

Vulvovajinal Kandidoz ve Vajinal Kolonizasyondan İzole Edilen *Candida* İzolatlarında Bazı Virülans Faktörlerinin ve Antifungal Duyarlılığın Araştırılması

Investigation of Some Virulence Factors of *Candida* Strains and Antifungal Susceptibilities Isolated From Vulvovaginal Candidiasis and Vaginal Colonization

Gamze Altan^{*@}, Gülşen Hazırolan^{**@}, İpek Mumcuoğlu^{***@}, Cemal Reşat Atalay^{****@}, Altan Aksoy^{*****@}, Neriman Aksu Koca^{*****@}

* Bozyaka Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

*** Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**** Sağlık Bakanlığı Ankara Şehir Hastanesi Kadın Doğum Hastanesi, Ankara, Türkiye

***** Ankara Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

***** Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Altan G, Hazırolan G, Mumcuoğlu İ, Atalay CR, Aksoy A, Aksu Koca N. Vulvovajinal kandidoz ve vajinal kolonizasyondan izole edilen *Candida* izolatlarında bazı virülans faktörlerinin ve antifungal duyarlılığın araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(3):163-173.

Öz

Amaç: Çalışmanın amacı, vulvovajinal kandidoz ve vajinal *Candida* kolonizasyonu saptanan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinde salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz aktivite varlığının araştırılması, biyofilm oluşturma kapasitelerinin ve antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesidir.

Yöntem: Çalışmada kadın hastalıkları ve doğum kliniğine başvuran 1000 kadın hasta taranmıştır. Hastalar, klinisyen tarafından Dünya Sağlık Örgütü'nün genital sistem enfeksiyonlarında belirlendiği tanı kriter indeksleri kullanılarak incelenmiştir. Klinik belirtileri uyumlu hastalar vulvovajinal kandidoz tanısını almıştır. Kliniği uyumsuz olan hastalar kolonizasyon kabul edilmiştir. Enfeksiyon grubunda 112 vulvovajinal kandidozlu hasta yer alırken, kolonizasyon grubunda 133 asemptomatik kadın yer almıştır. İzolatların tanımlanması; mısır unu tween 80 agarda mikroskopik morfolojileri ve matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF) ile yapılmıştır. *Candida* izolatlarının proteinaz aktivitesi %1'lik siğir serum albüminli besiyeriyle, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar yöntemiyle, esteraz aktivitesi tween 80 katkılı agar yöntemiyle, slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yöntemiyle belirlenmiştir. Antifungal duyarlılık, gradient test yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: *Candida albicans* gruplarında en çok izole edilen tür olarak belirlenirken ikinci sırada *Candida glabrata* kompleksi yer almıştır. Gruplar arasında virülans faktörleri açısından istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Tür düzeyinde incelemede, fosfolipaz, esteraz pozitiflik oranının *C. albicans*'larda ($p=0.001$), proteinaz pozitiflik oranının *albicans*-dışı *Candida* türlerinde daha yüksek olduğu ($p=0.001$) ve *albicans*-dışı *Candida* türlerinin daha fazla biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir ($p=0.001$).

Sonuç: Çalışmamızda enfeksiyon ve kolonizasyon gruplarından izole edilen izolatlar, virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık profilleri açısından anlamlı bir fark göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: Vulvovajinal kandidoz, *Candida* kolonizasyonu, virülans faktörleri

ABSTRACT

Objective: The study aimed to investigate the presence of secretory acid proteinase, phospholipase, esterase activity, biofilm-forming capacities and antifungal susceptibility profiles in *Candida* species isolated from patients with vulvovaginal candidiasis and vaginal *Candida* colonization.

