem maya hem de hifal formda biyofilm üretebilme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalardır (66).

Birçok çalışma implante edilmiş vasküler kateterlerde Candida biyofilmlerinin oluşumuna odaklanmıştır. Çünkü başlıca bir enfeksiyon kaynağı

olarak bu kataterler gösterilmektedir (66). Bununla birlikte başka birçok tıbbi cihazda da biyofilm üretimi görülebilmektedir.

Biyofilmlerin insanlardaki enfeksiyonların majör nedeni olduğu kabul edilmektedir. Candidalar sırasıyla hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının dördüncü ve idrar yolu enfeksiyonlarının üçüncü önde gelen nedenidir. Candida ile ilgili kan dolaşımı enfeksiyonlarının %70-80'i merkezi venöz kateterlerle ilişkili olup, Candidalara bağlı idrar yolu enfeksiyonlarının çoğunun ise mesane kateterizasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (67). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 45 milyondan fazla tıbbi cihaz implantasyonu yapıldığı tahmin edilmektedir. Cihaz takılan hastaların %60'ında enfeksiyon meydana geldiği ve Candida türlerinin bu enfeksiyonların yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (48). Candidalar hemen her tip tıbbi cihazda biyofilm oluşturabilme yeteneğinde olan mikroorganizmalardır. En sık kullanılan sistemik cihazlar arasında vasküler kateterler, idrar sondaları, eklem protezleri, kalp kapakçıkları, yapay vasküler baypas cihazları, kalp pilleri, ventriküler destek cihazları ve merkezi sinir sistemi şantları bulunmaktadır (68). Candida endokarditi daha önce nadir görülen bir hastalık olarak kabul edilse de, protezik intravasküler aletlerin kullanımının artmasından dolayı görülme sıklığı kısmen artmıştır. Protez kapak endokarditi hastalarında, iki aşamalı bir işlemle Candida enfeksiyonunun meydana gelebildiği bildirilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde tedavi sırasında post-operatif geçici kandidemi meydana gelmesi ile protezik kapak kolonize olabilmektedir. Akabinde ise antifungal ajanlara karşı duyarlılığı azaltan biyofilm üretiminin meydana geldiği bildirilmektedir. Bu teori kandidemi riskli protezik kalp kapakçığı olan hastalarda biyofilmle ilişkili kandidiyazise karşı aktivite sergileyen ajanları kullanarak, profilaktik antifungal terapiye destek vermektedir. Son yıllarda hem oral hem de vajinal dokular dahil biyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunun meydana gelebildiği bildirilmektedir (69).

2.4. Epidemiyoloji

Candidalar endodontik enfeksiyonlarda yer alabilen, periradiküler hastalıkların etiyojisine katılabilen kemo-organotrof ökaryotik mikroorganizmalardır. Tedavinin başarısız olduğu dişlerin kök kanallarında daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Candida renfekte kök kanallarından en yaygın şekilde izole edilen mantar türleridir. Bu mantarlar dentine invazyon afinitesi nedeniyle dentinofilik mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Candidaların kalsiyum hidroksit gibi bazı intrakanal ilaçlara dirençli olabileceği bildirilmiştir. Dentinal tübüleri istila etme kabiliyeti ve yaygın olarak kullanılan intrakanal ilaçlara karşı direnç, Candida'ların neden sürekli kök kanalı enfeksiyonları vakaları ile ilişkili olduğunu açıklamaya yardımcı olabilir. Klorheksidindiglukonat, kalsiyum hidroksit kombinasyonları(kafurluparamonoklorofenol veya klorheksidin ile) gibi bazı ilaçlar ve EDTA, Candida enfeksiyonu şüphesi olan hastalar için etkili intrakanal ilaçlar olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (26).

Yaklaşık 50.000 mantar türünün 200'den fazlasının omurgalı hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara neden olabildiği bildirilmektedir (70). Patojenik mantarların çoğunun Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes ve Deuteromycetes (70) gruplarına girdiği bilinmektedir. Fırsatçı mantar patojenlerinin en sık rastlanan türleri olan Candidalar deuteromycetes grubu üyeleridir. Candida türleri, yüzeysel hastalıktan, yaşamı tehdit eden yaygın mikozlara kadar, insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Patojenik mantarların çoğu ekzojen kaynaklı iken, Candida enfeksiyonlarının önemli kaynağı endojen floradır. Candida türleri ağız boşluğu, gastrointestinal sistem, anüs, kasıkta ve vajinal kanal ve sağlıklı insanların vulva florasında yer alan mikroorganizmalardır (71). Bu endojen mantarların çoğu fırsatçı patojenler olup, bunların neden olduğu enfeksiyonlar, genellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin uygulanması, immünosüpresyon ve koruyucu vücut bariyerlerin bozulması ile indüklenen normal mikrobiyota dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. Mantar enfeksiyonlarının oluşmasında genellikle konağın etkilenmesi için bazı yatkınlıklar bulunmalıdır (72).

Mantarlar oral mikrobiyotanın küçük bir bölümünü oluştururlar. Mantar mikrobiyotasının en büyük kısmını ise Candida türleri oluşturmaktadır. Candida türleri hem sağlıklı hem de hasta bireylerin ağız boşluğunda en sık saptanan mantar

türleridir. Sağlıklı erişkinlerde *Candida* türleri insidansının %30-45 arasında olduğu bildirilmiştir (73) Dilin dorsumu *Candida*'ların primer oral habitatu olarak kabul edilirken, diğer bölgeler ise *Candida* türleri için sekonder kolonizasyon bölgeleri olarak kabul edilmektedir (74.). *Candida*'ların oral boşlukta dil dışında en sık bulunabildiği alanlar arasında; mukozal yüzeyler ve supragingiva (74), dentin (75), kökler (76), subgingiva (77) ve periodontal cepler sayılabilir (78). *C. albicans* dışında *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* gibi çok sayıda başka maya türünün de ağız boşluğundan izole edilebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (71). Endodontik enfeksiyonlardan amantar oluşumunu gösteren çalışmaların bir kısmı, periradiküler hastalıkların etiolojisinde bu mikroorganizmaların rolüne olan ilginin artmasına yol açmıştır.

C. albicans invazif mantar enfeksiyonlarında en yaygın tür olsa da, *albicans* dışı *Candida* türlerinin enfeksiyonlardan izole edilme frekansının son yıllarda önemli artışlar gösterdiği bildirilmiştir. *Candida* enfeksiyonlarında *C. albicans* dışında özellikle *C. glabrata* ve diğer non-*albicans* türlerin sıklığı dikkatleri çekmektedir. Epidemiyolojideki bu değişiklikliğin ciddi immünoşüpresyon veya sistemik hastalık, prematürite, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve yaşlı hasta popülasyonunun artması ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (79). Avrupa ülkelerinde yapılan bir analizde kandidemi vakalarının yarısından fazlasının *C. albicans* kaynaklı olduğu ve *albicans* dışı kandidemi enfeksiyonları için görülme oranlarının *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* için yaklaşık %15, *C. tropicalis* için %7, *C. tropicalis* ve *C. krusei* için %2-7 arasında olduğu bildirilmiştir (80).

Son yıllarda non-*albicans* türler arasında yer alan *C. tropicalis*, *C. dubliensis* ve *C. parapsilosis* gibi türlerin nozokomiyal enfeksiyon etkenleri olarak belirlediği bildirilmektedir. Endoftalmi, endokardit, septik artrit, peritonit ve fungemiye içeren klinik bulgular, genellikle invaziv hastalık veya protez kullanımı ile ilişkili enfeksiyonlardan izole edildiği bildirilmektedir (37).

Antifungal dirençli non-*albicans* türlerin neden olduğu enfeksiyonların görülme sıklığındaki artışlar özellikle son dönemlerde endişelere yol açmıştır (81). *Albicans* dışı türler arasında *C. tropicalis* ve *C. parapsilos*'ın her ikisi de azollere

duyarlı olsa da, *C.tropicalis*, flukonazole karşı *C.albicans*'tan daha az duyarlıdır. *C.glabrata*, *C.krusei* flukonazole karşı yapısal olarak daha dirençli olup, bu türlerin neden olduğu enfeksiyonlar, önceki flukonazol profilaksisi uygulanması ve nötropeni varlığı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. *C. lusitanaeise*, kandidemilerin %1-2'sini oluşturmakta olup, azollere duyarlıdır. Ancak amfoterisin B'ye karşı intrinsik direncin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (82).

Antifungallerin keşfinden bugüne kadar yeni antifungal bileşiklerin ve sınıfların sayısında artışlar olmuştur. Bu yeni antifungaller arasında; polyenler, azoller, ekinokandinler ve purin analoglar sayılabilir. Kullanılan antifungal ilaç sayısının ve miktarının artması, bu mikroorganizmaların direnç geliştirmesiyle sonuçlanmıştır. Profilaksi amacıyla verilen ilaçlar veya ülkemizde ve dünyanın birçok merkezinde uygulanan ampirik tedavi sebebiyle antifungal ajanlara aşırı derecede maruz kalınması direnç gelişmesine yol açmaktadır. (83).

2.5. Antifungal Ajanlar

Tüm ciddi mantar enfeksiyonları için uygun bir antifungal tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Fungal enfeksiyonların tedavisinde sınırlı sayıda antifungal bulunduğundan tekli ilaç sınıflarına ya da çoklu ilaç gruplarına karşı direnç gelişimi ciddi sorunlara yol açmaktadır. Candida türleri arasındaki azol direnci, bazı Candida türleri arasında, özellikle *C. glabrata*'da ekinokandin ve çoklu ilaç direncinin gelişmesi klinik başarıyı zora sokmaktadır. Azollere dirençli *Aspergillus fumigatus* gibi mantar türlerinin yayılması ve çok ilaca dirençli *C. auris* gibi türlerin ortaya çıkması ciddi tehdit oluşturmakta ve endişe vermektedir. İlaç direncine neden olan moleküler mekanizmalar, daha az duyarlı türlerde doğal olarak meydana gelebildiği gibi duyarlı olan mikroorganizmalarda da başka suşlardan edinilebilmektedir. İlaç direnç mekanizmaları, değiştirilmiş ilaç-hedef etkileşimlerini, ilaç eflüks taşıyıcılarının aracılık ettiği azaltılmış hücresel ilaç konsantrasyonlarını ve biyofilmlerle ilişkili geçirgenlik engellerini içermektedir. Her ne kadar *C. auris* doğal olarak ilaca dirençli olsa da, diğer suşlar tipik olarak çoklu ilaç direnç mekanizmalarının aşamalı olarak seçimi yoluyla direnç geliştirmektedirler. İlaç

tedavisi ile indüklenen hücresel stres, uyumu arttırarak bu artan dirence katkıda bulunmaktadır. Mikroorganizmanın ilaca uzun süre maruz kalması da direncin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Etkili bir antifungal yönetim programı, ilaç direncini kontrol etmek için şart olup, hızlı tür teşhisi, terapötik ilaç takibi önemli hususlar arasında sayılabilir. İlaçların etkinliğini korumak için daha iyi teşhis araçları ve hedefli ilaç kullanımına izin veren stratejilerin geliştirilmesi esastır (84).

Patojen mantarlar hayatı tehdit edici invaziv hastalıklara (fungaemia, menenjit, pnömoni gibi), şiddetli kronik durumlara (kronik pulmoner aspergilloz, alerjik bronkopulmoner aspergilloz gibi) ve kompleks kronik solunum sistemi hastalıklarına (astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi) neden olabilmektedirler. Bu patojenler ayrıca oral ve vajinal kandidiyazis gibi tekrarlayan enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Birçok invaziv mantar enfeksiyonu, immünosupresyon ile ilişkili altta yatan sağlık koşullarının bir sonucu olarak gelişmektedir (85). Genel olarak, bu enfeksiyonlar yüksek mortalite ile ilişkili olup başarılı bir klinik sonuç için erken tanı, doğru tür tayini ve etkili antifungal tedaviyi gerektirmektedir.

Ancak günümüzde gerek Candida'ların sebep olduğu enfeksiyonlar ve gerekse de diğer mantar enfeksiyonlarının tedavilerinde antifungal ilaç seçeneği oldukça azdır. Candida'ların yol açtığı invaziv hastalıkların tedavisi için; azoller, ekinokandinler, polyenler ve flusitozinler ile sınırlı kimyasal birkaç sınıf ilaç bulunmaktadır (86). Son on yılda bir dizi hastada güvenle uygulanabilen daha az toksik ilaçlar geliştirilmiş olup, profilaksi için antifungal kullanımı ve ampirik ilaç tedavisinin artması direnç gelişmesine katkıda bulunmaktadır (87,88). Herhangi bir ilaç sınıfına karşı ilaç direncinin ortaya çıkması, çok az tedavi seçeneği olduğu için tedaviyi ciddi şekilde sınırlandırmaktadır. Çoklu ilaç direnci tedavi sonuçlarını tamamen ortadan kaldırabilmekte, bu da hasta sağlığı üzerinde yıkıcı bir etki yaratabilmektedir. Klinikte ilaç direncinin üstesinden gelmek için hızlı teşhis, terapötik ilaç izleme ve klinik müdahale ekiplerinin kollektif çalışmalarıyla etkili antifungal yönetim programları oluşturulmalıdır.

2.5.1. Antifungal Direnci Etkileyen Faktörler

Bir hasta tedaviye cevap vermez, ya da standart bir dozda verilen ilaca cevap vermezse terapötik başarısızlık oluşmuştur. Çeşitli konakçı etkenleri, ilaç ve mikrobiyal faktörler bu tür başarısızlıklara katkıda bulunmaktadır. Sözgelimi, antifungal ilaçlar enfeksiyon etkenlerine karşı mücadelede sağlam bir bağışıklık tepkisi olmadan başarısız olacağından, bozulmuş bir bağışıklık sistemi olan hastanın tedaviye yanıt vermemesi daha olasıdır. (89). Kalıcı kateterler, yapay kalp kapakçıkları ve diğer implante edilmiş cihazlar enfeksiyon oluşumu için predispoze faktörler arasında yer almaktadır. Çünkü bu yüzeyler sıklıkla ilaç geçirmeyen biyofilmlerle kolonize olabilmektedir. Enfeksiyon bölgelerinde ilaç penetrasyonunun iyi olmamasına rağmen, konakçı içindeki ilaç dağılımının terapötik yetersizliğe katkıda bulunduğu da bilinmektedir. Özellikle, karın içi bir apse gelişimi ilaç direncinin artmasına yol açabilmektedir. Çünkü böyle bir durumda mantar elemanları suboptimal ilaç konsantrasyonlarına maruz kalacaklardır (90). Kronik enfeksiyonlu hastalar arasında, ilaç rejimlerine uyumsuz davranmak, yetersiz ilaç maruziyetine sebep olabilmektedir. Profilaksi yapılması, tekrarlanan veya uzun süreli tedavi şeklinde ilaca maruziyet direncin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir.

Benzer şekilde, sistemik antifungallerin hedefleriyle aynı moleküler hedeflere sahip olan tarımsal mantar ilaçlarına maruz kalmak, dirençli organizmaların çevresel rezervuarlarını arttırmaktadır. Mikrobiyolojik ilaç direnci primer (içsel) veya sekonder (edinilmiş) olarak kazanılmış olabilir. Primer ilaç direnci daha önce ilaca maruz kalmaksızın bazı türler arasında doğal olarak bulunmakta ve çoğu zaman kazanılmış dirence neden olan mekanizmayı tetikleyebilmektedir. Antifungal ilaç direnç sağlayan moleküler mekanizmalar, tüm ana ilaç sınıfları için bilinmekte olup, ancak bu mekanizmaları destekleyen komplike biyolojik faktörler henüz açıklanamamıştır. (91).

2.5.2. Antifungal Direncin Değerlendirilmesi

Mikrobiyolojik ilaç direnci; bir antifungal ajana karşı duyarlılığın azalması ile ilişkilidir. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) ve Klinik

ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI) Candida'lar ve küfler için standardize edilmiş bir *in-vitro* antifungal duyarlılık test yöntemi geliştirmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon ölçülebilen klinik bir sınır değeri ifade etmektedir. En yaygın patojenler (92-94) için ilaca özgü ve türe özgü sınır değerler olmasına rağmen, nadir maya ve küfler için hiçbir değer tanımı bulunmamaktadır. Mikrobiyolojik ilaç direnci bir antifungal ajana karşı duyarlılığın azalması ile ilişkilidir (95).

CLSI ve EUCAST klavuzları aynı yöntemle minimum inhibitör konsantrasyonlarını (MİK) belirlese de, farklı sınır değerleri vermektedir. *İn-vitro* minimum inhibe edici konsantrasyon ile klinik cevap arasında kesin bir ilişki olmadığı bildirilmektedir. İlaç duyarlılık testleri mayaları değerlendirmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması klinik ortama göre (direnç olasılığı yüksek olanlar gibi), bireysel hasta risk faktörleri ve tedaviye yanıtı göre değişmektedir. İleri laboratuvarlarda EUCAST ve CLSI referans yöntemleri çoğunlukla maya duyarlılık testi için kullanılırken, rutin mikrobiyoloji laboratuvarları E-test (16) ve kolorimetrik metotlar (22) gibi ticari yöntemler ya da Vitek (96) gibi otomatize sistemler kullanılmaktadırlar. Candida türleri için bu testlerin sonuçlarının referans yöntemlerle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu bildirilmektedir.

