



## Kandidoz Tedavisinde Kullanılan Antifungal İlaçlar ve Duyarlılık Testleri

### Antifungal Agents in the Treatment of Candidosis and Susceptibility Tests

Sema Nur ALTINTAŞ<sup>1</sup> [ID], Fatih ŞAHİNER<sup>2</sup> [ID]

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Institute of Health Sciences, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

**Makale geçmişi [Article Info]:** Geliş Tarihi (Received): 21.03.2021. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.05.2021.

**İletişim [Correspondence]:** Sema Nur Altıntaş; Yüksek Lisans, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara, Türkiye. E-posta: [altintassema@gmail.com](mailto:altintassema@gmail.com) [Sema Nur Altıntaş; Master of Science, Department of Medical Microbiology, Gulhane Institute of Health Sciences, University of Health Sciences, Ankara, Turkey. E-mail: [altintassema@gmail.com](mailto:altintassema@gmail.com)]

### Özet

*Candida* türleri, insanlarda gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistemin normal florasında kolonize olabilmekte ve aynı zamanda sağlıklı kişilerin derisinde kommensal olarak konağa zarar vermeyecek şekilde bulunabilmektedir. Bununla birlikte, normal mikrobiyota dengesi bozulduğunda veya bağışıklık zayıfladığında, *Candida* türlerinin aşırı çoğalması doku hasarı ve fırsatçı enfeksiyonların ortaya çıkışına neden olabilmektedir. Son birkaç on yılda, çeşitli tıbbi prosedürler ve tedavi protokollerindeki gelişmeler, kritik hastaların yaşam sürelerinin uzamasına yol açmış, bunun yanında ise invaziv mantar enfeksiyonlarına karşı duyarlı olan bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerin ve risk grubundaki diğer kişilerin sayısını da arttırmıştır. Son ve kapsamlı epidemiyolojik araştırmalara göre *Candida* türleri hastane kaynaklı invaziv mantar enfeksiyonlarının yaklaşık %80'inden sorumludur ve nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları arasında beşinci sırada yer almaktadır. Yüksek mortalite ile seyredabilen bu enfeksiyonların yönetiminde enfeksiyon odağını hızla ortadan kaldırmak ve uygun antifungal tedaviyi uygulamak kritik öneme sahiptir. Antifungal ilaçlar, mikozların modern tıbbi yönetiminde çok önemli bileşenler olup, farmakolojik olarak farklı özelliklere sahip ilaç grupları olarak bulunmaktadır. Antifungal ilaçların kullanımını sınırlayan en önemli problemler doza bağlı toksisite ve direnç sorunudur. Antifungallere dirençli suşların toplumda yayılması, sayıları devamlı olarak artmakta olan immünyetmezlikli hasta popülasyonunda tedavi seçeneklerinin kısıtlanması gibi daha geniş kapsamlı sorunlarla da ilişkilidir, çünkü yeni antifungal ilaçların geliştirilmesine yönelik klinik çalışmaların sonuçlanma hızı ilaç direnci insidansından daha düşüktür. Antifungal duyarlılık testleri yeni ilaçların geliştirilmesi, epidemiyolojik araştırmalar ve sürveyans çalışmaları için kullanılabilir. Bu testlerin önemli kullanım alanlarından biri de tedavi için seçilecek ilaca karar verilmesi ve terapötik sonucun tahmin edilmesidir. Bu makalede *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar ve bu ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları ile antifungal direncin belirlenmesinde kullanılan standart yöntemler ve rutin laboratuvar testlerindeki güncel durumun bir özeti sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Disk difüzyon, Mikrodilüsyon, Direnç, CLSI, EUCAST.

### Abstract

*Candida* species can colonize the normal flora of the gastrointestinal system and genitourinary tract and can also be found in healthy human skin commensally without harming the host. However, when the normal microbiota balance is disturbed or immunity is weakened, overgrowth of *Candida* species can lead to

tissue damage and the emergence of opportunistic infections. Over the past few decades, advances in various medical procedures and treatment protocols have led to an increase in the lifespan of critically ill patients, as well as the number of immunocompromised individuals susceptible to invasive fungal infections and others in the risk group. *Candida* species are responsible for approximately 80% of hospital-acquired invasive fungal infections and rank fifth among nosocomial bloodstream infections, according to recent and comprehensive epidemiological studies. It is critical to quickly remove the focus of infection and administer appropriate antifungal therapy in the management of these infections that may course with high mortality. Antifungal drugs are very important tools in modern medical management of mycoses and exist as drug groups with different pharmacological properties. The most important problems limiting the use of antifungal drugs are dose-related toxicity and drug resistance problem. The spread of antifungal-resistant strains in the population is also associated with broader problems, such as the restriction of treatment options in the ever-increasing population of immunocompromised patients, because the speed of clinical trials for the development of new antifungal drugs is lower than the incidence of drug resistance. Antifungal susceptibility tests can be used for the development of new drugs and for epidemiological research and surveillance studies. Also, one of the important uses of these tests is deciding on the drug to choose for treatment and predicting the therapeutic outcome. This article provides a summary of the current situation about antifungal drugs used in the treatment of *Candida* infections and resistance mechanisms against these drugs, also standard methods and routine laboratory tests used in the determination of antifungal resistance.

**Keywords:** Disk diffusion, Microdilution, Resistance, CLSI, EUCAST.

## Giriş

Mantarlar geleneksel ve morfolojik olarak maya ve filamentli formlar (küf) şeklinde sınıflandırılan ökaryotik mikroorganizmalardır. İnsanlar için patojen olan mantar türleri genellikle pleomorfiktir ve mayalar, filamentöz mantarlar ve dimorfik fungal patojenler olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır. Dimorfik mantar patojenler 37°C'nin altındaki sıcaklıklarda filamentöz (hifal) bir yapı sergilerken, insanlarda enfeksiyona neden olduklarında "37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda" maya formunda görülürler [1]. Bu karakteristik özellikleri sergileyen türlerden biri olan *Candida albicans* da dimorfik bir mantar türü olarak tanımlanmaktadır [2]. *Candida* türleri, çevresel ortamlardan yaygın olarak izole edilen ve her yerde bulunabilen mayalardır. Mevcut taksonomilere göre *Candida* cinsinde yaklaşık 200 askomiçetöz ve genellikle aseksüel olarak çoğalan maya türü bulunmaktadır. Bu türlerden birkaçı ise insan kommensal florasının bir parçası olarak bulunur [1]. Örneğin, *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* gibi bazı *Candida* türleri, sağlıklı insanların normal gastrointestinal ve genital florasında bulunabilirken, *C. parapsilosis*, *C. famata* ve *C. guilliermondii* gibi bazı türler de deride kommensal olarak yaşayabilmektedir. *Candida* türleri arasında sınıflandırılan maya türlerinden insan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu

bilinen tür sayısı ise 20'nin üzerindedir [1,3]. Bu makalede *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar, bu ilaçlara direnç mekanizmaları ve antifungal direncin saptanmasında kullanılan duyarlılık testlerindeki güncel durumun bir özeti sunulmuştur.