Methods: In this study, 1000 female patients who applied to obstetrics and gynaecology clinic were screened. The patients were examined by the clinician using the diagnostic criteria indices determined by the World Health Organization in genital tract infections. There were 112 patients with vulvovaginal candidiasis in the infection group, and 133 asymptomatic women in the colonization group. Identification of isolates; microscopic morphologies on cornmeal agar medium were made with matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Proteinase activity of *Candida* isolates was determined by 1% bovine serum albumin medium, phospholipase activity was determined by egg yolk agar method, and the esterase

Alındığı tarih / Received:

31.05.2022 / 31.May.2022

Kabul tarihi / Accepted:

10.02.2023 / 10.February.2023

Yayın tarihi / Publication date:

01.09.2023 / 01.September.2023

ORCID Kayıtları

G. Altan 0000-0002-7095-0218

G. Hazırolan 0000-0003-4546-9729

İ. Mumcuoğlu 0000-0002-6392-8880

C. R. Atalay 0000-0002-0148-0945

A. Aksoy 0000-0001-7939-3481

N. Aksu Koca 0000-0002-4647-1014

✉ gamzealtan3506@gmail.com

activity was determined by Tween 80 added agar method, and slime factor presence was determined by Congo red brain-heart infusion agar method. Antifungal susceptibility tests were performed using the gradient test method.

Results: *Candida albicans* was the most isolated species in the study, while *Candida glabrata* complex was the second. There was no statistical difference between the study groups in terms of virulence factors ($p>0.05$). At the species level, phospholipase and esterase positivity rates were found to be higher in *Candida albicans* ($p=0.001$). It was determined that the proteinase positivity rate was higher in *Candida* species other than *Albicans* ($p=0.001$) and they formed more biofilms ($p=0.001$).

Conclusion: In this study, no significant differences were identified between the groups in terms of virulence factors and antifungal sensitivities.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, *Candida* colonization, virulence factors

GİRİŞ

Vulvovajinal kandidoz (VVK), kadınlarda bakteriyel vajinozdan sonra en yaygın görülen vajen enfeksiyonudur⁽¹⁾. *Candida* türleri vajinada hem kolonize hem de patojen olarak bulunabilir. *Candida* kolonizasyonunun aylar ya da yıllar sürebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir⁽²⁻⁴⁾. VVK'nin klinik bulgularından hiçbiri patognomonik değildir; bu nedenle, klinik tanı her zaman mikrobiyolojik yöntemlerle doğrulanmalıdır.

Vulvovajinal kandidozlu kadınlardan izole edilen en yaygın tür *Candida albicans* (%76-89) olarak belirlense de *albicans*-dışı *Candida* türlerinde de hızlı artış rapor edilmiştir. *Candida* tür dağılımlarının, ülkeler ve bölgeler arası çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir⁽²⁾. Son yıllarda tüm kandidozlarda olduğu gibi vajinal kandidozlarda da epidemiyolojik özellikler ya da duyarlılık profilleri değişmektedir. Lokal epidemiyolojik verilerin ve duyarlılık profillerinin bilinmesi antifungal seçiminde yol gösterici olabilecektir. Kandidoz gelişiminde, konağın savunma mekanizmalarındaki zayıflamanın yanı sıra etkene ait virülans faktörleri de önemli rol oynar. Bu faktörler arasında en çok araştırılanlar, proteinaz, fosfolipaz ve esteraz enzim aktiviteleri ile biyofilm oluşumudur^(5,6). Enzimler, maya hücresinin epitel hücrelerine girmesi ve derin dokulara invazyonunda rol oynar. Biyofilm oluşumunun da maya hücresini konağın savunma mekanizmalarından koruyan ve konak hücresine, protez ve kateterlere tutunup daha kolay kolonizasyona ve enfeksiyonlara yol açmasını sağlayan bir virülans faktörü olduğu bilinmektedir⁽⁷⁾.

Bu çalışmada, vajen sürüntü örneklerinden izole edilerek, enfeksiyon etkeni ve kolonizasyon olarak gruplandırılan *Candida* izolatlarında, proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivitelerinin varlığının, biyofilm oluşturma özelliğinin araştırılması ve

izolatların antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (07.09.2016 tarih ve 1005 karar numarası) onaylanmıştır.