2.6.Azol Direnci

Candida türleri arasında azol direnci birkaç mekanizmayla alakalı olarak gelişmektedir. Bunlar arasında; ilaç taşıyıcılarının düzenlenmesi, ilaç hedefinin aşırı ekspresyonu veya değiştirilmesi ve bazı durumlarda stres yanıtlarının neden olduğu hedefe ait olmayan etkilerin meydana getirdiği hücresel değişiklikler sayılabilir (31). Azol bileşikleri (Flukonazol, Vorikonazol, Posaconazol gibi), lanosterolü ergosterol'e dönüştüren sitokrom p450 enzimi sterol 14 α -demitilazı hedeflemekte ve mayada ERG11 ve küflerde CYP51 olarak kodlanmaktadır. Sterol 14 α -demitilaz inhibisyonu mayalarda ve küflerde fungistatik etki yaratmaktadır. Triazololler, aspergilloz tedavisi için önerilmekte olup kandidiyazis tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır (31). Epidemiyolojik araştırmalar Candida ve Aspergillus türleri arasında temel azol

direncinden söz etmekte ve önemine vurgu yapmaktadır (97,98) Epidemiyolojik araştırmalar *Candida* ve *Aspergillus* türleri arasında temel azol direncinden söz etmekte ve önemine vurgu yapmaktadır (99). *C. glabrata*'da yüksek azol direnci ve *C. krusei*'nin intrinsik azol direnci iyi bilinmektedir. Antifungal Sürveyans Programı invaziv kandidiyazis nedeni *C. glabrata*'nın flukanazol direnç oranının 2000'li yıllarda %18'den 2008 yılı başına kadar %25'ler düzeyine çıktığını bildirmiştir (100) Otuz bir ülkeden 1846 klinik izolatuñ dahil edilerek yapıldığı bir çalışmada *C. glabrata*'da flukanazol direncinin %12, *C. tropicalis*'te %11.6 olduğu saptanmıştır (101). Benzer şekilde, geniş çaplı yapılan bir başka çalışmada (101) kandidiyazis etkeni olarak izole edilen *C. glabrata* kökenlerinde flukanazol direncinin 2002-2003 yılları arasında %8, 2010-2011 yılları arasında %13'e çıktığı bildirilmiştir (102). Candidalarda azol direncinin artmasında başka mantar türlerinde görülen ilaç direncinin yüksek olması da, direnç geni aktarımı için bir tehdit oluşturmaktadır. *Aspergillus* türleri arasında azol direnci profilaktik ve uzun süreli tedavi rejimlerinin uygulanması sonucu meydana gelebilmektedir (98). Ayrıca, bitki korumaya yönelik azol bazlı mantar öldürü ilaçların yaygın kullanımını da azol direncini tetikleyen bir diğer önemli unsurdur (103). Bazı Avrupa ülkelerinde tarımsal fungusit ilaçlarının yaklaşık %20'sini oluşturduğu bildirilmiştir (104). Diğer çok ilaca dirençli türler arasında, *Fusarium* spp (105,106) ve *Mucorales*'ler (107) sıklıkla yer almaktadır. *Candida haemulonii* kompleksi (108) ve *Candida auris*'teki çoklu ilaç direncinin artması endişe verici olup, *Candida auris* için dünya çapında bildirilen yüksek ölüm ve terapötik başarısızlık oranları bildirilmiştir (108).

Azollere direnç gelişiminden sorumlu en önemli direnç mekanizmalarından biri de ERG11 geninde meydana gelen mutasyonlardır. Bu gende sayısız nokta mutasyonları bildirilmiştir. Bazı aminoasit süstitüsyonları, demetilazın aktif bölgesinde yapısal değişikliklere sebep olup azalan hedef afinitesine ve dolayısıyla azol direncine yol açabilmektedir (109). Ayrıca *Candida*'larda transkripsiyon faktöründeki mutasyonlara bağlı olarak ERG11 geninin aşırı ekspresyonu da ayrıca azol direnci yaratan bir başka durumdur (110). Benzer şekilde azol direncinin sterol-5,6-desatüraz geninde (111) meydana gelebilecek bir fonksiyonunun kaybı nedeniyle de oluşabileceği bildirilmiştir.

2.7. Ekinokandin Direnci

Ekinokandin grubu ilaçlar (Anidulafungin, Caspofungin ve Mikafungin) glukani hedef alan lipopeptit yapılı antifungaller olup kandidiyazis tedavisinde kullanılmaktadır (112). Kandidiyemili hastalara yaklaşık %60 oranında tedavi seçeneği olarak ekinokandin verildiği bildirilmektedir (113). Ekinokandin kullanımı, son on yılda artış göstermektedir (114). Bu durum antimikrobiyal direncin ortaya çıkma potansiyelini de arttırmıştır. Ekinokandinler *Candida* türlerinin çoğuna karşı oldukça aktif etki göstermekte olup, *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida ortopsiloz* ve *Candida metapsilosis*) ve *Candida guilliermondii*'ye (115) karşı etkinliklerinin düşük olduğu bildirilmiştir. Ekinokandinler *Cryptococcus*, *Trichosporon* ve *Rhodotorula* türlerine karşı ise etkin değildirler. (116). Büyük ölçekli sürveyans çalışmalarında *C.albicans* kökenlerinde direncin genel prevalansının %1'den düşük olduğu (115) çoğu epidemiyolojik prevalans çalışmalarında ise *C.glabrata*'da direnç oranının ise %2-4 arasında değiştiği bildirilmektedir (117). Bir kandidemi sürveyans çalışmasında direnç oranının 200 yılından %4.2'den 2014 yılında %-7.8'e çıktığı bildirilmiştir (118). Bazı çalışmalarda ise direnç oranının %10 yada daha fazla olduğu saptanmıştır. (119,120). Epidemiyolojik çalışmalarda tipik olarak ilaç direnç oranları enfeksiyonun ilk izolatına odaklandığı için düşük bulunurken, kurumsal çalışmalarda tüm izolatlara odaklanıldığından direnç oranları daha reel olmaktadır. Kuzey Amerika'nın aksine, Avrupa'da *C.glabrata* kökenlerinden saptanan ilaç direnç oranlarının düşük düzeylerde olduğu görülmektedir (<% 1) (121).

Genel olarak, duyarlı *Candida* türlerinde ekinokandin direncinin tekrarlanan veya uzun süreli maruziyetten sonra ortaya çıktığı bildirilmektedir (122). Endişe verici bir şekilde *C glabrata*'daki azol direnç artışına günümüzde sıklıkla Ekinokandin direnci eşlik etmekte ve bu da çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır (119).

2.8.Polyen Direnci

Polyenler en eski antifungal ilaç sınıfı olup Amfoterisin B ve Nistatin bu grupta yer almaktadır. Amfoterisin B ilk olarak 1957'de yaşamı tehdit eden İnvaziv fungal infeksiyonların tedavisi için onaylanmıştır. Polyen ilaçları, mantarların plazma zarı içinde mantarlara özgü bir sterol olan ergosterol'ü bağlamakta konsantrasyona bağlı olarak kanalların oluşumuna neden olarak iyonların ve diğer hücrel bileşenlerin hücre dışına çıkışı sonucu hücre ölümüne yol açmaktadır. Amfoterisin B'nin ergosterolü lipit çift tabakasından ayıklayarak hücreleri öldürdüğü de öne sürülmektedir (123).

Amfoterisin B invaziv aspergilloz, kriptokokoz, blastomikoz, kandidemi, koksidiodomikoz, histoplazmoz ve mukormikoz gibi hastalıklar için de primer tedavi seçeneğini oluşturmaktadır. Bununla birlikte renal toksisitesi dolayısıyla ikinci basamak tedaviye izin vermektedir. Amfoterisin B'nin lipid formülasyonları orijinal formülasyondan daha düşük toksisitelere sahip olsa da, yüksek maliyeti sebebiyle geniş kullanımlarını önlemektedir. Amfoterisin B fungusid özellikte olup ve direnç tipik olarak tedavi sırasında doğal olarak daha az duyarlı türlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Duyarlı türlerde kazanılmış direnç nadirdir. Amfoterisin B'ye dirençli mikroorganizmalar arasında *Scedosporium spp*, *Fusarium spp*, *Trichosporon spp*, *Sporothrixschenckii* (124), *Aspergillus nidula*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. Calidoustus* (125)ve *A lentulus* (116) sayılabilir. Amfoterisin B'ye direnç kazanmış enfeksiyon etkenleri arasında *C. albicans* (126), *C. glabrata* (127), *C. rugosa* (128), *C. lusitaniae* (129) ve *C. tropicalis* (130) bildirilmiştir.

Aspergillus türleri arasında polyen direnci son on yılda artmış olup, *A.fumigatus* izolatlarının sadece %11.5'inin EUCAST sınır değerinde (1 µg/mL) inhibe edildiği bildirilmiştir. (131).

Criptococcus ve *Candida* türleri arasında polyenlere karşı kazanılmış direnç nadirdir. Bununla birlikte, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. rugosa* (128), *C lusitaniae* (129) ve *C. glabrata* (127) kökenleri için amfoterisin B, zayıf terapötik etkili ilaç olarak bildirilmiştir. Ayrıca, *C.neoformans* (132) ve çok ilaca dirençli *C. auris*'te (133) amfoterisin B'ye yüksek minimum inhibitör konsantrasyon oranıyla ilişkili tedavi başarısızlığı raporları bulunmaktadır.

Amfoterisin B'ye direnç mekanizması, hücre zarındaki ergosterol içeriğinde azalmayla alakalıdır. Hücresel sterol konsantrasyonlarını düşüren azol grubu antifungal ile muamele, polyen direncine sebep olabilmektedir (134). Amfoterisin B'ye karşı kazanılmış direnç, *Saccharomyces* ve *Candida* türlerinde genetik olarak incelenmiştir. Polyen direncinde sterol biyosentezini spesifik olarak etkileyen mutasyonlar (*ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG6* ve *ERG11*) olduğu da gösterilmiştir (127). *C. neoformans*'da, kusurlu bir C8-izomeraz üretimi ve azalan sterol içeriği, hücreleri amfoterisin B'ye (135) daha az duyarlı hale gelmesine yol açabilmektedir. *A.fumigatus*'ta sterol azalmasının polyen direncindeki rolü daha az belirgindir.

Günümüzde mantarlarda antifungal direnç artış trendinde olup hasta yönetimi ve klinik başarı için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Azole dirençli *Aspergillus* türlerinin küresel yayılımı ve çok ilaca dirençli *C.glabrata* ve *C.auris*'in izolasyon sıklığındaki artışlar oldukça dikkat edilmesi gereken hususlardır. Her ne kadar ilaca direnç sağlayan mekanizmalar ve bunların oluşumunu etkileyen genetik faktörler açıklanmış olsa da, altta yatan biyolojik faktörler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Mantarların strese karşı verdiği güçlü tepki ilaç adaptasyonuna ve toleransına neden olabilmektedir. Barsak veya karın içi apselerdeki gibi konakçı rezervuarları antifungallere karşı direnç göstererek ilaç girişini sınırlayabilmektedir.

Son olarak ilaca maruz kalma ilaç direnci arttırmaya sebep olduğundan, ilaç kullanma yönetiminin direnci önlemede büyük önemi vardır. Sonuçta, yeni hedeflere karşı yeni antifungal ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (84).

2.9. Yeni Antifungal Stratejiler

İlaça dirençli patojenlerin görülme sıklığı ve mevcut antifungal bileşiklerin toksisitesi doğal ürünlerin antimikrobiyal aktivitesine dikkatleri çekmiştir. Mantar tedavisi için mevcut olan ve çoğu fungistatik olan az sayıdaki ilaç ve antifungal ajanlara karşı ortaya çıkan direnç, alternatif tedavilerin araştırılmasını teşvik etmiştir (136,137). Bitkiler çok çeşitli ilaçlar elde etmek için iyi bir seçenek olup tıpta uzun zamandır kullanıla gelmiştir. Doğal ürünler özellikle halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu ürünler ekonomik bir alternatif olabilmekte, bu ürünlere

kolay erişim sağlanabilmekte ve çeşitli patojenlere karşı kullanılabilir (138). Bitkiler ve doğal kaynaklı ürünler bu nedenle yeni antifungal ajanların formülasyonunda kullanılacak maddeler için mükemmel bir kaynak oluşturmaktadırlar. (139).

Birçok çalışma biyofilmlere odaklanmıştır, çünkü bunlar antimikrobiyalere ve konakçı savunmalarına karşı hücreyi daha dirençli hale getirebilmektedir (140).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Aralık 2018, Mayıs 2019 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Endodonti polikliniğine gelen 18 yaş üzeri ve daha önce kök kanal tedavisi yapılmış olan hastalar ile kontrol grubunu oluşturmak üzere seçilen daha önce kök kanal tedavisi yapılmamış herhangi bir diş ve dişeti şikayeti olmayan 18 yaş üzeri sağlıklı gönüllülerden alınan tükürük numuneleri kullanılmıştır.

3.1.Araç ve Gereçler

- Etüv (Heal Force HF90, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- PCR Cihazı (Thermalcyclers, TechneFlexigeneTM, İngiltere)
- Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)
- UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)
- Otomatik pipetler (DiscoveryAutoclavable, Polonya)
- VITEK-2 Compact (bioMérieux S. A., Fransa)

3.2.Kimyasal Maddeler

- AST-YS08 antifungal duyarlılık kiti (bioMérieux, Fransa)
- Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya)
- DNA Ladder (100 bp, H3 RTU, GeneDirex)

- EtidiumBromid (Sigma-Aldrich, Almanya)
- TBE Elektroforez Tamponu 10X
- Master mix (Ampliqon, Denmark)
- DNA LoadingDye(Hibrigen, Türkiye)
- Brom-fenol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- EtidiumBromid (Sigma-Aldrich, Almanya)
- *Msp*Irestriksiyon enzimi (SibEnzyme®, Novosibirsk, Rusya)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Almany)

3.3.Örneklerin Kültivasyonu ve İlaç Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Mustafa Kemal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Endodonti polikliniğine gelen kanal tedavisi gören 18 yaş üstü hastalardan alınan tükürük numuneleri mikrobiyoloji laboratuvarında incelemeye alınmıştır. Kontrol grubu için daha önce kök kanal tedavisi yapılmamış herhangi bir diş ve dişeti şikayeti olmayan 18 yaş üzeri sağlıklı gönüllülerden alınan tükürük numuneleri mikrobiyoloji laboratuvarında incelemeye alınmıştır.

Steril idrar kaplarına alınan 1-3 ml tükürük örnekleri ivedilikle kültür laboratuvarına soğuk zincir altında taşınarak sonrasında Saboraud Dextroz Agara (SDA) ekimleri gerçekleştirilmiştir.

Candida kökenleri SDA (bioMérieux, Fransa) besiyerlerinde 37 °C’de 48 saat inkübasyondan sonra tükürük örneklerinde saf ya da baskın üreme olması patojenite kriteri olarak kabul edildi (141).

Toplanan saf koloniler gliserollü brain-heart infüzyon brothda – 20°C’de saklandı.

3.4.Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.4.1.Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Ticari olarak toz SDA besiyeri (Sabouraud %4 DextroseAgar, bioMérieux S. A. Fransa) 65 gr tartılıp, 1000 ml tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra içine, 0.04 gr kloramfenikol ve 0.5 gr sikloheksimid katılarak karıştırıldı. Kloramfenikol 10 ml % 70'lik alkolde eritildikten sonra ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 9 cm çapında sterilpetri plaklarına dökülerek katılaştıktan sonra kullanıldı.

3.4.2.Sabouraud %2 DextroseBroth

Toz besiyeri 30 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip uygun tüplere dağıtılıp, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edildi.

3.4.3.Gliserollübrain-heartinfüzyonbroth

Toz besiyeri(Merck, Almanya) 37,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip, otoklavda 121° C'da 15 dakika sterilize edildi. Sterilize edildikten sonra gliserol eklenip uygun tüplere dağıtıldı.

3.5.Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA izolasyonu için – 20°C’de saklanan Candida kökenlerini 37 C’ye önceden getirilmiş sıcak su banyosunda çözülmeyi takiben Brain-Heart İnfüzyon Broth besiyerine kültive edildi.

Sıvı kültürlerde üreme bulanıklığını takiben kökenler SDA besiyerine pasajlanarak saf kültürler halinde üremeleri sağlandı.

SDA kültür plaklarında saf olarak çoğaltılan Candida kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 5 ml Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)’da 37 °C’de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

SDB’de çoğaltılan maya hücreleri üretildikleri tüplerden alınarak steril bir eppendorf tüpüne 1 ml alınarak 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant alınarak dışarıya atıldıktan sonra üzerine 200 µl distile su eklenerek 20 dakika süresince kaynar su banyosunda tutularak kaynatıldı.

Sonrasında örnekler alınarak 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

İçerisinde DNA’nın bulunduğu üst kısımdan 150 µl yeni bir steril Eppendorf tüplerine alınarak numaralandırıldı.

3.6.PCR Amplifikasyonu

İzole edilen Candida kökenlerinin genomik DNA örneklerinden, ITS 1 ve ITS 4 primerleri (Tablo 1) kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Bu işlem öncesinde PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Buna göre, her hasta numunesi için bir eppendorf tüpüne 36.8 µl distile su, 5 µl buffer, 1 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polimeraz, 3 µl MgCl₂, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer koyuldu. İyice vortekslendi ve üzerine 2 µl genomik DNA ilave edildi. Toplamda 50 µl bir hacim elde edildi ve aşağıdaki amplifikasyon döngüsü uygulandı (Tablo 2)

Tablo 1.ITS1 ve ITS4 primerleri

Primer	Oligonükleotit dizisi 5'...3'	bp
ITS1 Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	900
ITS4 Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Tablo 2. Termal döngü amplifikasyon döngüsü

Aşam	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	5 dk	
2	Denatürasyon	94 °C	1 dk.	35 döngü
	Bağlanma (Annealing)	56 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk	
4	Bekleme	4 °C		



Resim1. PCR Cihazı (Techne Flexigene™, İngiltere)

3.7. Azol Direncinin Belirlenmesi

Çalışmada hasta grubundaki tüm hastalar ile sağlıklı kontrol grubunda yer alan tüm bireylerden izole edilen Candida kökenlerinde azol direncinden sorumlu olan ERG 11 geninde polimorfizm varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Ayrıca tüm hastalarda özellikle oral infeksiyonlarda önemli bir rol oynadığı bildirilen HWP1 virülans geni varlığı sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslamalı olarak

araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ve PCR protokolü Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan virülans markır ve azol direnç genleri

Genler	Primer sekansı 5’-3’	Ürünün boyutu	PCR protokolü
ERG11-F	TTTGGTGGTGGAGACATA	216bp	95 °C 5 dk
ERG11-R	GAACTATAATCAGGGTCAGG		95°C30 sn 60 °C 30 sn 30X 72°C45 sn
HWP1-F	ATGACTCCAGCTGGTTC	572bp	94°C4 dk
HWP1-R	TAGATCAAGAATGCAGC		94 °C30 sn
			52 °C1 dk 35X
			72 °C2 dk
		72 °C5 dk	

3.8.PCR Amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA örneklerinden, tablo 3’teki primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Bu işlem öncesinde PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Buna göre, her hasta numunesi için bir ependorf tüpüne 9.5 µl distile su, 12.5 µl distile su, 0.5 µl forward primer, 0.5 µl reverse primer koyuldu. İyiçe vortekslendi ve üzerine 2 µl genomik DNA ilave edildi. Toplamda 25 µl bir hacim elde edildi ve her primer için yine tablodaki amplifikasyon döngüleri uygulandı (Tablo 3)

3.9.PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez Tekniği ile Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 1.5 ’luk agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TBE tamponu kullanıldı. 10X TBE stok solüsyondan 1X TBE olacak şekilde distile su sulandırılarak kullanıldı. 1.5 gr agaroz tartılarak 100 ml’lik bir erlenmayere konuldu, 100 ml 1X TBE tamponu eklendi ve 10 mg/ml’lik etidyumbromid’den 10 µl ilave edildi. Mikrodalga fırında 1-2 dk kaynatıldı. Elektrofrez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi. Yaklaşık 60° C’ye

kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) yerleştirildi (Resim 2) Amplifiye edilen örneklerden 7'şer µl 3µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi. Yükleme sırasında 100 bp'lik DNA marker kullanıldı. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 30 dk elektroforez yapıldı. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD) ile bantların varlığı incelendi (Resim 3).