## Antifungaller

Antifungal tedavide kullanılan ilaçlar etki spektrumu, farmakolojik özellikleri, toksisite ve potansiyel ilaç-ilaç etkileşimleri yönünden farklı özelliklere sahiptir. Örneğin, ekinokandinler *Candida* türlerine karşı güçlü aktivite sergilerken, yeni triazololler *Aspergillus* türlerini ve filamentöz patojenleri de içeren genişletilmiş bir aktivite spektrumu sunarlar [4]. Bir diğer önemli konu ise ilaç etkileşimleri ve olası toksisite durumlarıdır. Birçok triazol hepatik CYP450 enzimleri ile metabolize edildiği için triazol tedavilerinde ilaç-ilaç etkileşimleri sık karşılaşılan bir durum olup, yaygın enzim polimorfizmleri öngörülemez ilaç seviyelerine yol açabilmektedir [4].

*Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılan antifungal ilaçlar ve geleneksel tedavi yaklaşımlarında karşılaşılan önemli sorunlardan biri de ilaç dozu ve dozaj sıklığını sınırlayan çeşitli yan etkilerdir [5]. Bu problemle başa çıkma yollarından biri insan vücudu içerisinde yeni ilaç

dağıtım sistemleri ile düşük doz ilaç kullanımının sağlanması ve yan etkilerin hafifletilmesi iken, bir diğer seçenek ise düşük yan etkili yeni ilaçların geliştirilmesidir [5,6]. *Candida* enfeksiyonlarının yönetiminde etkili yaklaşımlardan biri de tür düzeyinde laboratuvar tanımlaması ve duyarlılık testleri ile uygun tedavi yönteminin seçimini yönlendirmek ve antifungallere dirençli kökenlerin yaygınlaşması ile ilişkili olan ve olumsuz yan etkiler nedeniyle hastalar için ek risklere neden olan gereksiz ilaç kullanımının azaltılmasını sağlamaktır.

### 1. Polien türevleri

Polienler bir toprak aktinomiçeti olan *Streptomyces nodosus*'un doğal ürünleridir. Bu grupta yer alan moleküllerden sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilen tek ilaç amfoterisin B'dir [4]. Grupta yer alan diğer bir ilaç olan Nistatin ise *S. noursei* suşları tarafından üretilen bir membran aktif polien makrolitidir ve sadece topikal olarak kullanılabilir [7].

#### 1.1. Amfoterisin B

İlk spesifik antifungal ilaç olarak tanımlanan amfoterisin B deoksikolat 1958'de kullanıma sunulmuştur. Amfoterisin B deoksikolat güçlü ve geniş spektrumlu bir antifungal aktivite sunarken, ciddi renal toksisite ve infüzyon reaksiyonları ile ilişkilidir. Sonraki dönemlerde ilacın neden olduğu toksisiteyi sınırlandırmak ve tolere edilebilirliğini geliştirmek için amfoterisin B'nin lipit bazlı formülasyonları üzerinde çalışılmıştır [4]. Amfoterisin B, orijinal deoksikolat formülasyonu ve lipit bazlı iki formülasyon (lipozomal amfoterisin B ve amfoterisin B lipid kompleksi) olarak geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Dördüncü bir formülasyon olan amfoterisin B koloidal dispersiyon (ABCD) ise günümüzde üretilmemektedir.

Etki mekanizmasına bakıldığında amfoterisin B, hücre zarında bulunan ergosterol ile hidrofobik etkileşimlere girer ve membran fonksiyonlarını bozar. Membranda oluşan gözenekler potasyum akışına neden olarak (hücre içi potasyum kaybı) hücrenin ölümüne neden olur [8]. Amfoterisin B, *Candida* türleri, *Fusarium* türleri, *Mukor* türleri, *Scedosporium* türleri, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma*

*capsulatum* da dahil olmak üzere tıbbi önemi olan bir dizi maya ve filamentöz mantar patojene karşı aktivite gösteren en güçlü antifungallerden biridir [4].

#### 1.2. Nistatin

Bir diğer polien türevi olan nistatin, oral yoldan uygulandığında gastrointestinal sistemden emilmediği için bu özelliği ile toksik yan etkilere neden olmadan topikal olarak kullanılabilen bir ilaç olmuştur. Nistatin oral süspansiyon, topikal krem ve oral pastil gibi çeşitli formlarda bulunur. Nistatin, amfoterisin B, mikonazol ve klotrimazol gibi topikal antifungal ajanlar, tipik olarak komplikasyonsuz oral kandidiyazis vakaları için birinci basamak tedavi seçeneği olarak önerilmektedir. Nistatinin topikal kullanımı diş hekimliğinde yaygın bir uygulama yolu olup, ilaç etkileşimlerinin görülme sıklığının düşük olması ve kabul edilebilir maliyeti ile oral ve sistemik kandidiyazis profilaksisinde ayrıca önemlidir. Nistatin özellikle gelişmekte olan ülkelerde yenidoğanlar ve bebekler ile AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) hastaları, kanser hastaları ve organ nakli alıcıları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda profilaksi amacıyla da kullanılmaktadır [7].

### 2. Azoller

Antifungal etkili azol grubu moleküller fungal enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir diğer önemli ilaç sınıfıdır. Azol halkasındaki azot atomlarının sayısına göre imidazoller (klotrimazol, ketokonazol, mikonazol) ve triazololler (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, isavukonazol) olarak adlandırılan bu ilaçlar, C14-a sterol demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini bozarlar. Bu süreçte hücre zarında sterol öncüllerinin birikmesi ve membran akışkanlığını, plazma membran biyogenezi ve fonksiyonunu düzenleyen temel membran sterolü olan ergosterolün azalması ile hücre zarının bütünlüğü bozulur. Kutanoz mantar enfeksiyonları veya vajinal kandidiyazis tedavisi için ticari formda birçok topikal azol (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol, butokonazol, tiyokonazol, terkonazol) ilacı mevcuttur. Orijinal azol ilaçları (ketokonazol, mikonazol) sistemik tedavi amacı ile kullanıldıklarında önemli toksisite gösterirken, flukonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol,

isavukonazol gibi yeni triazoller geliştirilmiş bir güvenlik profiline sahiptir. [4].