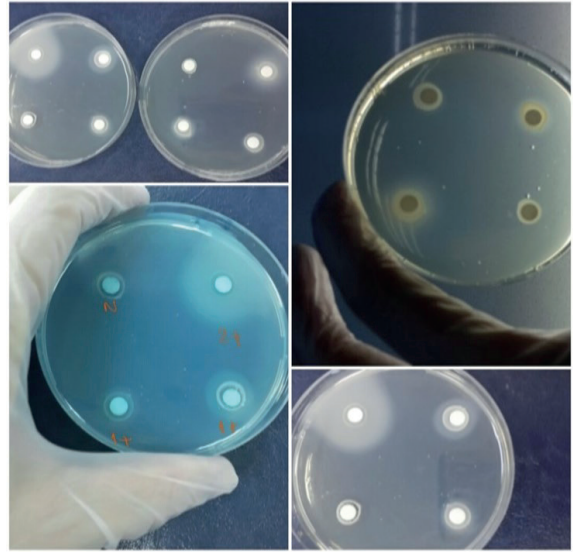
Çalışmaya; Aralık 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran 18-81 (ortalama 38.76±11) yaş arası 1000 kadın hasta dahil edilmiştir. VVK ön tanısı ile vajinal sürüntü örnekleri laboratuvara gönderilmiştir. Vajinal sürüntü örnekleri steril eküvyonla vajinanın üçte ikisinin orta kısmından bir adet kültür sürüntü örneğine bir adet direkt preparat örneği olarak çevre dokulara değiştirilmeden alınmıştır. Transport besiyeri içindeki sürüntü örneğinden Sabouraud %4 dextrose agar (SDA, Merck, Almanya) ve kanlı agar besiyerine (Oxoid, Birleşik Krallık) ekim yapılarak SDA ve kanlı agar kültür besiyerleri 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Direkt preparatların incelenmesinde 400x büyütme ışık mikroskobu kullanılmıştır. Kültürlerin değerlendirilmesinde SDA besiyerinde opak-krem rengi görünümünde ve belirgin maya kokusu olan kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama ile incelenmiş maya hücreleri görüldüğünde matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile tür ve cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Almanya) cihazında çalışılmış ve spektrumlar MALDI-TOF MS Biotyper 3.0 software (Bruker Daltonics Bremen, Almanya) ile değerlendirilmiştir. Tür düzeyinde tanımlamaya ek olarak *Candida* kolonileri mısır unlu - tween 80 agara (Himedia, Hindistan) ekilmiş ve mikroskopik görünümleri incelenmiştir.

Çalışmaya katılan hastalardan bir kez vajinal sürüntü örneği alınmıştır.

Klinisyen tarafından vajinal kültüründe *Candida* üremesi olan hastalar Dünya Sağlık Örgütü'nün genital sistem enfeksiyonlarında belirlediği tanı kriter indeksleri kullanılarak incelenmiş ve klinik belirtileri VVK ile uyumlu olan ve VVK'da sıkça görülen belirtilerin en az beş tanesini (süt kesici benzeri vajinal kokulu akıntı, kokulu vajinal akıntı, disparoni, idrar yaparken yanma hissi) taşıyan hastalar VVK tanısını almıştır^(8,9). Kliniği uyumsuz olanlar ise kolonizasyon kabul edilmiştir. Etken grubunda 112 VVK'lı hasta yer alırken, kolonizasyon grubunda 133 asemptomatik kadın yer almıştır. Etken ve kolonizasyon grubundan izole edilen toplam 245 *Candida* izolatu proteinaz, fosfolipaz, esteraz enzim aktiviteleri, biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık profilleri açısından incelenmiştir. Kalite kontrol izolatu olarak proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivite tayinlerinde, *C. albicans* ATCC 10231 izolatu, biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık için için *C. albicans* ATCC 90028 izolatu kullanılmıştır⁽¹⁰⁻¹³⁾. Çalışma için gerekli etik kurul onayı alınmıştır (E. Kurul-E- 16-1005). Elde edilen veriler SPSS istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Virülans faktörü üretim ve biyofilm oluşturma kapasiteleri arasındaki farklılıklar enfeksiyon ve kolonizasyon grupları arasında Pearson'ın ki-kare testi ile, *C. albicans* ve *albicans*-dışı *Candida* grupları arasında Fisher'in exact testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Proteinaz aktivitesi saptanması: Proteinaz aktivitesine bağlı protein hidrolizi, %1 lik siğir serum albumin (BSA) ilave edilen ve pH=5 olan besiyerinde incelenmiştir⁽¹⁰⁾. Kalite kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır⁽¹⁰⁾. Kullanılan tüm toz maddeler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından alınmıştır. Besiyeri hazırlamak için; dekstroz (%2), KH_2PO_4 (%0.1), $MgSO_4$ (%0.05) ve agar (%2) karışımı pH=5'e ayarlanmış, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 50°C'ye kadar soğutulmuş, bovine serum albümin (%1) ilave edilmiş ve hemen 90 mm'lik petri kutularına dağıtılmıştır. Maya özütü peptonlu dekstroz (YEPD) buyyon hazırlamak için ise; 50 gram maya özütü peptonlu dekstroz 1000 ml distile suda çözülmüştür. Çözelti cam deney tüplerine eşit hacimde dağıtılmış, ağzları