Resim 2. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)



Resim 3. Jel elektroforez sonrası PCR ürünleri görüntüleme cihazı (Wealtec Dolphin-View, ABD, UV Transillumunator)

3.10. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Amplifikasyondan sonra elde edilen PCR ürünlerinin, RFLP analizi için *Msp* I restriksiyon enzimiyle kesimleri yapıldı.



3.10.1. *Msp* I ile Restriksiyon Enzim Analizi

PCR amplifikasyon ürünü toplam hacmi *Msp* I enzimi ile 25 µl olacak tablo 4’de belirtilen oranlarda hazırlandı. Kesim işlemi 37 °C’de 4 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi

Tablo 4. Kesim Karışımı (*Msp* I)

	Hacim
PCR ürünü	10 µl
Distile su	9 µl
10xBuffer	5 µl
<i>Msp</i> I enzimi	1 µl

3.10.2. Kesim Ürünlerinin Analizi

Kesim ürünlerinin kontrolü %3 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jelde yapıldı. *Msp* I kesim enzimiyle kesilen PCR ürünlerinden 10 µl ve yükleme (loading) tamponundan 3 µl alındı, karıştırılarak jele yüklemeleri yapıldı. Kesim ürünleri 100 bp DNA ladder ile birlikte yürütülerek ve jel üzerinde kesim ürünleri jel görüntüleme cihazında görüntülendi (UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD), kontrol edildi.

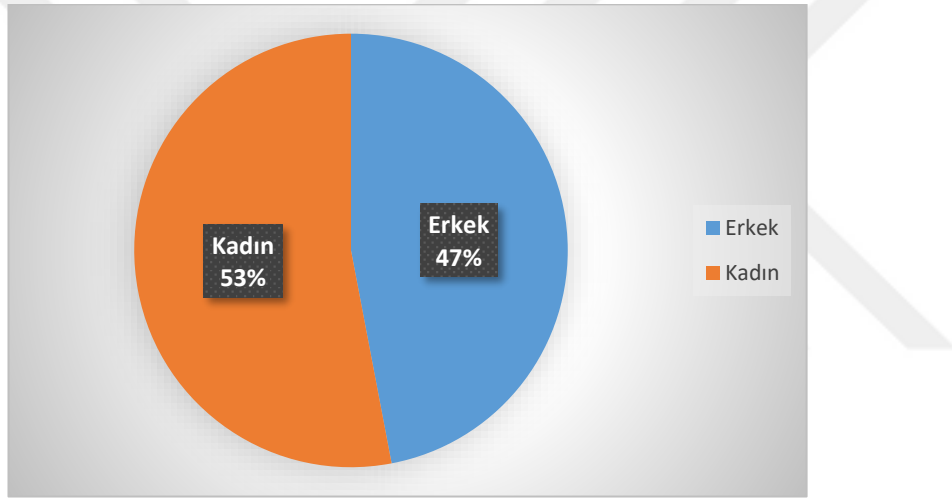
PCR-RFLP yöntemiyle identifiye edilen kökenler ticari firma önerileri doğrultusunda AST-YS08 (bioMérieux, Fransa) kiti kullanarak fenotipik antifungal direnç durumları belirlendi. Çalışmada standart kökenler olarak; *C. albicans* (ATCC 90028), *C.krusei* (ATCC 6258), *C.parapsilosis* (ATCC 22019), *C.tropicalis* (ATCC 22019), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) şeklinde değerlendirildi.

3.11. İstatiksel Analiz

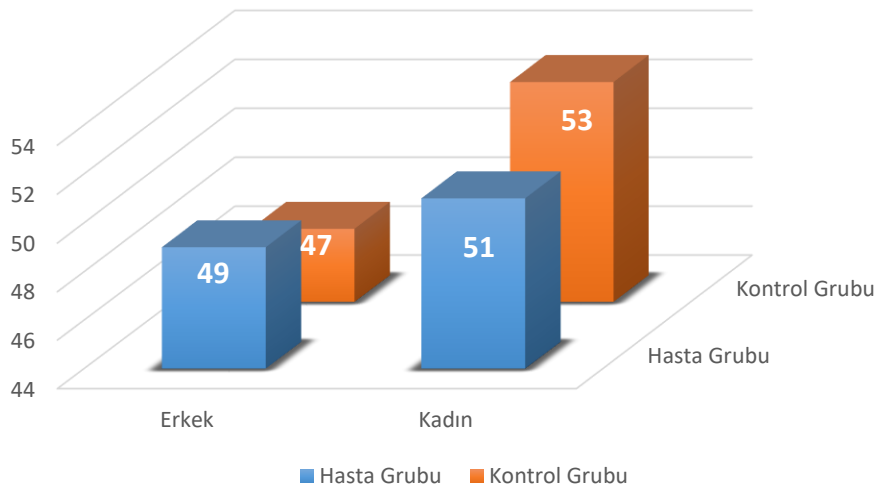
Çalışmada tüm veriler x 2 testi ile analiz edildi. P değeri < .05 anlamlı kabul edildi. İstatiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS1 for Windows V. 17.0, Chicago, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada hasta grubu yanında Candida izolasyon frekansını karşılaştırmak amacıyla hayatının hiçbir döneminde kök-kanal tedavisi almamış olan sağlıklı grup kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen kök kanal tedavisi almamış olan sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylerin %53'ü kadın, %47'si erkek idi.

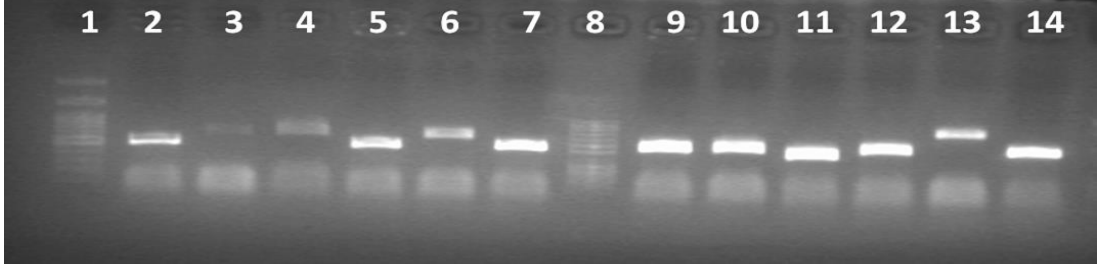


Şekil 1. Kontrol grubunun cinsiyet dağılımı.

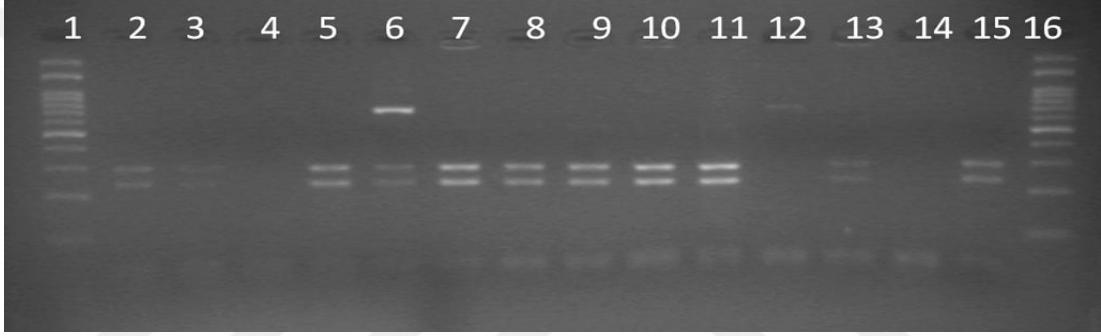


Şekil 2. Kontrol ve hasta grubunun cinsiyet oranları.

Çalışmada 144 klinik örnekte ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon sonucunda 900 bp'lik *Candida* kökenlerine ait ürün elde edildi.

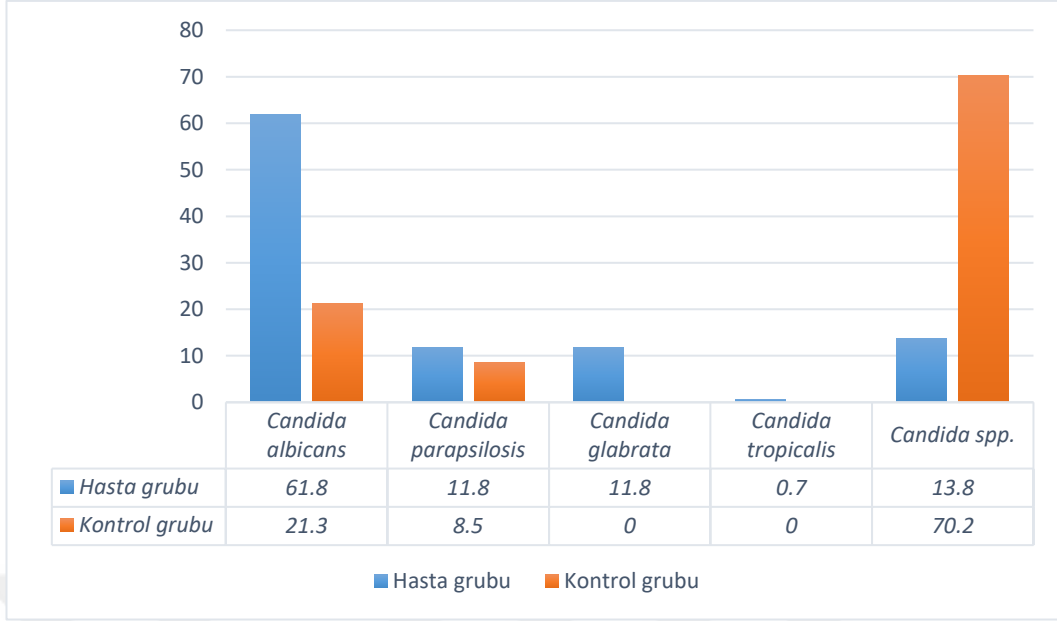


Resim 4. Candidalarda ITS1-ITS4 primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünleri.



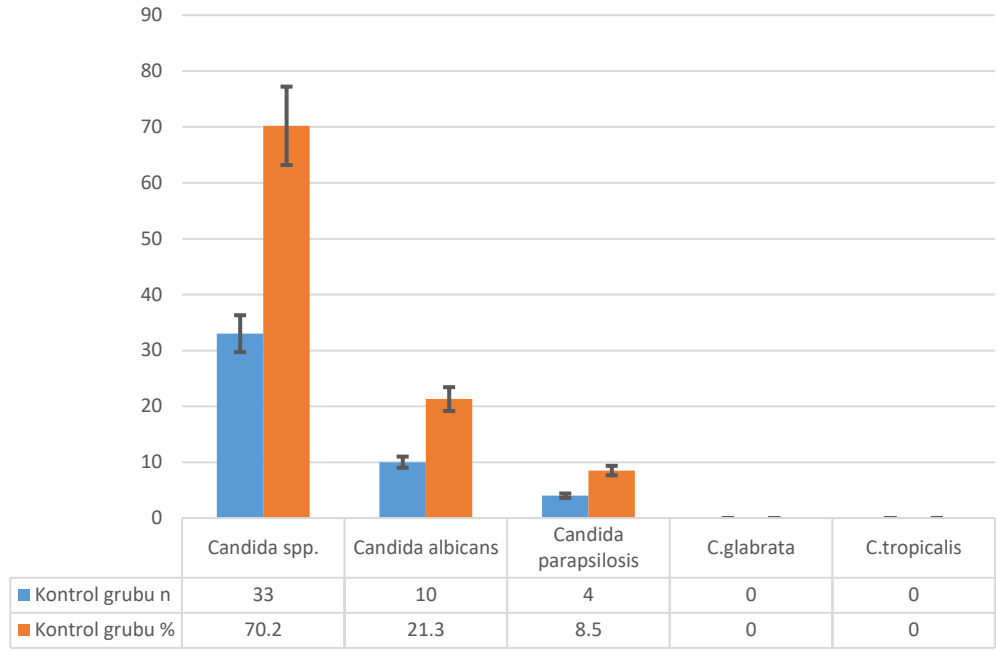
Resim5. *Msp* I restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli *Candida* türlerinin kesim görüntüsü. 1000bp DNA Ladder (1,16), *C. albicans* (2,3,5,7,8,9,10,11,13,15), *C. parapsilosis* (12), *Candida spp.* (6).

Çalışmaya dahil edilen kök kanal tedavisi olan hastaların ise %49'u erkek, %51'i ise kadın hastalardan oluşmaktaydı. Yani çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylerin kadın erkek oranı arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil 3. Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan fragment analizi sonucu Candidaların tür dağılımı.

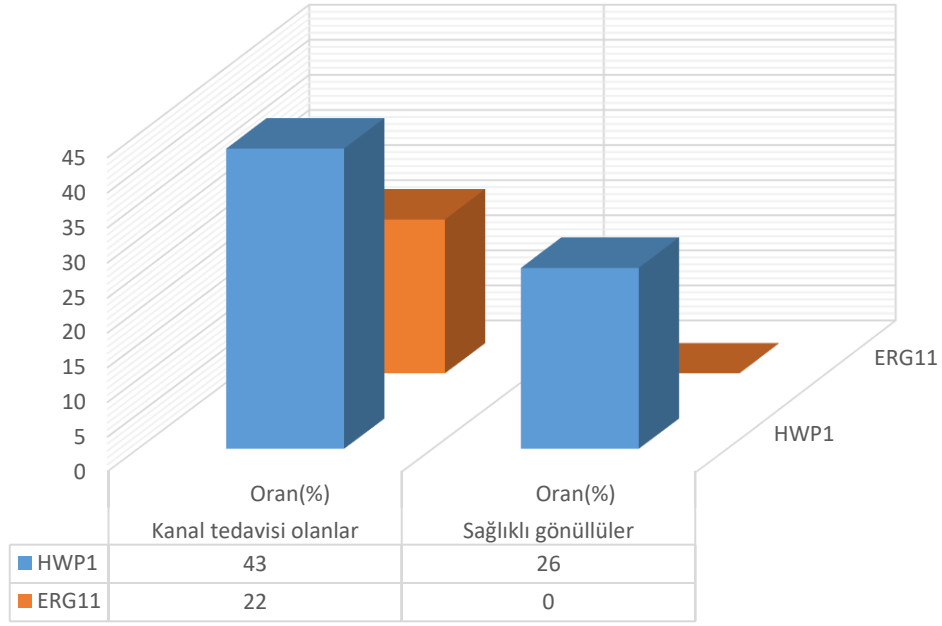
Çalışmada hasta grubunda RLFP yöntemi ile Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan genotiplendirme sonucu izolatların büyük çoğunluğunun *C. albicans* (%61.8; 89/144) olduğu tespit edilmiştir. Bunu aynı oranda izolasyon yüzdesiyle (%11.8; 17/144) *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın takip ettiği görülmektedir. Hasta grubunda en düşük düzeyde izole edilen tür %0.7 (1/144)'lik oranla *C. tropicalis* olurken, çalışmada %13.9 (20/144)'lik bir orandaki izolatların ise RFLP bant profili tanımlanamamış olup, *Candida spp.* olarak belirtilmiştir.



Şekil 4. Kontrol grubunda Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan fragment analizi sonucu Candidaların tür dağılımı.

Çalışmada sağlıklı kontrol grubunda Msp I enzimi hazmı sonucunda izole edilen suşların oldukça büyük bir kısmı tanımlanamazken, *C. albicans* izolasyon oranının %21.3 (10/47), *C. parapsilosis* izolasyon oranının ise %8.5 (4/47) olduğu saptanmıştır. Hasta grubunda RLFP yöntemi ile Msp I restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan genotiplendirme sonucu izolatlar arasında *C. glabrata* ve *C. tropicalis* kökenlerine rastlanırken, sağlıklı kontrol grubundan izole edilen suşlar arasında bu iki candida türünün bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4 ve 5).