#### 2.1. Flukonazol

Flukonazol, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis* de dahil olmak üzere tıbbi önemi olan birçok *Candida* türüne karşı aktiftir. *C. glabrata*, *C. guilliermondii* ve *C. rugosa* için MİK (minimal inhibitör konsantrasyonu) değerleri diğer türlere kıyasla daha yüksektir. Flukonazol *C. krusei*'ye karşı etkili değildir. *C. neoformans*'a karşı ise mükemmel aktivite gösterir. Her ne kadar aktivite spektrumu dimorfik patojenleri (*B. dermatitidis*, *C. immitis* ve *H. capsulatum*) kapsıyor olsa da, flukonazol için MİK değerleri diğer mevcut azollere (itrakonazol, posakonazol, vorikonazol, isavukonazol) kıyasla anlamlı derecede yüksektir. Bununla beraber, flukonazol, koksidioidomikoz dışındaki dimorfik patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde daha az kullanılmaktadır. Flukonazol, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. veya mukorlara karşı ise etkin değildir [4].

#### 2.2. İtrakonazol

Flukonazol gibi, itrakonazol de çoğu *Candida* türüne karşı etkilidir ve *C. glabrata* ve *C. krusei* için daha yüksek MİK değerleri gösterir. İtrakonazolün aktivite spektrumu *B. dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *H. capsulatum*, *Coccidioides* spp. ve *Paracoccidioides* spp. gibi dimorfik mantar patojenleri de kapsar. İtrakonazol ayrıca, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidula* ve *A. terreus* dahil olmak üzere birçok *Aspergillus* türüne karşı da etkilidir. Ancak, *Fusarium* türleri ve *Mukor* türlerine karşı düşük aktivite gösterir [4].

#### 2.3. Vorikonazol

Azol grubu ilaçlar arasında yaygın kullanılan bir antifungal olan vorikonazol; flukonazol ve itrakonazole benzer şekilde birçok *Candida* türüne karşı aktivite gösterir. Vorikonazol, ek olarak, flukonazol dirençli *C. glabrata* suşlarının bir alt grubuna karşı da aktivite gösterir. Vorikonazol *Candida* türleri dışında ayrıca *Cryptococcus* türlerine ve *B. dermatitidis*, *C. immitis* ve *H. capsulatum* gibi dimorfik mantar patojenlere karşı da etkilidir. Ayrıca, amfoterisin B'ye dirençli *A. terreus* de dahil olmak üzere çoğu *Aspergillus* türüne karşı güçlü aktivite gösterir. Vorikonazolün aktivite spektrumu *Fusarium* türleri ve

*Scedosporium* türlerini de kapsar, ancak *Mukor* türlerine karşı aktivitesi düşüktür [4].

#### 2.4. Posakonazol

Posakonazol *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. lusitaniae* türleri de dahil olmak üzere çoğu *Candida* türüne karşı etkin olup, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. guilliermondii* için daha yüksek MİK değerlerine sahiptir. Posakonazol de vorikonazol gibi, flukonazol dirençli izolatların bir alt grubuna karşı aktivite gösterir, ancak bu organizmalar için daha yüksek MİK değerleri gözlenir. Posakonazolün aktivite spektrumu *Cryptococcus* türleri, *C. immitis*, *B. dermatitidis* ve *H. capsulatum*'u da kapsamaktadır. Posakonazol *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* da dahil olmak üzere *Aspergillus* türlerine karşı güçlü aktivite gösterir. Posakonazol ayrıca *Mukor* türlerinin birçoğuna karşı da etkilidir [4].

#### 2.5. Azol grubu diğer ilaçlar

İsavukonazol *C. glabrata* ve *C. krusei* de dahil olmak üzere çoğu *Candida* türüne ve yaygın *Aspergillus* türlerine karşı etkilidir. MİK değerleri vorikonazol için gözlemlenenlere benzer ve posakonazol için gözlemlenenenden daha yüksektir. İsavukonazol, dimorfik mantar patojenlerinin yanı sıra, *Cryptococcus* türlerine karşı da güçlü aktivite gösterir. İsavukonazolün oral kapsül ve intravenöz çözelti halinde ticari formülasyonları mevcuttur [4]. Ketokonazol tinea korporis, tinea kruris, tinea pedis, tinea versikolor, kutanöz kandidiyazis ve seboreik dermatit tedavisinde topikal kullanım için onaylanmış bir antifungaldir. Kronik mukokutanöz kandidiyazis ve pamukçuk (*thrush*) da dahil olmak üzere bazı oral *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır [9]. Mikonazol ve klotrimazol kutanöz ve mukokutanöz mikozlar, vulvovajinal kandidiyaz ve orofaringeal kandidiyaz tedavisinde topikal olarak kullanılan azol grubu diğer antifungal ilaçlardır [9].

### 3. Pirimidin sentez inhibitörü: Flusitozin

Piyasaya 1973 yılında sürülen bir pirimidin analogu olan flusitozin *Candida* ve *Cryptococcus* türlerine karşı etkindir. Flusitozin florlanmış bir pirimidindir (5-florositozin) ve oral kapsül şeklinde kullanılır. Flusitozin mantar hücre membranındaki sitozin permeaz ile hücre içine alınır ve sitozin deaminaz ile hücrede fluorourasile dönüştürülür.

Fluorourasil nükleik asit sentezini bozar (DNA ve RNA-ribo nükleik asit) ve sonuçta protein sentezini de etkiler. Kullanımı ilaca direnç ve toksisite (kemik iliği baskılanması ve karaciğer toksisitesi) nedenleri ile sınırlıdır [4]. Spektrumu *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* dahil olmak üzere birçok *Candida* türünü içerir. *C. krusei* ve *C. lusitanae* türleri de etki spektrumunda yer almaktadır, ancak MİK değerleri daha yüksektir. Bu etkinliğine rağmen, flusitozin kandidiyazis tedavisinde nadiren tek başına kullanılır, çünkü monoterapi hızlı direnç gelişimine neden olur. Flusitozinin en önemli klinik kullanımı ise kriptokokal menenjit tedavisidir, indüksiyon döneminde amfoterisin B ile birlikte uygulanır [4].

#### 4. Ekinokandinler

Ekinokandinler bir yağ açıl yan zincirine bağlı N siklik heksapeptitlerden oluşan bir yarı sentetik lipopeptit sınıfıdır. Bu bileşikler birçok mantar için esansiyel bir komponent olan mantar hücre duvarı polisakariti  $\beta$ -1,3 gluklan sentezini inhibe ederek hücre duvarı yapısını bozarlar. Ekinokandinler invaziv mantar enfeksiyonlarının önlenmesi ve ampirik tedavisinde etkilidirler. *Candida* türleri için fungisidal aktivite gösterirler. *Aspergillus* türleri için ise, esasen hücre duvarı büyümesini hifal uç bölgesinde inhibe eder ve fungistatik bir etki oluştururlar. Günümüzde yaygın kullanılan üç ekinokandin türevi kaspofungin, mikafungin ve anidulafungindir [4]. Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin benzer aktiviteler göstermektedir.