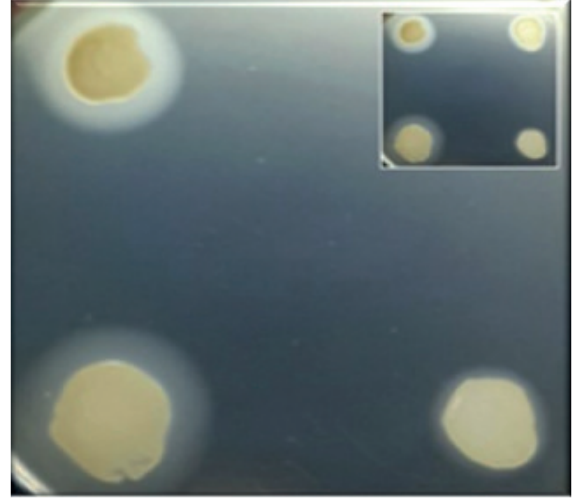
pamuklanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. SDA'da 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası üreyen maya kolonilerinden alınıp, YEPD buyyona pasaj yapılmış ve 30°C de 4-6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından McFarland 0.5 bulanıklık ayarı yapılarak, %1'lik siğir serum albumin içeren, pH 5 olan, katı besiyeri üzerine yerleştirilmiş 6 mm çapındaki kağıt steril disklere damlatılmıştır. Petriler 30°C'de 6 gün boyunca inkübe edilmiş ve liziz zonu oluşumu incelenmiştir. Altıncı gün plaklar metanol (45 ml), asetik asit (10 ml), distile su (45 ml) ve amido black içeren protein boyama çözeltisi ile boyanmış ve amido black katılmamış aynı çözelti karışımı ile yıkanmıştır. Besiyerinde oluşan liziz zonları değerlendirilmiş, zonların genişliği ile proteinaz aktivitesinin derecesini belirlenmiştir. Örnekler negatif (disk çevresinde liziz zonu yok), 1 pozitif (disk çevresinde disk kenarından 1-2 mm açıklıkta liziz zonu var), 2 pozitif (disk çevresinde disk kenarından 3-5 mm açıklıkta liziz zonu var) olarak gruplandırılmıştır⁽¹⁰⁾.



Şekil 1. *Candida* türlerinin özel besiyerinde boya öncesi ve sonrası proteinaz (+) ve proteinaz (-) görüntüleri

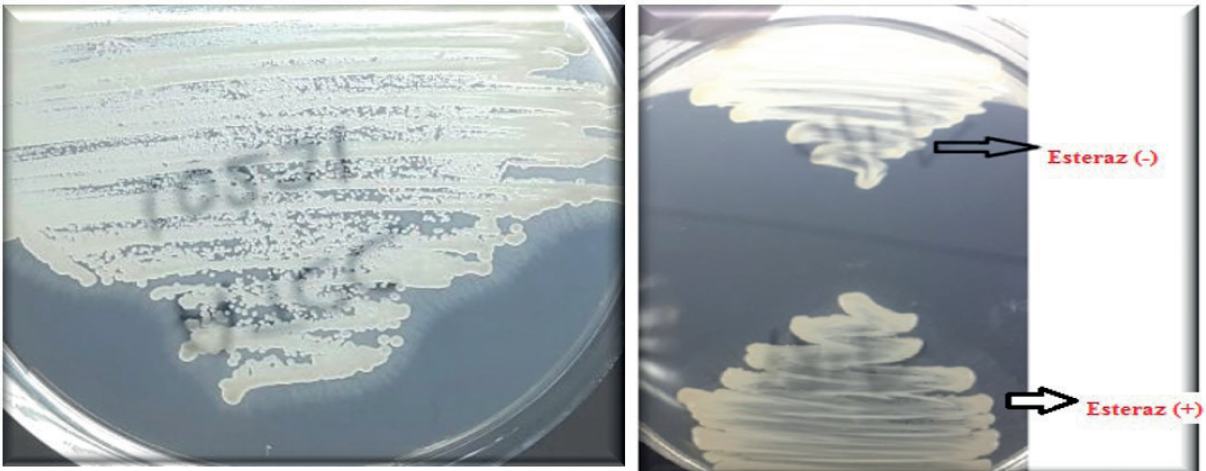
Fosfolipaz aktivitesi saptanması: Fosfolipaz aktivite tayini yumurta sarılı agar (YSA) yöntemi ve kalite kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır⁽¹⁰⁾. Kullanılan tüm toz maddeler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından alınmıştır. Enzim aktivitesi "Egg Yolk Agar" besiyerinde modifiye Price yöntemi ile saptanmıştır. EYA besiyerini hazırlamak için; 13.0 gr SDA, 11.7 gr NaCl ve 0.111 gr $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 184 ml distile su içinde çözülmüştür.