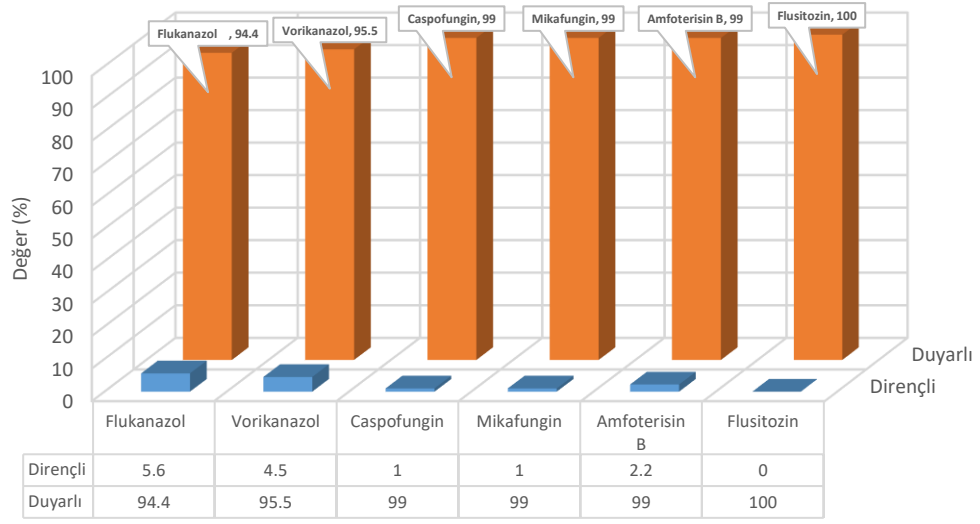
Çalışmada Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda Candida türlerinin özellikle oral enfeksiyona yol açan türleri arasında önemli rolü olduğu bildirilen HWP1 virülans geni frekansı ile azol direncinden sorumlu olduğu bildirilen ERG11 geni ekspresyon oranları da araştırılmıştır.



Şekil 5. Hasta grubu ile kontrol grubunda HWP1 ve ERG11 direnç geni varlığı.

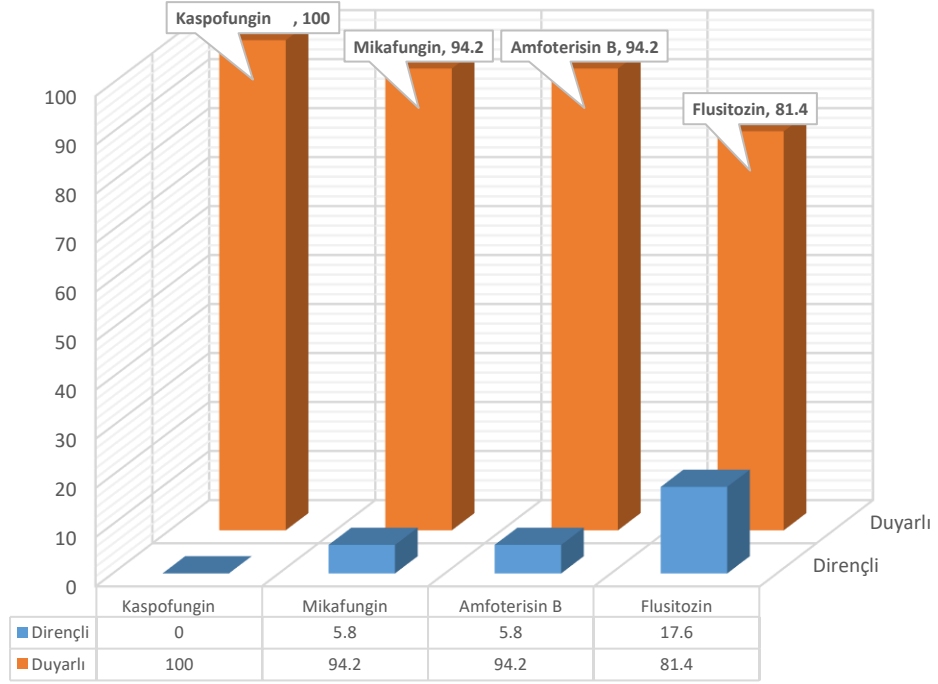
Şekil 6'da görüldüğü gibi hasta grubunda HWP1 geni frekansı %43 olarak tespit edilirken bu oranın sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylerde %26 olduğu tespit edilmiştir. HWP 1 geni varlığı açısından hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu görülmektedir ($p < 0.01$).

Sağlıklı kontrol grubunda azol direncinden sorumlu olduğu bilinen ERG 11 geninde herhangi bir mutasyon saptanmazken, hasta grubunda ERG 11 geni mutasyon frekansının %22 olduğu tespit edilmiştir. ERG 11 geni frekansı bakımından hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında da istatistiksel açıdan anlamlı derecede farkın olduğu görülmektedir ($p < 0.001$).



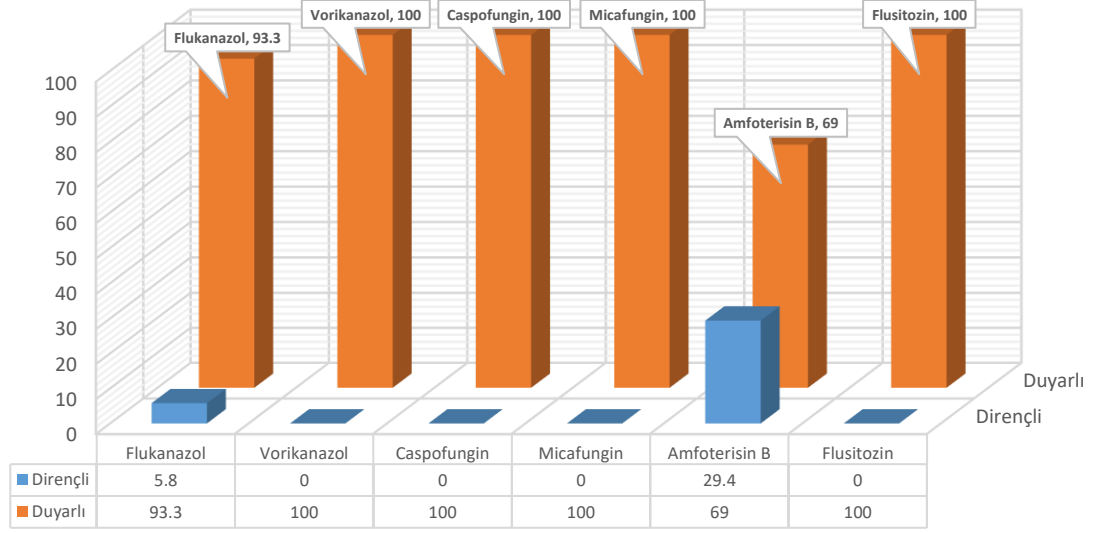
Şekil 6. *Candida albicans* türlerinde antifungal ilaç direnç oranları.

Çalışmada fenotipik yöntemlerle *Candida* türlerinde ilaç direnç profilleri de araştırılmıştır. Hasta grubundan izole edilen *C.albicans* türleri arasında en yüksek düzeyde direncin azol grubu ilaçlardan flukanazole karşı (%5.6) elde edildiği görülmektedir. Bunun yanında bu kökenlerde benzer şekilde azol grubu ilaçlardan vorikanazole karşı direnç oranı %4.5 olarak bulunurken, kaspofungin, mikafungin ve karşı direnç varlığı (%1) olup, amfoterisin B'ye karşı direnç oranı %2.2 olarak tespit edilmiştir. *C.albicans* kökenlerinde flusitozin direncinin saptanmadığı görülmektedir.



Şekil 7. *Candida glabrata* türlerinde antifungal ilaç direnç oranları.

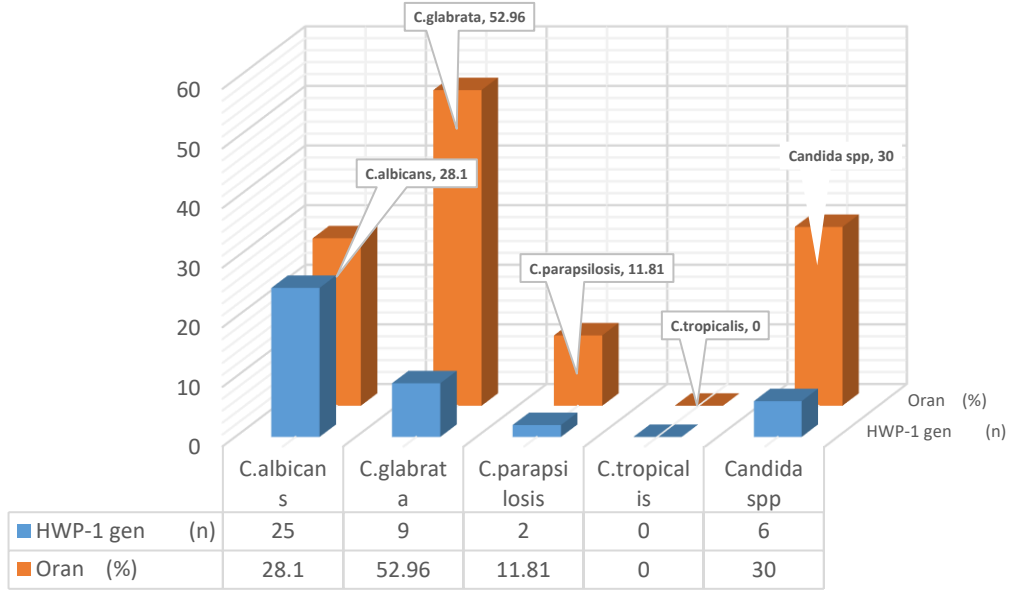
Şekil 8’de de görüldüğü gibi *Candida glabrata* izolatlarında flusitozin direncinin %17.6 olduğu tespit edilirken, mikafungin ve amfoterisin B’ye karşı *C.glabrata* kökenlerinin %5.8’sinin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu kökenlerde kaspofungine karşı ise direnç gelişmediği saptanmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. *Candida parapsilosis* türlerinde antifungal ilaç direnç oranları.

Çalışmada *C. parapsilosis* kökenlerinde ise en yüksek direncin amfoterisin B (%29.4)'ye karşı görüldüğü tespit edilirken, ikinci sırada yüksek direncin flukanazole karşı (%5.8) geliştiği saptanmıştır. *C.parapsilosis* kökenlerinde diğer antifungallere karşı ise herhangi bir direnç gelişmediği tespit edilmiştir.

Çalışmada bir örnekte *Candida tropicalis* saptanmış olup herhangi bir antifungal ilaç direnci saptanmamıştır.



Şekil 9. Hasta örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinde HWP-1 geni varlığının türlere göre dağılımı.

Çalışmada izole edilen *Candida* kökenlerinde HWP geni varlığının türlere göre dağılımı Şekil 10'da görülmektedir. *C.albicans* kökenlerinin %28.1 HWP1 geni varlığı saptanırken, *C.glabrata* kökenlerinde bu oranın %52.9, *C.parapsilosis* kökenlerinde ise %11.8 olduğu tespit edilmiştir. Diğer *Candida* kökenlerinde ise HWP geni frekansının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5: Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen türlerde HWP1 gen frekansının cinsiyete göre dağılımı

Tür(n)	HWP-1 gen (n)				HWP1 (%)
	Erkek		Kadın		
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
<i>C.albicans</i> (25)	9	36	16	64	28.1 (25/89)
<i>C.glabrata</i> (9)	8	89	1	11	52.9 (9/17)
<i>C.parapsilosis</i> (2)	0	0	2	100	11.8 (2/17)
<i>C.tropicalis</i> (0)	0	0	0	0	0
<i>Candida spp.</i> (6)	1	17	5	73	30 (6/20)

Tablo 6:Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen türlerde HWP-1 virulans geni frekansı

Tür(n)	HWP-1 gen (n)	(%)
<i>C.albicans</i> (89)	25	28.1
<i>C.glabrata</i> (17)	9	52.9
<i>C.parapsilosis</i> (17)	2	11.7
<i>C.tropicalis</i> (1)	0	0
<i>Candida spp.</i> (20)	1	5

Çalışmamızda kök kanal tedavisi olan hastalardan alınan 144 örnekten 124'ü Msp1 restriksiyon enzimiyle yapılan RFLP ile tanımlanmış olup bu izole edilen bütün suşların mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan antifungal ilaç duyarlılıkları saptanmıştır.

Tablo 7. Kök kanal tedavisi olan hastalardan izole edilen 124 örneğin mikrodilüsyon antifungal duyarlılık sonuçları.

Candida türleri	Antifungal ilaçlar	MİK Değerleri(mg/l)								
		≥ 64	≥ 16	≥ 8	4	2	≤ 1	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,12$
<i>C. albicans</i> (89)	Flukanazol		1	3	2		3	80		
	Vorikanazol				1	1		1	2	84
	Caspafungin			1					3	85
	Micafungin				1					7
	Amfoterisin B				1		24	47	17	
	Flusitozin					9		80		
<i>C. glabrata</i> (17)	Caspafungin								3	14
	Micafungin							1		4
	Amfoterisin B		1				3	3	10	
	Flusitozin	2				1	14			
<i>C. parapsilosis</i> (17)	Flukanazol			1		1	1	14		
	Vorikanazol									17
	Caspafungin							1	1	15
	Micafungin							2		14
	Amfoterisin B		1			3	9	3	1	
	Flusitozin					4	13			
<i>C. tropicalis</i> (1)	Flukanazol							1		
	Vorikanazol									1
	Caspafungin									1
	Micafungin									
	Amfoterisin B								1	
	Flusitozin						1			

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kök-kanal tedavisi yapılan hastalarda Candida PCR-RFLP yöntemiyle genotiplendirmesini, izolatların antifungal ilaçlara direnç profillerinin belirlenmesi, azol direnç geninde polimorfizm varlığı ile Candida kökenlerinde hifal duvar proteini geni (HWP1) varlığı araştırılmıştır.

Candida türleri sağlıklı insanların %80'inden fazlasının ağız mikrobiyotası içinde kommensal olarak bulunan mayalardır (142). Candida,'lar sağlıklı çocuklar, genç erişkinler ve hastanede yatan hastaların ağız florasında yüksek insidanda seyredabilmektedir. Candida türlerinin non-patojenik bir kommensalden patojenik bir mikroorganizmaya geçişi oldukça komplike bir durum arz etmekte olup, konak predispozisyonu ve kandidal virülans faktörleriyle alakalıdır. Oral kandidoz gelişiminin Candida'ların virülans faktörleri ile konakçı savunması arasındaki balansı bozulmasıyla oluşabildiği bildirilmektedir. Candida türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonlar (kandidozis) sıklıkla lokalize ve yüzeysel olsa da, ciddi derecede immün sistemi baskılanmış hastalarda, sistemik kandidoz (invazif kandidoz) geleşebilmekte ve yüksek mortalite ile seyredabilmektedir (2). İnfeksiyonlarında Candida'lar psödomembranöz, eritözmatous ve kronik hiperplastik form olarak tanımlanan üç farklı klinik tablo ve protez stomatit, angule rcheilit, median rhomboid glossit ve lineer dişeti eritemi gibi lezyonlarla karakterize edilmektedirler(2).

Candida türleri arasında *C. albicans* ağız boşluğunda en sık saptanan tür olup, albicans dışındaki *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis* (6) gibi türlerin de özellikle son yıllarda artan izolasyon oranları dikkatleri çekmektedir. Mukozal kandidoza ek olarak, Candida türlerinin diş çürüğü ve periodontal hastalıklarda en yaygın iki oral bulaşıcı hastalıkta rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak her iki hastalık için de Candida türlerinin primer bir koryojenik veya periodontal patojen olarak sınıflandırılmayacağı

bildirilmiştir. Çalışmalar Candida türlerinin bu iki hastalığın patogenezinde klasik bakteriyel patojenlerin yanında sekonder etkenler olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (10,11).

Bizim çalışmamızda kök kanal tedavisi almamış olan sağlıklı kontrol grubunda Msp I kesim enzimi ile tanımlanan suşların %21.3'ünün *C. albicans*, %8.5'inin

C. parapsilosis olarak tanımlanmıştır. Kök kanal tedavisi yapılmış hasta grubunda ise literatürle uyumlu olarak en yüksek frekansta (%61.8) *C. albicans* kökenleri izole edilmiştir. *C. albicans*'ı *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'in takip ettiği tespit edilmiştir.

PCR-RFLP yöntemiyle Msp I kesim enzimi ile dört farklı türün varlığı tespit edilmiştir.

Candida türlerinin prevalansının %0.5-55 arasında değişebildiği ve Candida'ların endodontik patolojilere yol açabilmesinin virülans faktörleriyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (9). Candida'ların çevre koşullarına kolayca adaptasyon sağlayabilecekleri, dentin ve kök dolgu malzemeleri dahil olmak üzere birçok yüzeye adezyon yapabildikleri, ayrıca biyofilm oluşturabildikleri, hidrolitik enzimler üretebildikleri, morfolojik geçişe uğrayabildikleri ve konak savunmasını inhibe ve modüle edebilecekleri bildirilmiştir (8,20). Candida türlerinin sekonder kalıcı endodontik enfeksiyonlarda primer enfeksiyonlardan daha yaygın izole edilebildiği bildirilmiştir (8).

Endodontik enfeksiyonlarda Candida türlerinin frekansı konusunda çok sayıda çalışmaya rastlanabilse de endodontik bir patojen olarak Candida türlerinin rolü hala tartışmalıdır. Kök kanalı enfeksiyonlarında Candida türlerinin prevalansı konusunda yapılan bir çalışmada kandida türlerinin prevalansının %8.2 olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada en sık izole edilen Candida türünün ise *C. albicans* olduğu bildirilmiştir (24).

Mantarlar arasında Candida türleri potansiyel bir endodontik patojenin özelliklerine sahiptir. Endodontik enfeksiyonlarda nekrotik pulpada kolonileşen herhangi bir mikrobiyal patojen periradiküler hastalıkların patogenezinde rol oynayabilmektedir. Bununla birlikte endodontik enfeksiyonlardan yüksek oranda

izole edilmeyen türlerin de endodontik hastalıkların patojenizinden konak savunmasıyla ve patojenin virulansı ile ilişkili olarak infeksiyonlara sebep olabileceği bildirilmektedir (142). Enfekte olmuş kök kanallarındaki bakteriler üzerinde araştırma yapan bilim adamları sınırlı sayıda mikroorganizma türünün periradiküler hastalıklardan daha sık olarak izole edilebildiğini, bazı mikroorganizma türlerinin ise apatojenik olarak bulunabileceğini bildirmişlerdir. Literatürde mantar türlerinin ve endodontik enfeksiyonların birlikteliğiyle ilgili çeşitli çalışmalar mevcut olup çelişkili sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (143).

Candida türleri arasında *C.tropicalis*'in sağlıklı ve diyabetik bireylerin ağız boşluğunda bulunan en yaygın albicans dışı Candida türü olduğu bildirilmiştir (144,145).

Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak sağlıklı kontrol grubunda *C tropicalis* saptanmadı, hasta grubunda ise %0.7 lik bir oranda *C. tropicalis* izolatu tespit edilmiştir.

Çeşitli diş hastalıkları şikayetleri ile polikliniklere müracaat eden hastalarda prevalans, sıklık ve predispozan faktörlerin yanı sıra oral kandidiyazis antifungal duyarlılık paternlerinin değerlendirildiği bir çalışmada tüm türlerin tanımlanması standart mikolojik yöntemlere ve antifungal duyarlılık testi, disk difüzyon duyarlılık yöntemi kullanılarak yapılmış, çalışmada Candida'ların oral taşınma sıklığının %64 olduğu bildirilmiştir. Çürük, plak, dişeti iltihabı, periodontit gibi diş problemleri olanların ağız boşluğundaki Candida türlerini barındırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada en sık izole edilen tür %41.7'lik oranla *C. albicans* olurken, bunu %27.1'lik oranla *C.glabrata* ve %11.5'lik izolasyon oranıyla ise *C.dublinsiensis*'in takip ettiği tespit edilmiştir (16).

Çalışmamızda ise literatürle uyumlu olarak en yüksek düzeyde türün *C.albicans* olduğu ve %11.8'lik oranla ikinci sıklıkta izole edilen türlerin ise *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* türleri olduğu tespit edilmiştir.

Aynı çalışmada *C. albicans*'in antifungallerden azollere karşı yüksek oranda dirençli olduğu tespit edilirken, *C. dublinsiensis*'in ise flusitazine karşı oldukça düzeyde dirençli olduğunu saptanmıştır.

Bu çalışmayla uyumlu olarak kök kanal tedavisi yapılan hastalardan izole ettiğimiz *C. albicans* kökenlerinde en yüksek düzeyde azol direnci tespit edilmiştir.

Mikroorganizmalar pulpal ve periradiküler hastalıkların çoğunda etiyolojik ajan olarak kabul edilmektedir. Bu tür ağız enfeksiyonlarında bakteriler çok fazla araştırılırken, mantarların endodontik enfeksiyonlara katkısı hep ihmal edilen bir konu olagelmıştır. Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda *C. albicans*'ın endodontik enfeksiyonlardan en sık izole edilen mayalar olduğu bildirilmiştir. Candida enfeksiyonlarında etkenin idendifikasyonu, etkili tanı ve tedavisinin planlamasının büyük önem taşıdığı bildirilmiştir. Kök kanal enfeksiyonlarında *C. albicans* frekansının saptanması için yapılan bir çalışmada, çalışmaya primer endodontik enfeksiyonlardan alınan 50 kök kanal örneği alınmış çalışmada *C. albicans* prevalansının %8 olduğu tespit edilmiştir (12).

Endodontik hastalıklar toplam dental hastalıkların %30-40'ını oluşturmaktadır. Endodontik enfeksiyonlarda tedavi başarısızlığının en önemli ve sık sebebinin mikroorganizmaların tedaviden sonra varlığının devam etmesi olduğu bildirilmiştir (146). Bir çalışmada mikrobiyotanın endodontik enfeksiyonlarda önemli bir engelleyici olduğu bildirilmiştir (147). Endodontik patolojiye dahil olan kök kanal mikrobiyotasının anlaşılması, kök kanal terapisinin başarısını büyük ölçüde geliştirmiştir. Kök kanal sisteminde bulunan çok çeşitli mikroorganizmaların bulunması sebebiyle klasik geniş spektrumlu tedavi planı modelinde değişme meydana gelmiştir. Ayrıca, dirençli mikroorganizmaların özelliklerini ve bunları yok etme yöntemlerini araştırmayı amaçlayan geniş çapta çalışmalar da yapılmıştır (148). Endodontik enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyal olup, primer enfeksiyonlarda anaerobik bakterilerin kanal sisteminde dominant olarak bulunduğu bildirilmektedir (13). Bununla birlikte primer enfeksiyonlara kıyasla daha düşük prevalansta seyreden mantar enfeksiyonları da endodontik enfeksiyonlarda gözardı edilmemelidir. Birçok çalışma endodontik enfeksiyonlardan mantarların sorumlu olabileceğini göstermektedir (14,15). *C. albicans* enfekte olmuş kök kanallarından en sık izole edilen potansiyel olarak patojenik önemli maya türlerinden biridir (20,149). Endodontik enfeksiyonların etiyolojisinde %1-7 oranında sorumlu olduğu

bildirilmiştir (150). Birçok çalışmada ise primer endodontik enfeksiyonlarda *C.albicans*'a odaklanılmıştır.

Kök kanal enfeksiyonları mikroorganizmaların etkileşmesi sonucu meydana gelen ve genellikle miks bir enfeksiyon olarak nitelendirilmektedir. Kök kanal enfeksiyonlarında Grampozitif koklar ile zorunlu anaeroblar dışında mantarların da önemli rol oynayabileceği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Candida türleri esas olarak kök dolgulu dişlerde, enfekte olmuş kök kanallarını istila eden fırsatçı invaziv özelliklerine bağlı olarak endodontik bozukluğun potansiyel bir nedeni olarak bildirilmektedir (151). Kök kanal enfeksiyonlarında mantarların etken olabileceğine dair ilk çalışma Grossman tarafından yapılmıştır (152). Ancak bu ilk raporda Candida'ların primer kök kanal enfeksiyonlarındaki varlığı dikkate alınmamıştır.

Candidalar insanlarda en sık karşılaşılan fırsatçı fungal patojenlerdir. Kalıcı veya refrakter periradiküler hastalıklarda Candida'ların primer mikroorganizmalar olabileceği bildirilmiştir. Dünya popülasyonunun yarısından fazlasının ağız boşluğunda Candida'ların yerleşen olduğu bildirilmiştir (153).

Candida türleri konakçı dokuları istila ettiğinde, hastalık gelişimine neden olmaktadır (154). Candida'ların zararsız bir bileşenden patojenik bir organizmaya geçişi çeşitli virülans faktörlerin bulunmasıyla alakalıdır. Bu faktörler arasında adezin faktörler, hifal oluşum, çeşitli enzim sekresyonları sayılabilir (20).

Yapılan çeşitli çalışmalarda primer tedavi edilmemiş kök kanalı enfeksiyonlarında *C.albicans*'ın %1-17 arasında değiştiği bildirilmektedir (8,155-157). Bir çalışmada (14), apikal dokuz biyopsi örneğinin altısında Candida'ların izole edildiği bildirilmiştir. Candida türlerinin farklı oral bölgelerdeki prevalansının araştırıldığı bir çalışmada ise (158) kök kanallarının %55'inin Candida hücreleri içerdiğini bildirilmiştir.

Son dönemlerdeki kök kanal enfeksiyonlarında PCR yöntemi ile yapılan araştırmalarda Candida prevalansının yüksek oranlarda saptandığı bildirilmiştir (150,159). Aynı çalışmada ayrıca kök kanal tedavisinin başlangıcında düşük

titrelerde olduğu saptanan *Candida* türlerinin tedavi prosedürleri sırasında çok daha yüksek titrelere ulaşabildiği de bildirilmiştir (150).

PCR gibi moleküler teknikler kültür yöntemlerinden daha duyarlı olup, moleküler yöntemler kullanılarak daha fazla mikrobiyal tür tanımlanabilmektedir (26). Bununla birlikte, moleküler teknikler mikroorganizmanın canlılığı hakkında bilgi veremediği için tam olarak kültür yöntemlerinin yerini alamamaktadır (160). *Candida* infeksiyonlarının etkili tedavi planlamasının yapılabilmesi için kültür yöntemleri altın standart olarak kabul edilmektedir.

Endodontik enfeksiyonlarda *Candida*'lar bakteriyel enfeksiyonlar söz konusu olduğunda daha az önemli gibi görünse de, kök kanalları enfeksiyonlarının en önemli sebepleri arasında gösterilmektedir. Primer kök kanal enfeksiyonlarında ve refrakter periodontitte *Candida*'ların tanımlanması, ilaç direnç profillerinin belirlenmesi tedavi başarısı açısından son derece önemlidir (150).

Çalışmamızda *C.albicans* kökenlerinin flusitozin dışında kullanılan tüm ilaçlara karşı (flukanazol, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B) dirençli suşlarının olduğu tespit edilirken, *C.glabrata* kökenlerinde flusitozin direncinin oldukça yüksek (%17.6) olduğu tespit edilmiştir. *C.glabrata* kökenleri doğal azol dirençli kabul edildiğinden azol direnç testi çalışılmamıştır. Bu kökenlerde mikafungin ve amfoterisin B'ye karşı direncin %5.8 olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada izole edilen *C.parapsilosis* kökenlerinde amfoterisin B direnci yüksekliği (%29.4) de dikkat çekici boyutlarda olduğu tespit edilmiştir.

İmmünkompetan hastaların oral mukozaları ile pulpa nekrozu olan hastalarda *Candida* türlerinin tanımlanması planlanan bir çalışmada, 82 immünokompetan hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada kök kanallarından ve oral mukozadan numuneler alınmış, yedi farklı *Candida* türü (*C.albicans*, *C.dubliniensis*, *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.parapsilopsis*, *C.tropicalis* ve *C.glabrata*) tanımlaması yapılmıştır. Tanımlan yedi türün tamamı oral mukozada mevcutken, *C.parapsilopsis* ve *C.glabrata* nekrotik kanalların periapikal bölgelerinden izole edilememiştir. Oral mukozadan izole edilen tüm numuneler göz önüne alındığında, *C.albicans* frekansının nekrotik kanalların periapikal bölgelerden izole edilenlerden çok daha

fazla olduğu tespit edilmiştir (150).İki grup arasında *C. albicans* izolasyon oranları bakımından anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.050$).

Ağız boşluğundaki rezervuarlarda bulunan mikroorganizmalar çeşitli enfeksiyonların oluşması için bazı durumlarda enfeksiyon kaynağı olabilmektedirler. Sözelimi dentin-pulp kompleksi enfekte olduğunda mikroorganizmalar pulpayı ve kök-kanal sisteminde istila ederek enfeksiyonlara sebep olmaktadır (162). Bu mikroorganizmaların çoğu fırsatçı patojenlerdir. Sağ kalımları ve enfeksiyon oluşturabilme yetenekleri kök kanalındaki oksijen basıncı, redoks potansiyeli, pH, sıcaklık ve besin varlığı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (163). Bu mikroorganizmaların patojenite oluşturabilmelerindeki en önemli kriterler arasında mikroorganizmanın sahip olduğu virülans faktörleri (mikrobiyal kapsül, fimbria, pili, lipopolisakarit, enzimler, yağ asitleri, amonyak gibi)'nin oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (26).

Çalışmamızda hifal duvar proteini geni (HWP-1) varlığı hasta grubunda en yüksek oranda (%52.96) *C. glabrata* kökenlerinde tespit edilirken, *C.albicans* suşlarının %28.1'inde ve *C.parapsilosis* suşlarının ise %11.81'sinde pozitif bulunmuştur.

Kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların dentin duvarlarındaki tübüllerin 150-250 µm derinliğine kadar inebilecek kabiliyette olduğu ve kök-kanal tedavisi sırasında kullanılan irriğanlar veya ilaçlar tarafından elimine edilemeyecekleri bildirilmiştir (26). Dentin-pulp kompleksinin enfeksiyonu, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan nekrozun bir sonucu olarak veya mikroorganizmaların nekrotik dokuları kolonize etmesinden kaynaklı olarak (164) meydana gelebilmektedir. Bazı mikroorganizmalar hematojen olarak kronik apikal ve periapikal süreçlerden kalp kapakçıklarına, protetik cihazlara ve diğer metastatik odaklara yayılabilmektedir (164).

Candida türlerinin septik nekrozlu kapalı kronik periapikal lezyonu olan tek köklü dişlerde enfeksiyon etkeni olarak izole edilebileceği bildirilmiştir. Oral mukozadan en sık izole edilen türlerin *C. albicans* ve *C. tropicalis* olduğu, septik nekrozlu periapikal kanal bölgesinden en sık izole edilen türlerin ise *C. albicans* ve *C. dubliniensis* olduğu bildirilmiştir (161).

Kök-kanal enfeksiyonu en önemli ağız sağlığı problemi olup kök kanalı içindeki mikrobiyal flora kaynaklı gelişmektedir. Kök-kanal sistemi enfeksiyonları mekanik travma, diş aşınması ve diş restorasyonunun veya diş kırığının mikro sızıntısı nedeniyle oluşabilmekte ve diş pulpasının ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Bu sistem içinde enfeksiyöz etkenler olarak karşımıza çıkan mikroorganizma gruplarından biri Candida'lardır. Genellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* gibi fırsatçı patojenlerin bu tip enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Bu türler öncelikle oral bakteriyel çeşitliliği ve ayrıca antibiyotik direncini etkilemektedirler. Candida türleri intrakanal ilaçlara karşı duyarlı olmalarına rağmen, sahip olduğu çeşitli virülans faktörleri mikroorganizmaların kök kanallarına yapışmalarını ve bu kanallara girmelerini sağlamaktadır. Bazen mikroorganizmanın çoğalması tedavi sırasında yapılan tedavi yanlışlıkları sebebiyle artabilmektedir. İntrakanal ilaçlarda uygulanan solüsyonlar sıklıkla toksisiteye neden olduğundan, doku nekrozu ve dentin kök-kanalındaki sertliğini ve yapısal stabilitesini azaltabilmektedir (165,166).

Kök kanal sistemi dişin yapısında merkez kanal olarak yer almakta ve diş pulpasını oluşturmaktadır. Diş pulpasının ölümü termal hasara bağlı diş çürüğüne, öğütme işlemine bağlı mekanik travma ve diş aşınması, diş restorasyonu veya diş kırığına bağlı mikro sızıntı nedeniyle oluşabilmektedir (17). Genellikle bu durum *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.dubliniensis* (18) gibi fırsatçı patojenlerin üremesini kolaylaştırmakta ve tetiklemektedir. Bu türler primer olarak oral bakteriyel çeşitliliği ve aynı zamanda antibiyotik direncini de etkilemektedir. Candida türleri intrakanal ilaçlara karşı hassas olmalarına rağmen virülans faktörleri kök kanallarına yapışmalarını ve bu kanallara girmelerini kolaylaştırmaktadır (19). İntrakanal tedavide uygulanan solüsyonların sıklıkla dentin içindeki kök kanalının yapısal stabilitesini azaltabilmekte, dentin sertliğinin olumsuz etkilenmesine ve doku nekrozuna sebep olan toksik etkileri bulunmaktadır (148).

Candida'larda flukonazol direnç mekanizmalarının araştırılması için yapılan bir çalışmada flukonazole dirençli izolatlarda ERG11 geninde nokta mutasyonlarının varlığının önemli olduğu bildirilmiştir (167).

Son yıllarda hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonların sıklığı dünya çapında önemli artışlar göstermektedir. Fırsatçı fungal ajanlarla enfekte hastaların çoğunun AIDS veya neoplastik ve/veya dejeneratif hastalıklara sahip olduğu dikkate alınırsa etkili antifungal tedavinin çok önemli olduğu açıktır. Son zamanlarda antifungal duyarlılık testlerinin performanslarındaki ve standardizasyonundaki iyileştirmelerle birlikte, antifungal ilaç direnci sorunu nedeniyle tedavi başarısızlığı görülmektedir (168). Hastaneye yatış yapan hastalarda mantar enfeksiyonlarının en önemli sebebi oral, vajinal ve sistemik enfeksiyonlara neden olan patojenik bir maya olan *Candida*'lardır (169). Flukonazol ve itrakonazol gibi triazol ilaçlar sıklıkla *Candida* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte dirençli suşlar sıklıkla uzun süreli veya profilaktik tedavi sırasında ortaya çıkmaktadır. Flukonazol direncinin iki major mekanizması tanımlanmıştır (170). Bunlardan birincisi; ilaç hedefinde değişikliklerin meydana gelmesi (14- sterol metilaz, ERG11 geninin ürünü), ve bir diğeri ise bu durumun enzim üretim seviyesinin artması veya flukonazol için düşük bağlanma afinitesine neden olmasıdır.

Çalışmamızda azol direncinden sorumlu olan ERG11 geninde izolatların %22'sinde polimorfizm varlığı tespit edilirken, sağlıklı kontrol grubunda ERG11 geninde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. Hasta kontrol grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında ERG11 geninde mutasyon tespit edilmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$).

Günümüzde *Candida glabrata* insan fungal enfeksiyonlarından en sık izole edilen *Candida albicans*'tan sonra ikinci sırada yer almaktadır. *C. albicans* ile karşılaştırıldığında *C. glabrata* fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en yaygın ajanlar olan azollere daha dirençlidirler. *C. albicans*'daki azol grubu ilaçlara direnç mekanizmaları *C. glabrata*'ya göre daha iyi araştırılmıştır. Toplam 81 *C. glabrata* klinik izolatında azol direncinin araştırıldığı bir çalışmada suşların %22'sinin flukonazol dirençli, %16'sının ise diğer azollere (vorikonazol, posakonazol ve itrakonazol) çapraz dirençli olduğunu bildirilmiştir. Çalışmada Flukonazole dirençli bir izolat aynı zamanda vorikonazole çapraz dirençli bulunmuş olup, izolatların sadece %7'sinin vorikonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tüm suşların ekinokandinler ve amfoterisin B'ye karşı duyarlı oldukları ve suşların

%6'sının ise 5-fluorositazine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Flukonazole dirençli bütün suşlar ile sadece vorikonazole dirençli üç suş dahil olmak üzere, izolatların %51'inin ERG11 geni mutasyonu varlığı tespit edilmiştir (171).

Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda hasta grubundan izole edilen *C.albicans* (%2.2), *C.glabrata* (%5.8), *C.parapsilosis* türlerinde amfoterisin B direnç oranları sırasıyla %2.2, %5.8 ve %29.4 olarak tespit edilmiştir.