Ekinokandinler *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* de dahil olmak üzere birçok *Candida* türüne karşı güçlü aktivite gösterirler. *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* için, MİK değerleri genellikle daha yüksektir, ancak bu enfeksiyonların klinik tedavisi için genellikle faydalı ajanlardır. Ekinokandinler gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilirler ve bu nedenle bu ilaçların sadece parenteral formülasyonları bulunur [4]. Ekinokandinler hastalar tarafından genellikle iyi tolere edilen ve düşük yan etkileri olan ilaçlardır. Yapılan çalışmalar bu ilaçların amfoterisin B veya triazolere kıyasla daha yüksek sağ kalım oranları ile ilişkili olduğunu da göstermiştir, öyle ki

ekinokandinler bu özellikleri ile kandidemi ve invaziv kandidiyazis tedavisinde birinci basamak antifungal ilaçlar olarak önerilmektedir [9]. Uzun etkili ve güvenli bir ekinokandin türevi olan ve henüz geliştirilmekte olan rezafungin ise faz 2 deneysel çalışma aşamasındadır [10].

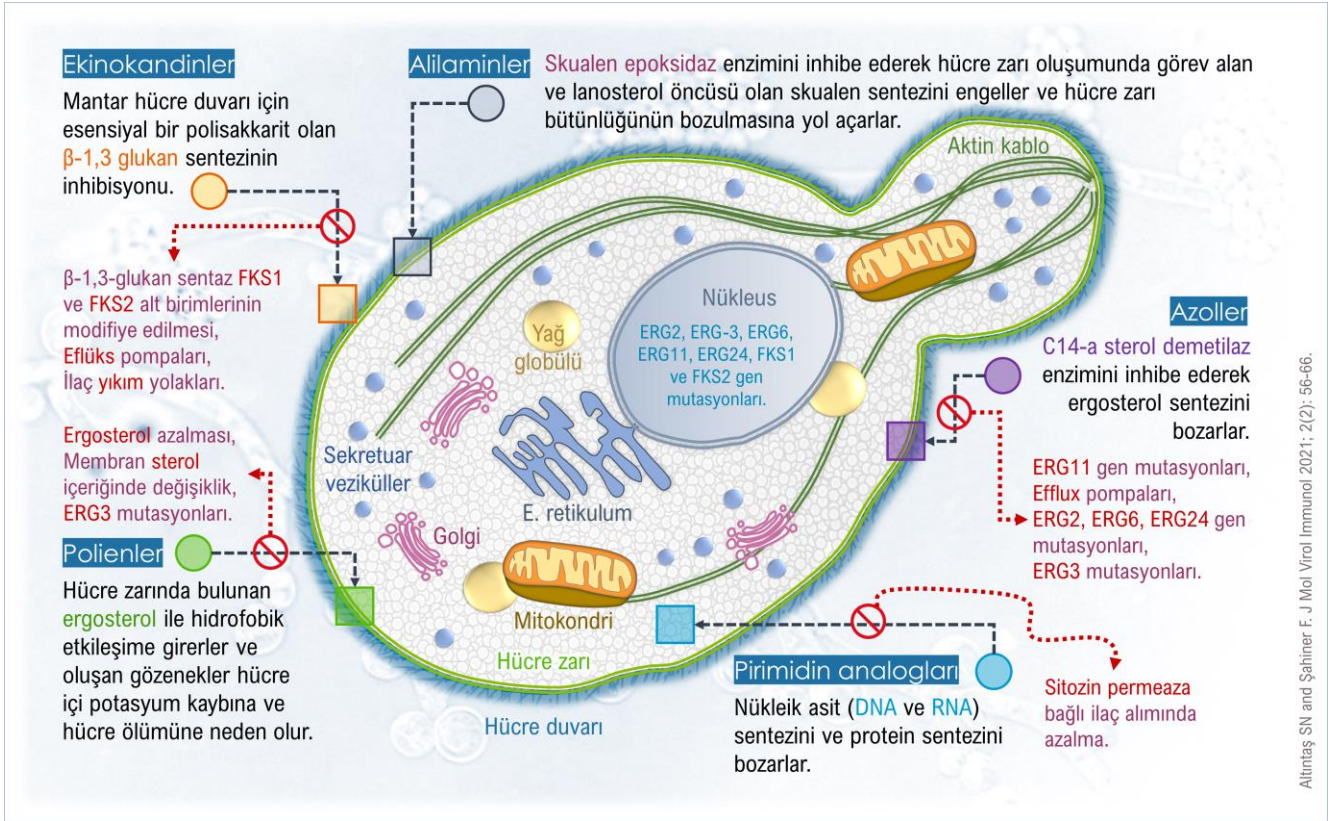
#### 5. Alilaminler

Alilaminler azollere benzer şekilde ergosterol sentezini inhibe ederler, ancak azollerden farklı olarak daha erken bir aşamada etki gösterirler. Bu ilaçlar skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek hücre zarı oluşumunda görev alan lanosterol öncüsü bir molekül olan skualenin sentezini engeller ve böylece hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar [9,11]. Butenafin, naftifin ve terbinafin bu sınıfta yer alan ilaçlardır [11]. FDA (The United States Food and Drug Administration) tarafından 1996 yılında kullanım onayı alan terbinafin başlıca sistemik olmayan mantar enfeksiyonları için lokal tedavide endike olsa da, hem topikal hem de sistemik kullanım için onaylanmıştır. Topikal terbinafin tinea pedis, kruris ve korporis tedavisi için onaylanmıştır. Oral formülasyonları onikomikoz (*tinea unguium*) ve tinea kapitisin sistemik tedavisinde endikedir. Terbinafin lenfokutanöz ve kutanöz sporotrikoz tedavisinde de kullanılmaktadır [12].

#### 6. Diğer antifungaller

Griseofulvin, polimerize fungal mikrotübüllere bağlanan, böylece de-polimerizasyonu inhibe eden ve fungal hücre replikasyonunun başarısızlığına yol açan mitotik bir inhibitördür. Griseofulvin deri, saç ve tırnakta gelişen ve topikal tedaviye direnç gösteren dermatofitozların sistemik tedavisinde kullanılmaktadır [12]. Siklopiroks, kinolin türevi antifungal bileşikler, potasyum iyodür, çinko pyrithione, oxaborole, tavaborole, yeni azol ve ekinokandin türevleri, antimikrobiyal peptitler gibi çok sayıda farklı antifungal ilaç da farklı endikasyonlarda kullanılmakta veya denenmektedir [6,11-13]. Fungal sfingolipitler, GPI-ankor (GPI; glikozil-fosfatidil-inozitol) biyosentezi, farnesil transferaz, kalsinörin, Hsp90, asetil transferazlar ve deasetilazlar ve TOR protein kinazları gibi antifungal moleküller ve enzimler ise yeni antifungal hedefler olarak öne çıkmaktadır [14].