Çözelti otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilerek 50°C'lik su banyosuna konulmuştur. Yumurta sarısı hazırlarken; yumurtalar %70 lik alkolde 1 saat bekletilmiş ve ardından sulandırılmış çamaşır suyuna batırılmış bir dk bekletildikten sonra steril gazlı bezle kurulanmıştır. Yumurtalar hemen ardından steril koşullarda kırılmış ve sarısı steril bir şekilde ayrılmıştır. 80 gr yumurta sarısı ağzı kapalı bir tüp içine alınarak 37°C'de bir saat inkübe edilmiş ve süre sonunda yumurta sarısı içeren tüp 2500 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant steril bir kaba aktarılmıştır. Besiyeri 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra yumurta sarısı son konsantrasyon 80 gr/lt olacak şekilde besiyerine yavaş yavaş eklenmiştir. Sitrik asit-disodyum fosfat tamponu kullanılarak besiyeri pH=4.3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 90 mm'lik petri kutularına dağıtılmıştır. Test edilecek maya izolatı SDA besiyerine ekim yapılmış ve 35-37°C'de, 18-24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Üreyen kültürden serum fizyolojik solüsyonu içinde 0.5 McFarland standart solüsyonuna eşdeğer bulanıklıkta süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan EYA besiyerine 0.01 mL ekim yapılarak 37°C'de dört gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, koloni çapı ve toplam çap (koloni çapı ile koloni etrafındaki presipitasyon zonu) ölçülmüştür. İzolatın fosfolipaz aktivitesi, koloni çapının toplam çapa oranı (Pz değeri) olarak değerlendirilmiştir. Pz değerine göre örnekler; negatif (>1), 1 pozitif (0.9-1.0), 2 pozitif (0.89-0.80), 3 pozitif (0.79-0.70), 4 pozitif ($\leq 0,69$) olacak şekilde gruplandırılmıştır⁽¹⁰⁾.



Şekil 2. *Candida* türlerinin özel besiyerinde fosfolipaz (+) ve fosfolipaz (-) görüntüsü

Esteraz aktivitesi saptanması: Esteraz aktivitesinin belirlenmesi için tween 80 katkılı agar yöntemi ve kalite kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 10231 suşu kullanılmıştır⁽¹¹⁾. Kullanılan tüm toz maddeler Sigma-Aldrich ve Merck firmasından alınmıştır. Bu yöntemde 10 g pepton, 5 g NaCl, 0.1 g CaCl₂, 15 g agar ve 1000 ml distile su ile hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonunda pH 6.8'e ayarlanmış ve 50°C'ye kadar soğutulan besiyeri içerisine 5 ml steril tween 80 eklenmiştir. SDA'da üreyen 24 saatlik *Candida* izolatları öze ile alınmış ve hazırlanan besiyerine bir cm çaplı daireler çizilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 30°C'de 13 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Tween 80 içeren agar besiyerinde göz ile yapılan değerlendirmede,



Şekil 3. *Candida* türlerinin özel besiyerinde esteraz (+) ve esteraz (-) görüntüsü

ekim yapılan bölgenin etrafında ışığı geçiren halelerin varlığı esteraz pozitif olarak kabul edilmiştir. İnkübasyon süresi içinde ekim sahası etrafında tween 80 hidrolizi ile açığa çıkan yağ asidinin kalsiyum ile birleşerek opak kristaller halinde çökmesi; pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir⁽¹¹⁾.