Candida cinsi yüz elliden fazla heterojen türden oluşmakta ve bunlardan en az 17'sinin insan ve hayvan enfeksiyonlarının etyolojik ajanları olarak bilinmektedir. *Candida* kaynaklı mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı başta bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sayısının artması nedeniyle son otuz yılda çarpıcı bir biçimde artmıştır. Günümüzde kandidiyazis %8-10 oranında olmak üzere hastane enfeksiyonlarının dördüncü en sık sebebidir. Halen sistemik kandidiazise bağlı kandidiyazis mortalitesi, enfeksiyon oluşturan *Candida* türüne bağlı olarak %15-35 arasında değişebilmektedir. *Candida* enfeksiyonlarının yıllık tedavi masraflarının sadece ABD'de 10 milyar doları aştığı bildirilmiştir. Çoğu vakada konağın bağışıklık baskılayıcı ve sitotoksik tedaviler, geniş spektrumlu antibakteriyel antibiyotiklerle tedavi edildiği, AIDS ve diyabet gibi bazı risk faktörlerine sahip olduğu bildirilmiştir. *Candida* enfeksiyonlarının önemli bir bölümünün konağın kendi endojen florası kaynaklı olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda non-albicans *Candida* türlerinin sistemik enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilse de, *Candida albicans*'ın insanlarda halen en çok ko-patojen olmaya devam ettiği bildirilmiştir. Avrupa'da üçüncü basamak bir pediatrik hastanede yapılan bir çalışmada, albicans dışı türlerin 2000'li yıllarda enfeksiyonlardan sorumlu olduğu oranın %12'lerden, 2010'lu yıllarda %70'lere kadar yükseldiği bildirilmiştir. Çalışmada en sık izole edilen albicans dışı türün *Candida glabrata* olduğu saptanmıştır. Bu tür diğer *Candida* türleri ile ilişkili bazı virülans faktörlerinden yoksundur. Örneğin hifal büyüme paterni, proteazları salgılama kabiliyeti ve konak doku yüzeyine etkin adezyon kabiliyeti gibi patojenite faktörlerine sahip olmaması, *C.glabrata* enfeksiyonlarının sayısında meydana gelen artışın esas olarak azollere duyarlılığının, mantar enfeksiyonlarının tedavisinde ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılan ajanlara duyarlılığının düşük olduğundan kaynaklandığına inanılmaktadır (172).

Çalışmamızda izole edilen *C.glabrata* türlerinin ilaç direnç oranlarının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu kökenlerde en yüksek ilaç direncinin flusitozine karşı (%17.6) olduğu tespit edilirken, amfoterin B ve mikafungin direncinin ise %5.8 olduğu tespit edilmiştir.

Candida cinsindeki diğer bazı türlere (özellikle *C.albicans*) benzer şekilde *C.glabrata*, oral kavitede, gastrointestinal ve vajinal yollarda doğal mikrobiyotanın bir üyesidir (173). Diğer maya türlerinin konakçı organizmadan azol kullanımı yoluyla ortadan kaldırılması, *C.glabrata*'nın dirençli suşlarının seçilmesine ve aşırı çoğalmasına sebep olarak gösterilmektedir. Bunun sonucu olarak *C.glabrata* mukozal zarların basit enfeksiyonlarından hayatı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara kadar değişen farklı klinik tablolara neden olmaktadır (174). *C.glabrata* izolatlarının azollere olan düşük duyarlılık düzeylerini etkileyen en önemli faktörler arasında ergosterol biyosentezinde yer alan genlerin, özellikle de ERG11 geninde görülen mutasyonların olduğu bildirilmiştir (173). Bazı çalışmalarda ise araştırmaların çoğu *C.albicans*'ın aksine, azole dirençli *C.glabrata* izolatlarının ERG11genindeki nokta mutasyonlarının nadiren görüldüğü veya hiç görülmediğini bildirmişlerdir (175,176).

Fırsatçı oral mantar enfeksiyonları, özellikle protez kullanan bireylerde yaygın olarak görülmektedir. Protez stomatit yaygın bir enflamasyon reaksiyonu olup, çok faktörlü etyolojiye sahiptir. Genellikle Candida türleri, özellikle *Candida albicans* ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *Candida albicans* yüksek virülansı, oral kavite dokuları ve protez yüzeyleri üzerinde biyofilm oluşturması ve adezyon kabiliyeti nedeniyle diş hekimliği uygulamalarında sıkça rastlanan protez ile ilişkili stomatitlerde oldukça önemlidir.

Tıpta gelişmelere bağlı olarak tüm dünyada özellikle de gelişmiş ülkelerde yaşlı nüfusun artması mantar enfeksiyonları prevalansının da artmasına yol açmıştır. Sözelimi yaşlı sayısındaki bu artış, çıkarılabilir oral protez gerektiren kişi sayısının da artışı anlamına gelmektedir ki, bu da mantar enfeksiyonları açısından oldukça önemli risk faktörüdür (177,178). Oral plağı protez aparatlarından ve dişlerden elimine etmek için uygun el becerisi olmayan daha yaşlı yetişkinler fırsatçı oral mukozal enfeksiyonlara, özellikle bakteri ve mantarlara karşı daha duyarlı olabilmektedir (179). Kemoterapi alan kanser hastaları ve insan immün yetmezlik

virusu bulaşmış hastalar gibi bağışıklığı baskılanmış kişi sayısının artması mantar kaynaklı enfeksiyonların son yıllarda çarpıcı bir şekilde artışına yol açmıştır (180).

Protez kullanan hastalarda *Candida* prevalansının %60-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (181). Bu durum protezlerin maya üremesini destekleyen lokal asidik ve anaerobik bir mikroortam üretmesi, oksijen ve tükürüğün altta yatan dokuya akışının azalması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca *Candidalar* protezlerin akrilik yüzeyleri ve dişler, diş dolguları (181) gibi yenilenmeyen yüzeyler için yüksek afiniteye sahiptir. Hidrofobiklik gibi protez bazlı akrilik reçinelerin yüzey özellikleri genel olarak biyofilm oluşumunda çok önemli bir adım olan adezyona katkıda bulunan faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (182). *Candida albicans*'ın biyofilm üretmesi sıklıkla protez stomatitinin oluşması ile ilişkilidir (183). Ancak *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* ve *C.dublinskiensis* gibi *albicans* dışı türler de bu enfeksiyonun gelişmesine katkıda bulunabilmektedirler (184). *Candida*'ların primer yerleşim yerleri; arka dil ve mukoza gibi diğer oral bölgelerdir. *Candida*'ların ürettiği biyofilmler diş yüzeylerini kaplamakta ve bu eşsiz ortamdaki hücreler konak savunmasına ve antifungal tedaviye dirençli hale gelebilmektedir (185). Biyofilmin etkin biçimde uzaklaştırılması hem kimyasal hem de mekanik olarak önemli bir zorluk oluşturmaktadır (186).

Hipokrat oral kandidiyazı “hastanın hastalığı” olarak tanımlamıştır (187). *Candida* enfeksiyonları üç klinik tipte sınıflandırılmaktadır: Birincisi lokalize basit inflamasyon veya pembe nokta hiperemisi ile karakterize olan tip I, ikincisi ve en sık görülen tip II; bu tip protezlerin kapladığı palatal mukozal alanların yaygın eritem ve ödemleri şeklinde karakterize edilen tiptir. Üçüncüsü ise santral damakta granüler yüzey veya inflamatuvar papiller hiperplazi ile kendini belli eden tip III'tür (188).

Kandidiyazisli hastalar yanma, acı hissi, tat değişikliği ve yutma zorluğu gibi çeşitli semptomlar gösterebilir, ancak çoğu kez asemptomatik olabilmektedir (189). Protez kullananlarda görülme sıklığına ek olarak, ağız boşluğundan *Candida* türlerinin immün sistemi baskılanmış hastalarda üst gastrointestinal sistemi kolonize edebileceği ve septisemiye yol açabileceği bildirilmiştir. Bu hastalarda ölüm oranının %40'lara çıkabileceği bildirilmiş olup daha uzun hastanede yatış ve yüksek sağlık maliyetleri gerektirebileceği de bildirilmiştir (190).

Candida albicans ve albicans dışı *Candida* türlerinin oral kandidiyaz hastalarında prevalansını incelemek için yapılan bir çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile 207 oral kandidiyazis hastasından izole edilen toplam 250 *Candida* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada en baskın tür olarak *C.albicans* tespit edilirken, *C.albicans*'ın non-albicans türlerden *C.glabrata* (%15.2), *C.tropicalis* (%10.4), *C.parapsilosis* (%3.2), *C.kefyr* (%3.6), *C.dublinsiensis* (%2), *C.lusitaniae* (%2), *C.krusei* (%1.6) ve *C.guilliermondii* (%0.4)'nin takip ettiği tespit edilmiştir. Birden fazla *Candida* türü ile karışık kolonizasyon oranının toplam vakaların %18'ini oluşturmaktaydı. Çalışmada non-albicans türlerinin %92'si biyofilm üretme yeteneğinde olduğu tespit edilirken, *C.albicans* türlerinde bu oranın %78 olduğu saptanmıştır.

Çalışmada ağız boşluğunda non-albicans türlerin kolonizasyon sıklığının giderek arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada en çarpıcı sonuçlardan birinin ise non-albicans türlerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin albicans türlerinden daha yüksek oranda bulunmasıdır (191).

Ciddi *Candida* enfeksiyonlarının başarılı tedavileri için uygun antifungal tedavi şarttır. Günümüzde sınırlı sayıda antifungal ilaç sınıfı mevcut olduğundan gerek tek ilaca ve gerekse de çoklu ilaca direnç tespit edilmesi başarılı hasta yönetimini büyük ölçüde engellemektedir. *Candida* türlerinde son yıllarda sık rastlanılan azol direnci, özellikle *Candida glabrata*'da ekinokandine karşı ve çok ilaca direnç durumu klinik başarının sağlanmasında en büyük zorluklardandır. Tarımsal uygulamalarda azol dirençli *Aspergillus fumigatus*'un yayılması ve çok ilaca dirençli *Candida auris* gibi ortaya çıkan tehditler de endişe verici olarak tanımlanmaktadır. İlaç direncine neden olan moleküler mekanizmalar daha az duyarlı türlerde doğal olarak meydana gelmektedir. İlaç direnç mekanizmaları; değişen ilaç-hedef etkileşimlerini, ilaç eflüks taşıyıcılarının aracılık ettiği azaltılan hücrel ilaç konsantrasyonlarını ve biyofilmlerle ilişkili olarak ilaç geçirgenlik durumlarını içermektedir. Her ne kadar *C.auris* doğal olarak ilaç dirençli olsa da, diğer suşlar tipik olarak çoklu ilaç direnç mekanizmalarının aşamalı olarak seçimi yoluyla direnç geliştirmektedir. İlaç tedavisi ile indüklenen hücrel stres uyumu arttırmaktadır. İlaça maruziyet direnç gelişiminde rol oynayan bir diğer önemli durumdur (84).

PCR tabanlı bir yöntem olan RFLP yöntemi ile immüno-kompromize hastalardaki *Candida* enfeksiyonlarının tanımlanmasında yöntemin gerekliliği ve yararlılığının değerlendirilmesinin hedeflendiği bir çalışmaya kanser ve febril nötropeni hastası olan 40 çocuk dahil edilmiş, PCR-RFLP yönteminin immüno-kompromize hastalardaki mantar enfeksiyonlarının teşhisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir (192).

İnvazif mantar enfeksiyonları lösemi gibi hastalıklarda ciddi morbidite ve mortalite sebebidir. Bu hasta gruplarında *Candida* türlerinin yol açtığı enfeksiyonlar %30-60 arasında değişen yüksek ölüm oranlarıyla seyretmektedir. Bu sebeple *Candida*'ların erken tespit ve tanısı, antifungal ilaç profillerinin belirlenmesi enfeksiyonun yayılmasını engellemek için oldukça önemlidir. Maalesef, mantarların morfolojik ve radyografik metotlarla tanınması günler ya da haftalar alabilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin zahmetli, zaman alıcı ve sık sık da yalancı negatif sonuçlar verebildiği bildirilmektedir.

PCR tabanlı DNA tespitine dayanan moleküler yöntemlerin kültür tabanlı testlerden daha duyarlı olabileceği bildirilmiştir. Bu testlerin avantajları arasında çok çeşitli türleri kapsamakta ve çok çeşitli numunelere uygulanabilmektedir (192).

Kandidiyazis farklı *Candida* türlerinin neden olduğu yaygın bir mantar enfeksiyonudur. *Candida* türlerinin klinik laboratuvarında hızlı tanımlanması, erken tedavi için etiyolojik ajanların tanımlanmasından ve ayırt edilmesinden bu yana giderek önem kazanmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen yaygın *Candida* türlerinin hem PCR-RFLP yöntemi kullanılarak hem de HWP1 geninin amplifikasyonu ile moleküler olarak tanımlanmasının amaçlandığı bir çalışmada vajinal, deri, balgam, bronkoalveolar lavaj ve kan kültürü örnekleri gibi çeşitli klinik örnekler toplanmıştır. İzolatlar MspI restriksiyon enzimi ile restriksiyon fragment length polimorfizm (PCR-RFLP) yöntemi ile tanımlanmıştır. Çalışmada en sık rastlanılan *Candida* türlerinin *C.albicans* (%44.6), *C.glabrata* (%20), *C.tropicalis* (%13.3), *C.krusei* (%8) ve *C.parapsilosis* (%7.3) olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada fenotipik olarak *C.albicans* olarak tanımlanan 67 izolattan 6'nın (%9) *C.dublinskiensis*, 4'ünün (%6) ise *C.africana* olduğu PCR-RFLP yöntemi ile tespit edilmiştir (193).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak gerek sağlıklı kontrol grubunda ve gerekse de kök kanal tedavisi almış olan hasta grubunda en yüksek oranda izole edilen türün *C.albicans* olduğu tespit edilmiştir. (Kontrol grubu: %21.3, hasta grubu: %61.8). Hasta grubunda izolasyon sıklığı albicans dışı kökenlerde *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis*'de sırasıyla %11.8, %11.8 ve %0.7 olarak tespit edilirken, sağlıklı kontrol grubunda ikinci en yüksek sıklıkta izole edilen türün *C.parapsilosis* olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında kontrol grubunda *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* kökenlerine rastlanmamıştır.

Kandidiyazis, özellikle insan immün bağışıklığı baskılanmış bireyler, intravenöz ilaç kullananlar, hematopoetik kök hücre ve organ transplantasyonu yapılanlar ile alta yatan kalp kapak hastalığı bulunan bireyler gibi konaklarda yaygın olarak görülebilmektedir. *C. albicans*, nozokomiyal kandidiazisin yaklaşık %80'inden sorumlu tutulsa da (194), albican dışı Candida türleri tarafından meydana getirilen Candida enfeksiyonları frekansında ciddi artışlar olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (195).

Candida türlerinin dağılımındaki epidemiyolojik değişikliklerin yanı sıra, bu mantarların bazılarının direncine bağlı olarak intrinsik veya edinilmiş direncin önemli artış gösterme eğilimi nedeniyle, Candida türlerinin doğru olarak belirlenmesi, etkili antifungal tedavi ve ayrıca nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi için oldukça önemli ve gereklidir. PCR-RFLP yönteminin Candida türlerini ayırt edebilen güvenilir, hızlı ve basit bir teknik olduğu belirtilmiştir. Candida türlerinin dağılımını değerlendirmek için bu PCR-RFLP yönteminin kullanıldığı bu çalışmada genomik DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonundan sonra polimorfizm analizi için Msp1 restriksiyon enzimi ile kesim uygulanmıştır. Çalışmada klinik örneklerden izole edilen 47 suşun genotiplendirilmesi yapılmış, ve tür dağılımının şöyle olduğu saptanmıştır. Çalışmada *C. albicans* en yüksek oranda (%36.2) izole edilen tür olurken bunu en sık görülen tür olduğunu, bunu *C.parapsilosis* (% 25.5), *C.tropicalis* (%19.1), *C.guilliermondii* (%14.9), *C.famata* (% 2.1) ve *C.krusei* (%2.1) takip etmiştir. Çalışmada PCR-RFLP yönteminin klinik Candida türlerinin tanınması için başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (196).

Önleyici stratejilerin antifungal ajanlar kullanılarak *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinden çok daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (197). Sadece sitokinler ve antimikrobiyal peptidler epitel tarafından doğuştan gelen immün sistem reaksiyonlarının mantarların aşırı üremesine karşı korunmada oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Defensinlerin *Candida* enfeksiyonlarının primer kontrolünde doğrudan fungusit aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (198). Laktik asit bakterileri gibi probiyotikler, doza bağımlı olarak *C.albicans* hif oluşumunu da kontrol etmekte kısmen ve daha yüksek konsantrasyonlarda fungusidal asiditeye neden olmaktadır.

Candida ile ilişkili protez stomatiti protez kullanan kişilerde yaygın bir mantar enfeksiyonudur. Protez stomatitli hastalardan izole edilen etken ajanlarının tür dağılımı ve *in-vitro* antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada toplam 134 *Candida* türü çalışmaya dahil edilmiş, türler ITS1 ve ITS4 primerleri içeren bir polimeraz zincir reaksiyonunu takiben MspI ve BlnI restriksiyon enzimleriyle kesilerek PCR-RFLP yöntemiyle tanımlanmıştır. Ayrıca *Candida* türlerinin fukonazol, terbinafin, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ketokonazol, amfoterisin B ve kaspofungine karşı direnç profilleri belirlenmiştir. Çalışmada en sık oranda izole edilen tür *C.albicans* (%62.6), ardından *C.glabrata* (17.2), *C.tropicalis* (%12) ve *C.parapsilosis* (%8.2) olarak tespit edilmiştir. Posakonazol en düşük MİK değerine sahip antifungal olurken, ardından amfotersin B, itrakanazol ve vorikonazol olarak saptanmıştır. Çalışmada flukanazol MİK değeri en yüksek antifungal olarak tespit edilmiştir (99). Bu çalışmayla uyumlu olarak çalışmamızda en sık izole edilen tür *C.albicans*'tan sonra %11.8'lik oranla *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* olmuştur. *C.albicans* kökenlerinden en yüksek ilaç direnci azollere karşı tespit edilirken, *C.glabrata* türünde en yüksek ilaç direnci flusitozine, *C.parapsilosis* kökenlerinde ise en yüksek ilaç direnci amfoterisin B'ye karşı elde edilmiştir.