**Şekil 1.** Kandidoz tedavisinde kullanılan ilaçların hüresel hedefleri ve antifungal direnç mekanizmaları.

### Candida Türlerinde Antifungal Direnç

Antifungal ilaçlar; tabletler, çözeltiler veya süspansiyonlar halinde tatbik edilen geleneksel dozaj formları olarak mevcuttur. Bununla beraber, direnç gelişiminin getirdiği sınırlamalar ilaç etkinliğinin azalmasına veya kaybına yol açmakta ve yüksek doz ilaç uygulamaları ve artan dozaj sıklığı sonucunda ortaya çıkan yan etkiler ve toksisite gibi hastaları doğrudan etkileyen olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir [5]. Antifungal direnç tanımı, hem ilacın etkinlik spektrumunu belirleyen intrinsek direnci (*doğal direnç*) hem de ekstrinsek direnci (*kazanılmış direnç*) içerir. Bir diğer sorun ise bir antifungal ilaca direnç geliştiğinde, benzer yolla etki gösteren diğer ilaç veya ilaçlarında etkilenmesiyle sonuçlanan çapraz direnç gelişimidir [4]. Çoklu antimikrobiyal ilaç direnci diğer mikroorganizma türlerinde olduğu gibi, mantarlarda da karşımıza çıkan ciddi bir tehdit haline gelmektedir [6]. Antifungal dirence neden olan moleküler mekanizmalar karmaşıktır ve tedavi süreçlerinde mantar hücreleri toksik ilaçların varlığına adapte olmaya çalışırlar. Moleküler direnç stratejileri ilaç hedeflerindeki mutasyonlar ile ilaçlara olan afinitenin azalması, eflüks sisteminin ekspresyonu

ile ilaç hedefi olan proteinlerin aşırı üretimi, ilgili genin promotör bölgesinin modifikasyonu, ilaç yıkımı ve polimorfik ilaç yanıtları gibi farklı mekanizmaları içerir (Şekil 1) [6].

#### 1. Amfoterisin B direnci

Amfoterisin B, daha yüksek MİK değerlerine sahip olduğu bilinen *C. lusitanae* dışındaki çoğu *Candida* türüne karşı aktivite gösterir [4]. Polien direnci genellikle ergosterol biyosentezinin fonksiyon kaybına atfedilebilen ergosterolün azalmasını ve ERG3 mutasyonlarını içerir [6].

#### 2. Azollere direnç

Flukonazol tıbbi önemi olan *Candida* türlerinin çoğuna karşı etkili bir ilaç iken, bu ilaca karşı doğal dirençli bir tür olan *C. krusei*'ye karşı aktif değildir. Ekstresek triazol direnç oranı ise özellikle *C. glabrata* için artış eğiliminde olup, geçtiğimiz on yıl boyunca, flukonazol dirençli *C. glabrata* suşlarının sıklığı %9'dan %14'e yükselmiştir. Azol çapraz direncinin bir sonucu olarak, flukonazol dirençli çoğu izolat aynı zamanda vorikonazole de direnç göstermektedir [4].

Mayalarda azollerin hedef enzimi olan "lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaz" enzimi ERG11 geni tarafından kodlanır. Dolayısıyla, bu genin nokta

mutasyonları, azol bağlanma bölgesinin yapısını değiştirerek ilacın enzime bağlama eğilimini azaltabilir veya yetersiz hale getirebilir [6]. Azol grubu ilaçların hedefi olan lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaz gen mutasyonu *Aspergillus*, *Candida* ve *Cryptococcus* türlerinde azol direncinin temel mekanizmasıdır. *Aspergillus* türleri için bu durum genellikle azol grubu ilaçların tümüne karşı dirence neden olurken, *Candida* türleri için, bu ilaç hedefinin modifikasyonu pan-azol direnci, tek başına flukonazol direnci veya bir azol alt grubuna direnç gelişimi ile sonuçlanabilir. İkinci bir direnç mekanizması akış (*efflux*) pompalarının artışı ile hücre içi ilaç seviyelerinin azalması sonucunda azol grubu ilaçlara direnç gelişmesidir [4]. Azol direnci ile ilişkili üçüncü bir önemli mekanizma ise ergosterol biyosentezindeki değişiklikler içerir. ERG2, ERG3, ERG6 ve ERG24 gibi ergosterol biyosentezi genlerindeki mutasyonlar azol grubu ilaçlara duyarlılığın azalması ile sonuçlanabilir. Ergosterol biyosentez yolundaki değişiklikler nedeni ile ergosterol seviyelerindeki düşüş azol türevi ilaçların normal terapötik dozlarda ergosterol sentezini önlemede yetersiz hale gelmesi ile sonuçlanır [6].

### 3. Flusitozin direnci

Flusitozin, çoğu *Candida* türüne karşı aktivite gösterse de tek başına kullanıldığında bu ilaca karşı hızlı bir şekilde direnç gelişmektedir. Bu nedenle, bu ilaç ancak belirli durumlarda amfoterisin B gibi güçlü bir antifungal ilaçla birlikte uygulanabilmektedir. *C. albicans* izolatları arasında direnç oranının %10'a yakın olduğu ve direnç mekanizmasının sıklıkla sitozin permeaza bağlı ilaç alımındaki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında tedavi sırasında, flusitozini, bu ilacın toksik metabolitleri olan 5-fluorourasil ve 5-fluorouridin monofosfata dönüştüren enzimlerdeki mutasyonların da direnç gelişimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir [4].

### 4. Ekinokandinlere direnç

Ekinokandinlere karşı direnç, genellikle,  $\beta$ -1,3-glukan sentazın FKS1 ve FKS2 alt birimlerindeki amino asit rezidülerinin modifiye edilmesi, eflüks pompaları ve ilaç yıkım (*degradation*) yolları ile kazanılır. Katalitik alt ünite genlerini kodlayan FKS1 ve FKS2'deki mutasyonlar, glukan sentaz aktivitesinde

dramatik bir azalma ile sonuçlanabilen amino asit değişikliklerine neden olabilir. FKS1 ve FKS2 amino asit rezidülerindeki değişiklikler mantar türlerine bağlı olarak farklılık gösterebilir, ancak bu değişiklikler aynı zamanda ekinokandin direncine de neden olabilmektedir [6].