Biyofilm oluşumu: Slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar (KKBKIA) besiyerinde incelenmiştir⁽¹²⁾. Kalite kontrol suşu olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu kullanılmıştır⁽¹²⁾. Kullanılan tüm toz maddeler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından alınmıştır. KKBKIA besiyerini hazırlamak için; 37 gr beyin kalp infüzyon broth, 80 gr glukoz, 0.8 gr kongo kırmızısı ve 10 gr agar karıştırılmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve 90 mm'lik petrilere 15-20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. SDA'da üreyen 24 saatlik *Candida* suşlarından, hazırlanan besiyerlerine öze ile ekim yapılmıştır. Besiyerleri 35°C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve KKBKIA'da slime varlığı "kongo red fenomenine" göre değerlendirilmiştir⁽¹²⁾. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde renk oluşturan koloniler, slime varlığı açısından değerlendirilmiştir. Oluşan renge göre ve renk şiddetine göre negatif (beyaz renk), 1 pozitif (Pembe renk), 2 pozitif (Kırmızı renk), 3 pozitif (Koyu kırmızı renk) olarak, slime varlığı saptanmıştır.



Şekil 4. *Candida* türlerinin özel besiyerinde biyofilm oluşumu görüntüleri

Antifungal duyarlılık testleri: Antifungal duyarlılık testinde, gradient test (Bioanalise, Türkiye) yöntemi kullanılmıştır ve enfeksiyon ve kolonizasyon

grubundan randomize olarak 38 *C. albicans*, 40 *Candida glabrata* kompleks, 14 *Candida kefir* ve 8 *Candida krusei* izolatına çalışılmıştır. Amfoterisin B (test aralığı: 0.002-32 µg/ml), anidulafungin (test aralığı: 0.002-32 µg/ml), flukonazol (test aralığı: 0.016-256 µg/ml), vorikonazol (test aralığı: 0.002-32 µg/ml), itrakonazol (test aralığı: 0.002-32 µg/ml), ketokonazol (test aralığı: 0.002-32 µg/ml) duyarlılığına, %2 glukoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi içeren Mueller Hinton agar plaklarında bakılmıştır⁽¹³⁾. Tüm plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Anidulafungin için 24 saat sonra diğer antifungallar için 48 saat sonra okunarak Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlenmiştir⁽¹⁴⁾.

Antifungal duyarlılık sonuçları, Clinical and Laboratory Standarts Institute (M27-A3) ve CLSI M27-S4 kriterleri, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Epidemiyolojik cutoff değerleri (ECOFFs) ve E-Test ile bu referans kriterlerinin karşılaştırıldığı literatürler kullanılarak değerlendirilmiştir⁽¹⁴⁻¹⁹⁾. Gradient test ile *C. albicans* ve *C. glabrata* kompleks'de flukonazol duyarlılık profili belirlemek için, inkübasyon sonrasında E test şeridinde %80 üreme inhibisyonu sağlayan en küçük değer MİK (µg/mL) değeri olarak alınmıştır. Flukonazol MİK değerleri CLSI M27-S4 sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir^(18,19). *C. albicans*, için MİK değeri ≤ 2 µg/mL duyarlı, 4 µg/mL doza bağlı duyarlı ve ≥ 8 µg/mL olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. *C. glabrata* kompleks suşları için MİK değeri ≤ 32 µg/mL olan suşlar doz bağımlı duyarlı ve ≥ 64 µg/mL olan suşlar dirençli olarak yorumlanmıştır⁽¹⁸⁾. *C. kefir* suşlarının flukonazol ve anidulafungin duyarlılığı için epidemiyolojik cutoff değerleri kullanılmıştır⁽²⁰⁾. Flukonazol için, ≤1 µg/mL olan suşlar WT olarak >1 µg/mL olan suşlar Non-WT olarak, anidulafungin için ≤0.025 µg/mL olan suşlar WT olarak >0.025 µg/mL olan suşlar Non-WT olarak kabul edilmiştir⁽²⁰⁾. Amfoterisin B'nin gradient test ile duyarlılık profili belirlemek için, epidemiyolojik cutoff değerleri kullanılmıştır⁽²⁰⁾. *Candida* izolatlarında MİK değeri ≤2 µg/mL olan suşlar WT olarak >2 µg/mL olan suşlar Non-WT olarak kabul edilmiştir⁽²⁰⁾. *C. glabrata* kompleks ve *C. krusei* suşlarının itrakonazol duyarlılık profili, *C. glabrata* kompleks, *C. kefir* suşlarının vorikonazol duyarlılık profili ve *C. kefir* suşlarının flukonazol ve anidulafungin duyarlılığı için