Protez stomatitli hastalardan en sık izole edilen *Candida* türlerinin *Candida albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* olduğu bildirilmiştir (200). Patojenik fungal ajanların erken teşhisi ve antifungal ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi, enfeksiyonun tedavisi ve koruyucu sağlık hizmetleriyle ilgili önleyici stratejiler oluşturmak kritik öneme sahiptir (201). Son yıllarda, *albicans* dışı *Candida* enfeksiyonları ve antifungal dirençli izolatlar ciddi oranda artmıştır, bu nedenle

kandidiazisin tedavisi için güvenilir bir tanı yöntemi geliştirmek gereklidir (202). PCR-RFLP gibi moleküler bazlı bir yöntem patojenik *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan güvenilir ve hızlı bir tekniktir (203).

Candida türleri dişeti iltihabı, diş çürüğü de dahil olmak üzere ağız boşluğunda sık görülen bazı hastalıkların etiyolojik ajanlarıdır. İmmünokompetan hastaların diş plağından izole edilen *Candida* türlerinin prevalansı ve duyarlılık profillerini belirlemek için yapılan bir çalışmada 40 immünokompetan hastanın diş plaklarından izole edilen mayaların tiplendirilmesi için PCR-RFLP yöntemi ile, antifungal duyarlılıkları ise CLSI kriterlerine göre yapılmıştır. Çalışmada immün sistemi yetersiz hastaların diş plaklarından izole edilen *Candida*'ların büyük bir çoğunluğunun (%92.5) *C.albicans* olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada lulikanazol ve ekinokandinin etkinliğinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (204).

Diş plağı bakteri mantarlar gibi mikroorganizmaların dişlerde rutin olarak bulunan yapışkan biyofilmleridir (205). Genellikle problemliler olup, diş çürüğü oluşumuna katılabilirler Ayrıca farklı tür maligniteler, immün yetmezlik, zayıf ağız hijyeni, diş protezlerinin kullanımı, diyabet metabolik bozukluklar ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin sık kullanımı gibi predispoze edici faktörlerin varlığında sistemik hastalıkları tetikleyebilmektedirler (206).

Dental plakları ve ağız boşluğunu kolonize eden en önemli etken mantarlar farklı *Candida* türlerinden oluşan mayalardır. Özellikle konakçı ve mikroorganizma arasındaki denge bozulduğunda infeksiyöz özellik kazanabilmektedirler (207). Yüzlerce *Candida* türü içinde yirmiye yakın türün insan infeksiyonlarından izole edilebildiği bildirilmiştir. Bu türler arasında *Candida albicans* sağlıklı insanların veya tıbbi olarak zarar görmüş diş plaklarında ve ağız boşluklarında bulunmaktadır. Bununla birlikte, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* gibi diğer türlerin de oral sağlık problemlerinde rol oynadığı bildirilmektedir (208).

Genel olarak, flukonazol, nistatin ve itrakonazolün oral kullanımı, orofarengeal/özofageal kandidiyazis için tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Ancak ciddi vakalarda veya azole dirençli kandidiyazis için amfoterisin B tedavisi gerekebilmektedir. Günümüzde kandida infeksiyonlarının tedavisinde genellikle azol

bazlı tedaviler tercih edilmektedir. Ancak bazı *Candida* türlerinde azollere karşı kazanılmış veya doğuştan gelen direnç gösterilmiştir (209).

Candida türlerinin tanımlanması klinik açıdan oldukça önemlidir. Çünkü virülans ve ilaç direncinde her türün davranışı farklılık arz edebilmektedir. Bununla birlikte mevcut fenotipik yöntemler *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlamaları doğru olarak ayırt etmek için uygun olmayıp yetersiz kalabilmektedir. Bu sebeple *Candida*'ların tür tanımlamalarının yapılabilmesi için moleküler bazlı yöntemler tercih edilmelidir. Moleküler yöntemler basit PCR tabanlı yöntemlerden daha sofistike gerçek zamanlı PCR ve/veya MALDI-TOF yöntemlerine kadar çeşitlilik göstermektedir (210).

Son yıllarda *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığı, birçok faktörün, özellikle de ciddi derecede immün sistemi baskılanmış hastaların artmasının bir sonucudur (211). Diğer iyatrojenik faktörler genel olarak mikrobiyal hastalıklara ve özellikle de mantar enfeksiyonlarına karşı çok hassas olan bir popülasyon yaratılmasına katkıda bulunmuştur (212). Sistemik bir mantar enfeksiyonunun klinik sonucunu tahmin etmek hemen hemen her zaman çok zor olup, antifungal ilaç direnci, terapötik yetmezliğe katkıda bulunan birçok faktörden sadece biridir. Aslında, konakçı ile ilişkili faktörlere ek olarak (bağışıklık durumu, enfeksiyonun yeri ve ciddiyeti gibi), hastalığa neden olan ajanın uygun şekilde tanımlanması da çok önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla olduğu gibi, bazı mantar türleri özellikle otomatik fenotipik sistemler kullanıldığında yanlış tanımlanabilmektedir. Günümüzde *Candida albicans* cinsi hala en önemli patojenik türlerinden biri olsa da, genel olarak “*albicans* dışı” olarak adlandırılan diğer türler, dünya çapındaki klinik örneklerden giderek daha fazla izole edilmeye başlanmıştır (213). Bu türler arasında *Candida glabrata*, özellikle çeşitli insan vücut bölgelerini enfekte edebilen en önemli fırsatçı patojenlerden biri olarak ortaya çıkmıştır (212). *C. parapsilosis* dünyanın birçok bölgesinde, özellikle Güney Amerika ve Avrupa ülkelerinde ve Akdeniz'in Afrika ülkelerinde kan kültürlerinden en sık izole edilen ikinci *Candida* türüdür (214). *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida guilliermondii* ve *Candida famata* gibi diğer türler klinik örneklerden etken olarak daha düşük oranlarda izole edilebilen *Candida* türleri arasında sayılabilir (213).

C.albicans, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* gibi en önemli Candida türlerinin taksonomisi, yakından ilişkili yeni türlerin tanımlanması nedeniyle önemli değişikliklere uğramıştır (213). Bu nedenle bu türler günümüzde “kriptik tür kompleksleri” olarak tanımlanmaktadır. Bu yeni türlerin bir kısmı da yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlara karşı dirençli olup gelecekte ortaya çıkacak potansiyel ciddi patojenler olabileceklerdir (215). Bu kriptik Candida türlerini en yakın akrabalarından ayırt etmek (213) ve bu nedenle bu türlerin epidemiyolojisi, patojenitesi ve klinik önemi hala belirsizdir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Özellikle mevcut fenotipik testlerin yetersizlikleri sebebiyle bu türlerin uygun şekilde tanımlanmaları için hızlı ve spesifik moleküler yöntemler tercih edilmelidir.

Günümüzde Candida enfeksiyonlarının dünya çapında yaygınlığı birçok çalışmada bildirilmiştir (211). Mevcut epidemiyolojik veriler, enfeksiyonların çoğunun, *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* gibi ortak Candida türlerinden ve filogenetik olarak birbirine yakın karakteristikler sergileyen türlerinden kaynaklandığını göstermektedir. Bu kriptik türlerin klinik örneklerdeki sıklığı ve dağılımlarıyla ilgili doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesi spesifikite ve sensitivite sorunları olmayan yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilebilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımız tedavi rejimlerine yön vermesi ve bölgesel direnç profillerinin bilinmesi açısından son derece büyük öneme sahip olacaktır. Fenotipik ve genotipik olarak dirençli suşların erken belirlenmesi ve gerektiği yerde uygun tedavi rejimlerinin belirlenmesi özellikle immunsuprese hastaların mortalite, immunkompetan hastalarda ise morbidite oranlarını önemli ölçüde azaltacak, dirençli suşların yayılmasını önleyecek ve hastane giderlerinin azalmasına katkıda bulunacaktır. Ayrıca sonuçlarımız bölge sonuçları itibarıyla ulusal ve uluslararası literatüre de önemli katkılar sağlayacaktır.

Çalışmaya alınan Candida suşları invaziv bir enfeksiyon olan kök kanal absesi olan hastalardan izole edilmiştir. Kök kanal enfeksiyonu tedavisi alan hastaların, çoğu zaman antibiyotik ile daha önce tedavi öykülerinin olması dirençli suşların ortaya çıkmasına sebep olabilir. Ancak olguların ne zaman tedavi edileceği, kime tedavi verileceği ve ne kadar süre tedavi edileceği ile ilgili sorular hala büyük ölçüde cevaplandırılmamıştır.

Çalışmada izole edilen Candida tür dağılımı incelendiğinde *C.albicans*'ın %61.8'lik oranla en sık izole edilen köken olduğu belirlenirken, bu türü, *Candida.spp*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* nin takip ettiği saptanmıştır.

İzole edilen suşların flukonazol, vorikonazol, flusitozin, amfoterisin B, mikafungin ve kaspofunfine karşı antifungal ilaç duyarlılıklarına bakılmış, suşların çoğunun bu ilaçlara karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *C.albicans*'ın %5.6 'lik oran ile en çok flukonazole dirençli olduğu bulunurken, azol grubu ilaçlar için sınır değeri belirtilmediği için sonuç verilemeyen *C.glabrata* kökenlerinde en yüksek oranda ilaç direncinin flusitozin (%17.6)'e karşı elde edildiği tespit edilmiştir. *C.tropicalis* kökenlerindeki ilaç direncine bakıldığında herhangi bir ilaca direnç tespit edilmemiştir.

Son yıllarda, dünyadaki birçok ülke Candida enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde bir değişime tanık olmuş, bu durum *C. albicans* baskınlığından albicans dışı türlere doğru ilerleyen bir kayma ile karakterize edilmiştir. Söz konusu

suşların en sık kullanılan azol grubu ilaçlara doğal dirençli olabilmesi ya da *C. albicans*'ın çok dirençli olmadığı ilaç gruplarına daha dirençli olmaları identifikasyon ve antifungal duyarlılık testlerinin önemini ortaya koymaktadır.

Antifungal direnç profili fenotipik yöntemler yanında ERG11 geni mutasyonu bakılarak genotipik olarak da araştırılmıştır. ERG11 geni varlığı fenotipik yöntem sonuçlarıyla kıyaslandığında *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenleri hariç diğer tüm *Candida* suşlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Etkili bir antifungal yönetim programı, ilaç direncini kontrol etmek için mutlak gerekli olup hızlı etken teşhisi, terapötik ilaç takibi ve klinik müdahale adımlarını içermelidir. Mevcut ilaçların etkinliğini korumak için uygun tanı yöntemleri ve uygun ilaç kullanımı sağlayan stratejilerin takibi ile mümkün olabilmektedir.

Albicans dışı *Candida* izolatlarının yüksek frekansta oluşu ve antifungal ajanlara duyarlılık düzeylerindeki farklılıklar tedavi açısından son derece önemlidir. Bu sebeple *Candida* ile ilişkili enfeksiyonların doğru şekilde yönetilmesi için, moleküler tanı yöntemleri, *Candida* türlerinin tanımlanmasında hızlı, güvenilir ve hatta uygun maliyetli yaklaşımlar olacaktır.

Candida enfeksiyonlarında etkin tedavi için mikroorganizmayı tür seviyesine göre doğru ve hızlı olarak tanımlamak önemlidir. Klinik laboratuvarında *Candida* türlerinin hızlı tanımlanması, etiyolojik ajanların erken tedavi için ayırt edilmesi ve invazyonunun önlenmesi şiddetle tavsiye edildiğinden bu husus giderek önem kazanmaktadır *Candida* türleri arasında fenotipik benzerlik derecesinin yüksek olması nedeniyle, tanımlama sorunları çok yaygındır. Tür düzeyinde identifikasyona yönelik olarak kullanılan konvansiyonel yöntemler *Candida*'ların tür diskriminasyonunda çok etkili olmayan yöntemlerdir. Bu nedenle *Candida* tür tanımlamalarında yüksek özgüllük, tekrarlanabilirlik ve duyarlılığa sahip alternatif moleküler yöntemler kullanılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J* 2017;223:675–81.
2. Manfredi M, Polonelli L, Aguirre-Urizar JM, Carrozzo M & McCullough MJ. Urban legends series: oral candidosis. *Oral diseases*. 2013;19(3):245-261
3. Ajello L and Hay RJ. *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections-Medical Mycology 4. 1994;423-456.
4. Sen BH, Safavi KE and Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol*. 1997;42(7):513-520.
5. Hazen KC, New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol. Rev.* 8. 1995;462-78.
6. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, & Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *Aids*.1997;11(5):557-567.
7. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S, *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses*. 2004;47:315-8.
8. Siqueira JF Jr, & Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2004;97(5):632-641.
9. Persoon IF, Buijs MJ, Ozok AR, et al. The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome. *Clin Oral Investig*. 2017;21:1871–81.

10. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis.* 2017;24:518–26.
11. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, et al. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci.* 2010;52:177–85.
12. Shah N, Madhu KS, Murthy BS, Hemanth B, Mathew S & Nagaraj S. Identification of presence of *Candida albicans* in primary root canal infections: An in vitro study. *Endodontology.* 2016;28(2):109.
13. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF. Endodontic microbiology and treatment of infections. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. *Pathways of the Pulp.* 2006;9th ed. St. Louis: Mosby.
14. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990;16:580-8.
15. Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30:96-101.
16. Krema ZA, Trfas EEM, Ellabib MS & Cogliati M. Oral carriage of candidiasis in patients with oral dental diseases: predisposing factors, species and their antifungal susceptibility patterns. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access.* 2018;6(3):1-5.
17. Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp* 6th edn. St Louis: Mosby. 1994; 216:337-340.
18. Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics.* 2004;9(1):66-78.

19. Sullivan DJ, Moram GP, Pinjon E, Al-Mosaied A, Strokes C, Vaughan C, Coleman DC. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(4-5):369-76.
20. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:128-37.
21. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge J. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(16):6241-6246.
22. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR & Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic cell.* 2006;5(10):1604-1610.
23. Khan MJA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. Ahmad I, Shahid M, Owais M, Akil F (eds). *Combating Fungal Infections, Problems and Remedy*” kitabında, Springer, New York. 2000;s.21-45.
24. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, & Manfredi M. Prevalence of *Candida* species in endodontic infections: Systematic review and meta-analysis. *Journal of endodontics.* 2018.
25. Mousavi SA, Khalesi E, Bonjar GS, Aghighi S, Sharifi F, Aram F. Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology.* 2007;6(4):583-7.
26. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002;81:761-766.
27. Moradi R, Shariat M & Moghaddam-Banaem L. Effect of intrauterine device insertion on *Candida* species in cervicovaginal specimen identified

- by polymerase chain reaction technic: A longitudinal study on Iranian women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019;45(2):438-442.
28. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*. 2012;125(1):3-13.
 29. Chaffin WL, Lo´pez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martı ´nez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:130-80.
 30. Bayraktar S, Duran N, Duran GG, Eryilmaz N, Aslan H, nlen C & zer B. Identification of medically important *Candida* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the rDNA ITS1 and ITS2 regions. *Indian journal of medical microbiology*. 2017;35(4).535.
 31. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5:a019752.
 32. Lodder J. General classification of the yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 1970;1-33.
 33. Shepherd MG. Basic mycology. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary oral microbiology and immunology*. St Louis: Mosby. 1992;59-62.
 34. Chaffin WL, Lo´pez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martı ´nez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:130-80.
 35. Colombo AL & Guimara es T. (Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:599–607 (in Portuguese).

36. Ingham CJ, Boonstra S, Levels S, de Lange M, Meis JF, Schneeberger PM. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS ONE* 7. 2012;e33818.
37. Canto ´n E, Pema ´n J, Quindo ´s G, Eraso E, Miranda-Zapico IA, lvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F & other authors. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5590–5596.
38. Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA & Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:91–93 (in Portuguese).
39. Lim CS, Rosli R, Seow HF & Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:21–31.
40. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C & other authors. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302:2323–2329.
41. Vidigal PG & Svidzinski TI. Yeasts in the urinary and respiratory tracts: is it a fungal infection or not? *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45:55–64.
42. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK & Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007b;59:401–406.
43. Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, Lee J, Thomas C, Panzer H & other authors. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. *Clin Infect Dis.* 2000;30:19–24.

44. Alvarez-Lerma F, Palomar M, León C, Olaechea P, Cerda E, Bermejo B. & Grupo de Estudio de Infección Fúngica. Fungal colonization and/or infection in intensive care units. Multicenter study of 1,562 patients. *Med Clin (Barc)*.2003;121:161–166(in Spanish).
45. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW & Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. *Trends Microbiol*.2011a;19:241–247.
46. Cullen PJ & Sprague GF Jr. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics*.2012;190:23–49.
47. Verstrepen KJ & Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*.2006;60:5–15.
48. Kojic EM & Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*.2004;17:255–267.
49. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW & Azeredo J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*.2011b;36:288–305.
50. Gácsér A, Trofa D, Schäfer W & Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in Candida parapsilosis demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest*. 2007;117:3049–3058.
51. Vaughn VJ & Weinberg ED. Candida albicans dimorphism and virulence: role of copper. *Mycopathologia*. 1978;64:39–42.
52. Manns JM, Mosser DM & Buckley HR. Production of a hemolytic factor by Candida albicans. *Infect Immun*.1994;62:5154–5156.

53. Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK & Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35:484–491.

54. Martinez LR & Fries BC. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep.* 2010;4:266–275.

55. Ramage G, Saville SP, Thomas DP & López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005;4:633–638.

56. Soll DR. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? *Curr Biol.* 2008;18:R717–R720.

57. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D & Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009;47:681–689.

58. Davey ME & O’toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:847–867.

59. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U & Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:319–323.