### Antifungal Duyarlılık Testleri

Antifungal direnç mekanizmalarının bilinmesi ile dirençli izolatların tespiti ve in-vitro ölçüm sistemlerinin verdiği sonuçların doğrulanması mümkün olmuştur. Antifungal duyarlılık testleri antibakteriyel testlere göre daha az gelişmiş ve daha az kullanılmaya devam etse de bu testlerin validasyonu için büyük ölçüde antibakteriyel testlerden elde edilen bilimsel verilerden yararlanılmıştır [15]. Antifungal ilaç direnci genellikle, standart bir protokole göre belirli bir zaman aralığında test edilen belirli bir ilaç konsantrasyonunda bir mikroorganizmanın çoğalmasının ölçüldüğü MİK değeri ile belirlenir. Mikroorganizmanın çoğalmasında önemli bir azalmaya ya da çoğalmanın tam olarak inhibe edilmesine yol açan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak ifade edilir. Antifungal duyarlılık testlerinin verdiği sonuçlar mantar inokulumunun konsantrasyonu, ortamın kompozisyonu ve pH'ı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi gibi birçok teknik faktörden etkilenmektedir. Öyle ki, antifungal duyarlılık testleri 1990'lı yılların erken dönemlerine kadar standartlaştırılmadı ve bu nedenle söz konusu testlerin laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği zayıftı [16]. Standartlaştırılmış antifungal duyarlılık test yöntemlerinin geliştirilmesi son yıllarda üzerinde yoğun araştırmaların yapıldığı bir konu olmuştur. NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*; şimdiki adı ile *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI) tarafından geçmişte mayalar için M27-A'da (1997) ve küfler için M38-P'de broth mikrodilüsyon temelli referans yöntemler tanımlanmıştır [17,18]. Daha sonraki yıllarda NCCLS M27-A üzerinden yapılan güncellemelerle bu standartların A2 ve A3 (CLSI M27-A3) versiyonları yayımlandı [15,16,19,20]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) CLSI ve Avrupa'da EUCAST (*European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing*) bünyesindeki bilimsel komiteler tarafından tanımlanan in-vitro

test metodolojileri antifungal duyarlılık testleri için referans yöntemler olarak kabul edilmektedir [21]. Günümüzde standart olarak kabul edilen iki test yöntemi CLSI M27-A3 ve EUCAST-AFST (*Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of EUCAST*) mikrodilüsyon yöntemleridir [16]. Standartları tanımlanmış bir diğer antifungal duyarlılık test yöntemi ise disk difüzyon yöntemidir. CLSI tarafından 2017 yılında hem mikrodilüsyon hem de disk difüzyon yöntemi standartlarının birleştirildiği CLSI M60 rehberi yayımlanmıştır [22].

Antifungal duyarlılık testlerinin sunduğu sonuçlarda standardizasyon sağlanmasına yönelik çabalara rağmen yöntemler arasında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir [21]. Dirençli bir suşun duyarlı olarak raporlanması "çok büyük hata" (*very major error, VME*), duyarlı bir suşun dirençli olarak raporlanması "büyük hata" (*major error, ME*) ve yöntemlerden biri ile DBD olarak tanımlanan bir suşun diğer bir yöntemle dirençli ya da duyarlı olarak raporlanması ise "küçük hata" (*minor error, mE*) olarak tanımlanmaktadır [10].

### 1. Dilüsyon yöntemleri

Maya ve küflerin antifungal ajanlara duyarlılığını belirlemek için kullanılan sıvı besiyeri (broth) veya katı besiyeri (agar) temelli dilüsyon yöntemleri mevcuttur [16]. Bu yöntemlerin genel prensibi seri dilüsyonu yapılmış ve azalan oranlarda antifungal içeren besiyerlerinin (sıvı besiyeri tüpleri, mikrokuyucuklu plakalar veya agar besiyeri) kullanılmasını içerir [23].

#### 1.1. Makrodilüsyon

Broth makrodilüsyon yöntemi, test edilecek mayanın üretilme ortamı (sıvı besiyeri) ve antifungal bir maddenin artan konsantrasyonlarını içeren bir dizi test tüpüne inokülasyonunu içerir [23]. Makrodilüsyon testi için, üremedeki belirgin azalmanın "üreme kontrolünün 1:5 oranında seyreltilmesinin türbiditesine" eşdeğer olduğu gösterilmiştir. Bu son nokta aynı zamanda üreme kontrolüne göre çoğalmada %80 azalma olarak da ifade edilebilir. Bununla birlikte, mikrodilüsyon formatı kullanıldığında ve spektrofotometrik okuma yapıldığında, %80 kuralının aşırı kısıtlayıcı olduğu ve görsel son noktaya en iyi yaklaşan değer "spektrofotometre ile üremenin %50 inhibisyonu" olduğu değerlendirilmektedir [15].

### 1.2. Mikrodilüsyon

Broth mikrodilüsyon yönteminin prensibi makrodilüsyon yöntemine benzerdir, ancak test tüplerini kullanmak yerine, mikrobiyal üreme-çoğalma 96 kuyucuklu bir mikrotitre plakasında gerçekleştirilir ve son nokta, maya çoğalmasının önceden belirlenmiş bir dereceye düştüğü kuyudaki konsantrasyon olarak okunur [23]. Halen, maya ve küflerin antifungal ajanlara duyarlılığını belirlemek için ilki CLSI ve ikincisi EUCAST-AFST tarafından geliştirilmiş olan iki uluslararası standart metodoloji mevcuttur. Her iki prosedürün de kurum içi ve kurumlar arası tekrarlanabilirliği yüksektir ve bu yöntemlerle düşük ve yüksek MİK değerlerine sahip türleri antifungal ilaçlara göre tanımlamak mümkündür. Bu iki yöntem inokülüm, kullanılan besiyeri ortamı ve MİK değeri okumaları yönlerinden farklılıklar içerir [16]. Örneğin; CLSI M27 yöntemi, *Candida* türleri için 48 saatte bir son nokta (*end point*) okumasını önerir. Bununla beraber, izolatların birçoğu için, 24. ve 48. saatlerde okuma arasındaki fark minimumdur ve testin yorumunu (yani, izolatın duyarlı veya dirençli olarak gruplandırılmasını) değiştirmemektedir. Yapılan çalışmalar 24 saatlik okumaları da içermeye başlamıştır, çünkü MİK değeri sıklıkla 24. saatte okunabilmektedir ve 24. saatte yapılan okumalar bazı izolatlar için klinik olarak daha uygun ve anlamlı olabilmektedir [15].