epidemiolojik cutoff değerleri kullanılmıştır⁽²⁰⁾. *C. glabrata* kompleks suşlarının itrakonazol duyarlılıkları değerlendirilirken MİK değeri ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar Non-WT olarak, *C. krusei* suşları için ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olanlar Non-WT olarak kabul edilmiştir. *C. glabrata* kompleks suşlarının vorikonazol duyarlılıkları için ≤ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Non-WT olarak, *C. kefyr* suşları için ≤ 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Non-WT olarak kabul edilmiştir. *C. kefyr* suşlarının flukonazol duyarlılığı için ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Non-WT olarak, anidulafungin duyarlılığı için ≤ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan suşlar WT olarak > 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Non-WT olarak kabul edilmiştir.

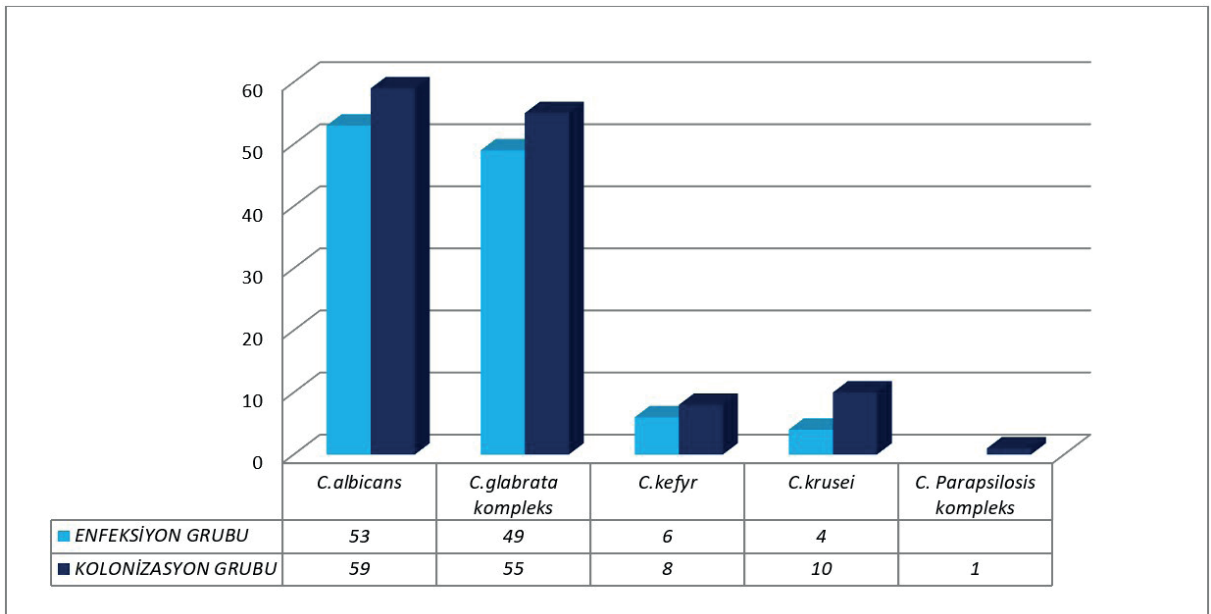
BULGULAR

Çalışmada, Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden Aralık 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında gönderilen 1000 vajinal sürüntü örneğinden 245 *Candida* suşu (%24.5) izole edilmiştir. Şekil 5'te enfeksiyon grubunda ve kolonizasyon grubunda *Candida* türlerinin dağılımı yer almaktadır.