60. Ramage G, Wickes BL & Lopez-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab.* 2001;20:42–44.

61. Mukherjee PK & Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat.* 2004;7:301–309.

62. Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro RA, Rocha MF, Rabenhorst SH & Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48:17–20.
63. Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T, Montelli AC, Mondelli AL & Bagagli E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Res Notes*. 2010;3:1–3.
64. Hawser SP & Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994;62:915–921.
65. DiDone L, Oga D & Krysan DJ. A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast*. 2011;28:561–568.
66. Finkel JS & Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9:109–118.
67. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M & Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:510–520.
68. Byers M, Chapman S, Feldman A & Parent A. Fluconazole pharmacokinetics in the cerebrospinal fluid of a child with *Candida tropicalis* meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:895–896.
69. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D & Burleson J. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:249–254.
70. Moore-Landecker E. *Fundamentals of the fungi* (No. Ed. 4). Prentice Hall. 1996.

71. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002;81:101-10.
72. Marsh P, Martin MV. *Oral microbiology*. 4th ed. Oxford (England): Wright. 1999.
73. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1993;21:313-6.
74. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 1980;25:1-10.
75. Jacob LS, Flaitz CM, Nichols CM, Hicks MJ. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *J Am Dent Assoc.* 1998;129:187-94.
76. Lynch E, Beighton DA. comparison of primary root caries lesions classified according to colour. *Caries Res.* 1994;28:233-9.
77. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988;3:47-52.
78. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001;28:860-4.
79. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH & Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1695–1703.
80. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L & Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:359–366.

81. Pereira GH, Muller PR, Szeszs MW, Levin AS & Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Med Mycol.* 2010;48:839–842.
82. Cruciani M & Serpelloni G. Management of Candida infections in the adult intensive care unit. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:175–191.
83. Rodríguez-Tudela JL, Almirante B, Rodríguez-Pardo D, Laguna F, Donnelly JP, Mouton JW, Pahissa A & Cuenca-Estrella M. Correlation of the MIC and dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3599–3604.
84. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R & Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases.* 2017;17(12): e383-e392.
85. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4:165rv13.
86. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003;11:272–79.
87. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis.* 2009;9:789–95.
88. Snelders E, Melchers WJ, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol.* 2011;6:335–47.
89. Brown GD, Netea MG. Exciting developments in the immunology of fungal infections. *Cell Host Microbe.* 2012;11:422–24.

90. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Clancy CJ. Abdominal candidiasis is a hidden reservoir of echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:7601–15.
91. Shor E, Perlin DS. Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004668.
92. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and candida revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011;14:164–76.
93. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Florl C, Hope WW. Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat.* 2013;16:81–95.
94. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:330–43.
95. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 418–25.
96. Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledebor NA. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1765–71.
97. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125(suppl 1):S3–13.

98. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol.* 2011;49(suppl 1):S90–95.
99. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a ;10·5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1366–77.
100. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3185–90.
101. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR & Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2013;85(2):200-204.
102. Guinea J, Zaragoza O, Escribano P, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1529–37.
103. Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 2012;7:e31801.
104. Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci.* 2015;71:1054–58.
105. Al-Hatmi AM, Meis JF, de Hoog GS. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005464.

106. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2635–42.
107. Espinel-Ingroff A, Chakrabarti A, Chowdhary A, et al. Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of Mucorales. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:1745–50.
108. Ramos LS, Figueiredo-Carvalho MH, Barbedo LS, et al. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:111–15.
109. Sagatova AA, Keniya MV, Wilson RK, Monk BC, Tyndall JD. Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4982–89.
110. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical Isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 2012;11:1289–99.
111. Vale-Silva LA, Coste AT, Ischer F, et al. Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta(5),(6)$ -desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1960–68.
112. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62:e1–50.
113. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based

laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 1352–61.

114. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:532–38.
115. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2571–81.
116. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp nov, a new sibling species of *A fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4:625–32.
117. Pham CD, Iqbal N, Bolden CB, et al. Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4690–96.
118. Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, et al. Epidemiology and risk factors for echinocandin nonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large multisite population-based candidemia surveillance program, 2008–2014. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2:ofv163.
119. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1724–32.
120. Farmakiotis D, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1833–40.

121. Klotz U, Schmidt D, Willinger B, et al. Echinocandin resistance and population structure of invasive *Candida glabrata* isolates from two university hospitals in Germany and Austria. *Mycoses*. 2016;59:312–18.
122. Fekkar A, Dannaoui E, Meyer I, et al. Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp in a hospital setting: a consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1489–96. e392 www.thelancet.com/infection Vol 17 December 2017 Series.
123. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*. 2014;10:400–06.
124. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4419–31.
125. Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Houbraken J, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activity of nine antifungal agents against clinical isolates of *Aspergillus calidoustus*. *Med Mycol*. 2010;48:97–102.
126. Krcmery V Jr, Spanik S, Kunova A, Trupl J. Breakthrough fungemia appearing during empiric therapy with amphotericin B. *Chemotherapy*. 1997;43:367–70.
127. Hull CM, Bader O, Parker JE, et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in *ERG2*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:6417–21.
128. Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF, et al. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46:253–57.

129. Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol.* 2008;46:541–46.
130. Woods RA, Bard M, Jackson IE, Drutz DJ. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J Infect Dis.* 1974;129:53–58.
131. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5150–54.
132. Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Updat.* 1999;2:259–69.
133. Chowdhary A, Voss A, Meis JF. Multidrug-resistant *Candida auris*: ‘new kid on the block’ in hospital-associated infections? *J Hosp Infect.* 2016;94:209–12.
134. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Yoon S, Sobel JD, Akins RA. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2690–95.
135. Powderly WG. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta 8 \rightarrow 7$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;122:39–42.
136. de Oliveira LF, Jorge AO & Dos Santos SS. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Braz Oral Res.* 2006;20:202–206.

137. Duran N, Muz M, Gulbol Duran G, Ozer B and Onlen Y. "Synergistic activation of two propolis with amphotericin B against some azole- resistant Candida strains. Part I". ICAMS. 2010;211-217.
138. Sardi JC, Almeida AM & Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review. Arch Oral Biol. 2011;56:951–959.
139. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV & Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1027–1031.
140. Rossignol T, Kelly B, Dobson C & d'Enfert C. Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4670–4681..
141. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Missouri, Mosby. 2002;11th ed.
142. Byers M, Chapman S, Feldman A & Parent A. Fluconazole pharmacokinetics in the cerebrospinal fluid of a child with Candida tropicalis meningitis. Pediatr Infect Dis J. 1992;11:895–896.
143. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D & Burleson J. Oral Candida infection and colonization in solid organ transplant recipients. Oral Microbiol Immunol. 2009;24:249–254.
144. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Microorganisms in root canal infections: A review. Stomatologija 2008;10:4-9.
145. Moore-Landecker E. Fundamentals of the fungi (No. Ed. 4). prentice Hall. 1996.

146. Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002;81:101-10.
147. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
148. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent.* 2010;13:233-9.
149. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1993;21:313-6.
150. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000;26:695-8.
151. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5:1-10.
152. Grossman LI. *Root Canal Therapy.* 3rd ed. London: Henry Kimpton. 1952.
153. Kerawala C, Newlands C, editors. *Oral and Maxillofacial Surgery.* Oxford: Oxford University Press. 2010;446-447.
154. Gomes C, Fidel S, Fidel R, de Moura Sarquis MI. Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections. *J Endod.* 2010;36:626-9..
155. Slack G. The bacteriology of infected root canals and in vitro penicillin sensitivity. *Br Dent J.* 1953;3:211-4.
156. Slack G. The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals. *Br Dent J.* 1957;18:493-4.

157. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in rootcanals of teeth with apical periodontitis and evaluation of their possible role in failure of endodontic treatment. *J Int Oral Health*. 2015;7:42-5.
158. Najzar-Fleger D, Filipovic D, Prpic G, Kobler D. Candida in rootcanal in accordance with oral ecology. *IntEndod J*. 1992;25:40.
159. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, et al. Polymerase chain reaction of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. *J ClinExpDent*. 2012;4:e34-9.
160. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge J. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(16):6241-6246.
161. Nastri N, Nastri M, Jewtuchowicz V, Mujica M, Iovanniti C, Gualtieri A & Rosa A. Prevalence of *Candida* species in necrotic pulp with chronic periapical processes. *Acta Odontológica Latinoamericana*. 2011;24(2):183-187.
162. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94:281-293.
163. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002;35:13-21.
164. Brown PD. Surgery for infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*. 2007;9:291-296.
165. Effect Of *Garcinia Imberti* Bourd Against *Candida* Isolates In Rootcanal Infection *J Young Pharm*, multifaceted peer reviewed journal in the field of Pharmacy. 2017;9(2):214-217.

166. Brook I, Frazier E, Gher M. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscesses. *Oral Microbial Immunol.* 1991;6(2):123-5.
167. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S & Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2004;50(1):25-32.
168. De Backer MD, Magee PT, Pla J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol.* 2000;54:463–498.
169. Rodrigues C, Rodrigues M, Silva S & Henriques M. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come?. *Journal of fungi.* 2017;3(1):11.
170. Lydia Rajakumari M, Saravana Kumari P. Prevalence of *Candida* species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. *J Mycol Med.* 2016;26:359-67.
171. Tscherner M, Schwarzmueller T & Kuchler K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals.* 2011;4:169–186.
172. Rodrigues CF, Silva S & Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:673–688.
173. Chavanet P, Lopez J, Grappin M, Bonnin A, Duong M, Waldner A, Buisson M, Camerlynck P & Portier H. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS.* 1994;8:945–950.
174. Berila N & Subik J. Molecular analysis of *Candida glabrata* clinical isolates. *Mycopathologia.* 2010;170:99–105.

175. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, Torelli R, Posteraro B, Vandeputte P & Sanglard D. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1852–1860.
176. Coenye T, Prijck KD, Nailis H, Nelis HJ. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation. *Open Mycol J*. 2011;5:9-20.
177. Yasui M, Ryu M, Sakurai K, Ishihara K. Colonisation of the oral cavity by periodontopathic bacteria in complete denture wearers. *Gerodontology*. 2012;29:494-502.
178. Brondani MA, Samim F, Feng H. A conventional microwave oven for denture cleaning: a critical review. *Gerodontology*. 2012;29:6-15.
179. Bhat V, Sharma SM, Shetty V, Shastry CS, Rao V, Shenoy SM, et al. Prevalence of *Candida* associated denture stomatitis (CADS) and speciation of *Candida* among complete denture wearers of southwest coastal region of Karnataka. *NUJHS*. 2013;3:59-63.
180. Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology*. 2012;29:348-56.
181. Hoshing C, Dixit S, Mootha A, Diwan N. Role of *Candida albicans* in denture stomatitis. *J Indian Acad Oral Med Radiol*. 2011;23:617-9.
182. Darwazeh AMG, Al-Dwairi ZN, Al-Zwairi AA. The Relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract*. 2010;11:17-24.
183. Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010;55:48-54.

184. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in-vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun*. 2010;78:3650-9.
185. Faot F, Cavalcanti YW, Bertolini MM, Pinto LR, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methylmethacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health*. 2014;14:77.
186. Darwazeh AMG, Darwazeh TA. What makes oral Candidiasis recurrent infection? a clinical view. *J Mycol*. 2014;758394.
187. Petrovic M, Kostic M, Kostic M, Krunic N, Igetic M, Pesic Z, et al. Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Acta Med Medianae*. 2014;53:73-9.
188. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, et al. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res*. 2011;55:48-52.
189. Lazarin AA, Machado AL, Zamperini CA, Wady AF, Spolidorio DMP, Vergani CE. Effect of experimental photo polymerized coatings on the hydrophobicity of a denture base acrylic resin and on *Candida albicans* adhesion. *Arch Oral Biol*. 2013;58:1-9.
190. Dendis M1, Horváth R, Michálek J, Růžicka F, Grijalva M, Bartos M, Benedík PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol Infect*. Dec 2003;9(12):1191-202.
191. Snelders E, Melchers WJ, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol*. 2011;6:335-47.

192. Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*. 2008;51(1):40-9.
193. Rezazadeh E, Moazeni M & Sabokbar A. Use of cost effective and rapid molecular tools for identification of *Candida* species, opportunistic pathogens. *Current medical mycology*. 2016;2(3):1.
194. Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley D, et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. *J Med Microbiol*. 1996;44(6):399-408.
195. Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva SM, Henriques Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment, *Mycopathologia*. 2014;177:223-240.
196. Lewis MA, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *BrDent J*. 2017;223:675–81.
197. Tomalka J, Azodi E, Narra HP, Patel K, O'Neill S, Cardwell C, Hall BA, Wilson JM, Hise AG. β -Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. *J. Immunol*. 2015;194:1788:1795.
198. Aslani N, Abastabar M, Hedayati MT, Shokohi T, Aghili SR. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from dental plaques. *J Mycol Med*. Sep 2018;28(3):433-436.
199. Krema ZA, Trfas EEM, Ellabib MS & Cogliati M. Oral carriage of candidiasis in patients with oral dental diseases: predisposing factors, species and their antifungal susceptibility patterns. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. 2018;6(3):1-5.
200. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR & Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic cell*. 2006;5(10):1604-1610.

201. Khan MJA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. Ahmad I, Shahid M, Owais M, Akil F (eds). *Combating Fungal Infections, Problems and Remedy*” kitabında, Springer, New York. 2000;s.21-45.
202. Meletiadis J, Geertsen E, Curfs-Breuker I, Meis JF, Mouton JW. Intra- and inter laboratory agreement in assessing the in vitro activity of micafungin against common and rare *Candida* species with the EUCAST, CLSI, and Etest methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:6173–78.
203. Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledeboer NA. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1765–71.
204. Aslani N, Abastabar M, Hedayati MT, Shokohi T, Aghili SR, Diba K, Hosseini T, Bahrami B, Ebrahimpour A, Salehi M, Taheri Sarvtin M, Haghani I, Vafaei Moghaddam M. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from dental plaques. *J Mycol Med*. Sep 2018;28(3):433-436.
205. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82:1968-1981.
206. Jewtuchowicz M, Brusca MI, Mujica MT et al. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontol Latinoam*. 2007;20:17-22.
207. Heo SM, Sung RS, Scannapieco FA & Haase EM. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *Journal of oral microbiology*. 2011;3(1):6362.

208. Suarez BL, Alvarez MI, de Bernal M et al. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia *Colomb Med (Cali)*. 2013;44:26-30.
209. Pinto PM, Weikert-Oliveira R, de C, Lyon JP et al. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. Obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. *Microbiol Res*. 2008;163:579-585.
210. Criseo G, Scordino F & Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *Journal of microbiological methods*. 2015;111:50-56.
211. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. 2014;9:e101510.
212. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance *FEMS Microbiol. Rev*. 2012;36:288-305.
213. Brandt ME, Lockhart SR. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Curr. Fungal Infect. Rep*. 2012;6:170–17.
214. Delfino D, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Galbo R, David A, Barberi I, Criseo G, Cascio A, Romeo O. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clin. Microbiol. Infect*. 2014;20:O946–O951.
215. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J. Clin. Microbiol*. 2008;46:933–938.

216. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3185–90.
217. Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR & Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2013;85(2):200-204.
218. Reiss ER, Morrison CJ. Non culture methods for diagnosis of disseminated Candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(4):311-23.

8. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise tahsilini Kadirli'de aldıktan sonra 1995 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2001 yılında mezun oldum. Kadirli 3 nolu Sağlık ocağı, Kadirli Devlet hastanesi Acil plk, Hasanbeyli ASM ve Kadirli Yalnızdut ASM'de çalıştıktan sonra 2014 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nde asistanlığa başladım.



9. ETİK KURUL

MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Kanal tedavisi yapılan hastalarda izole edilen candidaların PCR-RLEP yöntemi ile genotiplendirilmesi ve azol direncinin belirlenmesi”
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/126

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MKÜ TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	MKÜ Alahan Kampüsü Antakya HATAY
	TELEFON	0326 245 51 14
	FAKS	0326 245 51 14
	E-POSTA	tipetik@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Zahide TOPAKTAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MKÜ Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI <input type="checkbox"/>	



Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı Prof.Dr.Nazan SAVAS
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Kanal tedavisi yapılan hastalarda izole edilen candidaların PCR-RLEP yöntemi ile genotiplendirilmesi ve azol direncinin belirlenmesi”
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/126

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05/07/2017-138	1
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
		<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 15	Tarih: 13/07/2017		
	KARAR 15- Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü araştırma görevlisi Dr.Zahide TOPAKTAŞ'ın “Kanal tedavisi yapılan hastalarda izole edilen candidaların PCR-RLEP yöntemi ile genotiplendirilmesi ve azol direncinin belirlenmesi” isimli çalışması görüşülmüş olup; çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve etik kurallara uygun bulunmuş olup; çalışmanın finans kaynağı olarak gösterilen Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nden (BAP) gerekli belgeler Kurulumuza ulaştıktan sonra çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF.DR.NAZAN SAVAŞ

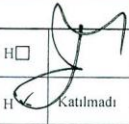
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr..Nazan SAVAŞ	Halk Sağlığı	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muhyittin TEMİZ	Genel Cerrahi	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Aydiner KALACI	Ortopedi ve Travmatoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Burçin ÖZER	Tıbbi Mikrobiyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Enver Ahmet DEMİR	Tıbbi Fizyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Neslihan PINAR	Tıbbi Farmakoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı Prof.Dr.Nazan SAVAŞ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.



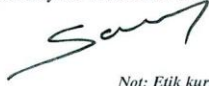
MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		“Kanal tedavisi yapılan hastalarda izole edilen candidaların PCR-RLEP yöntemi ile genotiplendirilmesi ve azol direncinin belirlenmesi”								
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2017/126								
Doç.Dr.Erhan YENGİL	Aile Hekimliği	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ✓	K □	E □	H ✓	E ✓	H □		
Av.Süleyman TENEKECİOĞLU	Hukuk	MKÜ Hukuk Müşavirliği	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓		Katılmadı
Yusuf COŞKUN	Esnaf	Serbest Çalışan	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓		Katılmadı
Osman ÖZKAN	Eğitimci	Aile ve Sosyal Politikalar Bakanlığı	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓		Katılmadı
Murat EKENER	Kimyager	Serbest Çalışan	E ✓	K □	E □	H ✓	E □	H ✓		Katılmadı

*:Toplantıda Bulunma



Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı Prof.Dr.Nazan SAVAŞ
İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.