### 2. Difüzyon yöntemleri

Başlıca E test ve disk difüzyon yöntemlerini içerir. E test yöntemi belirli bir gradyanda antifungal emdirilmiş özel şeritler kullanılarak gerçekleştirilirken, disk difüzyon yönteminde kullanılan her bir disk sabit miktarda antifungal madde içerir. Ancak aynı antifungal ilacın farklı miktarlarda emdirildiği diskler kullanılarak farklı türler için farklı konsantrasyonlarda duyarlılık testleri yapılabilmektedir [15,16,23].

#### 2.1. Disk difüzyon

Disk difüzyon yöntemi, bir test organizması ile inoküle edilmiş bir agar plağına antimikrobiyal etken madde ile doyurulmuş bir disk yerleştirilerek gerçekleştirilir. Antimikrobiyal madde agar içerisine yayılır ve diskin etrafında bir çökelti oluşturur. Son nokta, mikrobiyal üremenin olmadığı disk etrafındaki açıklığın çapı olarak



okunur [23]. CLSI tarafından *Candida* türlerinin in-vitro duyarlılık testleri için 2004 yılında (M44-A), 2006 yılında (M44-S2) ve 2009 yılında (M44-A2) türe özgü olmayan direnç sınır değeri önerileri yayımlanırken, 2012 yılında (M44-S4) ilk kez türe özgü direnç değerlerini içeren CLSI direnç sınır değeri önerileri yayımlandı. Son olarak 2017 yılında yapılan güncelleme ile türe özgü direnç değerlerini içeren ve hem mikrodilüsyon hem de disk difüzyon standartlarının birleştirildiği yeni bir versiyon (CLSI M60) yayımlandı [20-22,24].

Flukonazol ve vorikonazol diskleri için duyarlılık sınır değerlerinin ayrıntılı olarak tanımlandığı disk difüzyon yönteminde çoğalma ortamı (besiyeri) seçimi kritik öneme sahiptir. Bazı araştırmacılar %0.2 glikoz ile desteklenmiş RPMI 1640 agar kullanmaktadır. CLSI standartlarında ise %2 glikoz ve 0.5-µg ml metilen mavisi ile desteklenmiş Müller-Hinton agar kullanılması önerilmektedir. Disk difüzyonu, aynı zamanda okunması kolay ve keskin inhibisyon bölgeleri oluşturduğu için ekinokandinlerin maya türlerine karşı aktivitesini belirlemek için de uygundur [16].

#### 2.2. E Test (mikrogradient difüzyon)

E test yöntemi (AB Biodisk, Solna, İsveç), antifungal duyarlılık testi için onaylanmış ve ticari olarak satılan bir testtir. MİK değerleri, test edilen izolatın kültüre edildiği agar plaka üzerine yerleştirilen antifungal ilaç emdirilmiş ve kalibre edilmiş bir şerit üzerinde çoğalma inhibisyon bölgesinin konsantrasyon gradyanı ile kesişme noktasından belirlenir.

Sonuçları değerlendirmede karşılaşılan bazı güçlükler olmasına rağmen, standart yöntemlerle yapılan karşılaştırmalar bu yöntemin deneyim ve standartlaştırılmış tekniklerle çoğu *Candida* türü ve azol türevi antifungal ajan için kabul edilebilir sonuçlar sunduğunu göstermiştir. Bununla beraber bazı türler için farklı antifungaller ile düşük korelasyonlu sonuçlar da elde edilebilmektedir, bu nedenle E test kullanıcıları lokal prosedürlerini referans yöntemine göre dikkatlice doğrulamalıdır [15].

E test tekniği ile antifungal duyarlılık araştırılmasında besiyeri ortamının seçimi de önemlidir ve RPMI bazlı agarlar en uygun besiyerleri olarak kabul edilir. Bazı laboratuvarlarda %2 glikoz ve 0.5 µg/ml metilen

mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar da kullanılmaktadır [16].

#### 3. Akım sitometri yöntemi

Akım sitometrisi (*flowcytometry*) antifungal duyarlılık testi için olası bir araç olarak kabul edilmektedir. Yöntem özellikle *Candida* türlerinin uygun boya ile boyanması (veya boya almaması) ile hasar görmüş mantarların hızlı bir şekilde tespit edilmesine izin verir. Son çalışmalar akım sitometrisi tabanlı tekniklerin referans yöntemle korelasyon potansiyeli olduğunu göstermiştir. Bu yaklaşım floresan canlılık boyaları ile mayalar ve küflerde ilaca bağlı hasarın doğasını incelemek ve MİK ve minimum fungusit konsantrasyonu (MFK) değerlerini belirlemek için kullanılmıştır [15].

#### 4. Ticari yöntemler

Kolorimetrik mikrobroth dilüsyon temelli bir antifungal panel olan Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems) yöntemi CLSI metodolojisi ile karşılaştırıldığında olumlu sonuçlar alınmıştır. ATB Fungus 2 (bioMérieux, La Balme-les Grottes, Fransa) yöntemi ise *Candida* türlerinde alternatif bir diğer antifungal duyarlılık testidir. Tam otomatik bir ticari antifungal duyarlılık test sistemi olan VITEK 2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, ABD) yöntemi *Candida* izolatları için CLSI referans broth mikrodilüsyon yöntemi ile uyumlu kantitatif ve kalitatif sonuçlar vermiştir. ASTY kolorimetrik mikrodilüsyon paneli (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan), Candifast (International Microbio/Stago Group, Milan, İtalya), Integral Sistem Yeast (Liofilchem Diagnostics, L'Aquila, İtalya) ve Fungitest (Bio-Rad, Paris, Fransa) gibi çeşitli ticari antifungal duyarlılık test sistemleri de ticari olarak erişilebilir yöntemler olarak kullanıma sunulmuştur [15,16,23].

#### 5. Moleküler yöntemler

Nükleik asit bazlı moleküler tanı yöntemleri, klinik örneklerde düşük konsantrasyonlarda bulunan patojen mantarların hızlı tespiti, patojenin cins ve tür seviyesinde tanımlanması ve direnç mekanizmalarının değerlendirilmesi için özellikle uygundur. Steril bir kan örneğinde tek bir enfekte edici genomun doğrudan analizini kolaylaştıran gerçek zamanlı PCR (*Polymerase Chain Reaction*) analizlerini de içeren çok çeşitli moleküler teknolojiler mevcuttur ve yakın

zamanda bu testlerin bazıları ticarileştirilmiştir (Roche LightCycler SeptiFast ve T2 Biosystems T2Candida gibi) [24]. Moleküler teknolojinin heyecan verici uygulamalarından biri de tedavi sırasında gelişen spesifik direnç mekanizmalarının doğrudan tespitidir. Yüksek duyarlılık ve verimliliğe sahip alele özgü (*allele specific*) moleküler saptama teknolojisini kullanan gerçek zamanlı PCR analizleri ilaca dirençli suşların hızlı saptanmasını sağlamakta ve tedavi yönetimine yardımcı olarak hasta bakımını iyileştirme potansiyeli taşımaktadır [24].

Genel olarak, her bir in-vitro duyarlılık test yönteminin kendi avantajları ve dezavantajları vardır. Referans yöntemler olan EUCAST ve CLSI standart metotları uygulaması nispeten güç yöntemler olup günlük rutine yönelik testler değildir. E test ve moleküler yöntemler nispeten pahalı yöntemler olmakla beraber, belirli avantajlara sahip alternatif yöntemlerdir. Disk difüzyon deneyleri, epsilometre testleri (E test), kolorimetrik veya otomatize test yaklaşımlarının ise kullanımı kolaydır ve referans yöntemlerle kabul edilebilir düzeyde korelasyon gösterirler [16,25]. Yeni bir yöntem olan MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) temelli antifungal duyarlılık testleri ise umut verici yeni

bir alternatif olarak görülürken, sadece birkaç ilaç-patojen kombinasyonu için uyarlanmış olması günümüz için önemli bir dezavantaj olup yöntemin geliştirilmesine ve standardize edilmesine gereksinim duyulmaktadır [25].

## Sonuç

Giderek artan oranlarda ortaya çıkan invaziv *Candida* enfeksiyonları önemli bir halk sağlığı tehdidi haline geldiği gibi nozokomiyal enfeksiyonlar arasında tedavisi güç olan ve önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili bir enfeksiyon grubu olmuştur. Bu enfeksiyonların yönetimi erken ve hedeflenmiş antifungal tedavi gerektirirken, antifungal tedavi stratejisinin planlanmasında tür düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerinin kritik önem taşıdığı açıktır. Standart referans testlerin veya ticari duyarlılık testlerinin her birinin belirli avantaj ve dezavantajları bulunmakla beraber, referans test yöntemlerindeki güncellemeler ve bu yöntemlerle karşılaştırılabilir sonuçlar sunan yeni tekniklerin standardize edilmesi ve yaygın kullanıma girmesi ile mikoloji laboratuvarlarında tekrarlanabilir ve karşılaştırılabilir sonuçların elde edilmesi ve tüm bu gelişmelerin antifungallere dirençli izolatların yayılması ile mücadelede önemli katkılar sunması beklenmektedir.

**Çıkar beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur. Bu makale Sema Nur ALTINTAŞ'ın "*Candida* Türlerinin Vorikonazol ve Flukonazol Duyarlılık Profillerinin Araştırılması" başlıklı 2021 tarihli Yüksek Lisans tezinden türetilmiştir.

**Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

## Kaynaklar

1. d'Enfert C, Bougnoux ME. Human Fungal Infections. In: McQueen CA (ed), Reference Module in Biomedical Sciences (3rd edition). 2014, Elsevier. pp: 1-13.
2. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4(2): 119-28. [Crossref]
3. Gabaldón T, Carreté L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res 2016; 16(2): fov110. [Crossref]
4. Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. Infect Dis Clin North Am 2016; 30(1): 51-83. [Crossref]
5. Sawant B, Khan T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of

- candidiasis. Biomed Pharmacother 2017; 96: 1478-90. [Crossref]
6. Lee H, Lee DG. Novel Approaches for Efficient Antifungal Drug Action. J Microbiol Biotechnol 2018; 28(11): 1771-81. [Crossref]
7. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Drug Des Devel Ther 2016; 10: 1161-71. [Crossref]
8. Arian S, Rex JH. Lipid-based antifungal agents: current status. Curr Pharm Des 2001; 7(5): 393-415. [Crossref]
9. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, et al; Mycoses Study Group. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level

quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis* 2012; 54(8): 1110-22. [[Crossref](#)]

**10.** Thompson GR, Soriano A, Skoutelis A, Vazquez JA, Honore PM, Horcajada JP, et al. Rezafungin versus Caspofungin in a Phase 2, Randomized, Double-Blind Study for the Treatment of Candidemia and Invasive Candidiasis- The STRIVE Trial. *Clin Infect Dis* 2020: ciaa1380. [[Crossref](#)]

**11.** Sahni K, Singh S, Dogra S. Newer Topical Treatments in Skin and Nail Dermatophyte Infections. *Indian Dermatol Online J* 2018; 9(3): 149-58. [[Crossref](#)]

**12.** McKeny PT, Nessel TA, Zito PM. Antifungal Antibiotics. [Updated 2020 Nov 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): 2020, StatPearls Publishing, NBK43068. pp:1-13.

**13.** von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive Fungal Infection. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116(16): 271-8. [[Crossref](#)]

**14.** Gupta AK, Foley KA, Versteeg SG. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. *Mycopathologia* 2017; 182(1-2): 127-41. [[Crossref](#)]

**15.** Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 643-58. [[Crossref](#)]

**16.** Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010; 53(1): 1-11. [[Crossref](#)]

**17.** Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1360-7. [[Crossref](#)]

**18.** Lee SC, Lo HJ, Fung CP, Lee N, See LC. Disk diffusion test and E-test with enriched Mueller-Hinton

agar for determining susceptibility of *Candida* species to voriconazole and fluconazole. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42(2): 148-53.

**19.** Pandey N, Gupta MK, Paul P, Tilak R. Necessity to identify *Candida* species accurately with minimum inhibitory concentration determination in each case of bloodstream infections. *J Infect Public Health* 2020; 13(5): 753-8. [[Crossref](#)]

**20.** Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(1): 107-19. [[Crossref](#)]

**21.** Hazirolan G, Sarıbaş Z, Arıkan Akdağlı S. Klinik *Candida glabrata* İzolatlarında Flukonazol ve Vorikonazol Duyarlılığının Saptanmasında Mikrodilüsyon ve Disk Difüzyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Yeni CLSI Direnç Sınır Değerleri ile Duyarlılık Sonuçlarındaki Değişimin Belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(3): 428-37. [[Crossref](#)]

**22.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (1st Edition), CLSI document M60. 2017, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

**23.** Kuykendall RJ, Lockhart SR. Microbroth Dilution Susceptibility Testing of *Candida* species. *Methods Mol Biol* 2016; 1356: 173-81. [[Crossref](#)]

**24.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved Standard-second edition, CLSI document M44-A2. 2009, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

**25.** Knabl L, Lass-Flörl C. Antifungal susceptibility testing in *Candida* species: current methods and promising new tools for shortening the turnaround time. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2020; 18(8): 779-87. [[Crossref](#)]