Çalışmamızda, enfeksiyon grubunda *C. albicans* izolatlarının proteinaz pozitiflik oranı %20,

kolonizasyon grubunda ise %42 ve fosfolipaz pozitiflik oranı her iki grupta da %100 olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz pozitifliği açısından çalışmaya dahil edilen tüm *Candida* izolatları incelenmiş ve enfeksiyon ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (sırasıyla $p=0.535$, $p=0.104$). Esteraz aktivitesi enfeksiyon grubunda %31.25 pozitif bulunurken, kolonizasyon grubunda %21.8 pozitif olarak belirlenmiştir. İki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.094$). Biyofilm üretimi açısından gruplar incelendiğinde etken grupta %22.3 negatif, %24.1 (1+), %13.4 (2+) ve %40.2 (3+) gözlenmiştir. Kolonizasyon grubunda bu değerler %34.6 negatif, %13.5 (1+), %14.3 (2+) ve %37.6 (3+) olarak belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu açısından enfeksiyon ve kolonizasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.072$).

İki grup toplamında tür düzeyinde inceleme yapıldığında ise en yüksek fosfolipaz aktivitesi *C. albicans* izolatlarında, en yüksek salgısal asit proteinaz pozitifliği *albicans*-dışı *Candida* türlerinde görülmüştür. *C. glabrata* kompleks izolatları, *albicans*-dışı *Candida* izolatları arasında en güçlü proteinaz pozitiflik oranı olan tür olarak belirlenmiştir. Esteraz pozitiflik oranının, *C. albicans*'larda ve biyofilm oluşturma oranının *albicans*-dışı *Candida* türlerinde



Şekil 5. Enfeksiyon grubunda ve kolonizasyon grubunda *Candida* türlerinin Dağılımı

daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Esteraz, fosfolipaz ve proteinaz pozitifliği ve biyofilm oluşumu açısından *C. albicans* ve *albicans*-dışı *Candida* grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.001$). *Candida* türlerinin virülans faktörlerinin ve biyofilm oluşumunun dağılımı Tablo 1’de, görülmektedir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda; çalışmamızda antifungal ilaç direncine rastlanmamıştır. Her iki çalışma grubunun antifungal duyarlılık profili benzer bulunmuştur. Enfeksiyon ve kolonizasyon grubunda yer alan *Candida* izolatlarının E-test yöntemi ile belirlenen antifungal duyarlılık profilleri Tablo 2 ve Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 1. Enfeksiyon grubunda ve kolonizasyon grubunda virülans faktörlerinin ve biyofilm oluşumunun dağılımı

		ENFEKSİYON GRUBU (n=112)				KOLONİZASYON GRUBU (n=133)				
		<i>C.albicans</i> (n=53)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=49)	<i>C.kefyr</i> (n=6)	<i>C.krusei</i> (n=4)	<i>C.albican</i> (n=59)	<i>C. glabrata</i> kompleks (n=55)	<i>C.kefyr</i> (n=8)	<i>C.krusei</i> (n=10)	<i>C.parapsilosis</i> kompleks (n=1)
Proteinaz aktivitesi ($p=0.535$)	Negatif	42	21	3	0	34	28	5	1	1
	1 Pozitif	5	12	1	0	9	14	1	-	-
	2 Pozitif	6	16	2	4	16	13	2	9	-
Fosfolipaz aktivitesi ($p=0.104$)	Negatif	-	6	-	-	-	10	1	-	-
	1 Pozitif	4	18	-	-	2	14	-	-	-
	2 Pozitif	8	10	2	-	10	11	2	-	1
	3 Pozitif	17	13	2	1	12	9	5	2	-
Esteraz Üretimi ($p=0.094$)	4 Pozitif	24	2	2	3	35	11	-	8	-
	Negatif	23	44	6	4	31	54	8	10	1
Biyofilm aktivitesi ($p=0.072$)	Pozitif	30	5	-	-	28	1	-	-	-
	Negatif	24	1	-	-	36	1	3	6	-
	1 Pozitif	24	1	2	-	14	1	2	1	-
	2 Pozitif	1	9	3	2	3	16	-	-	-
	3 Pozitif	4	38	1	2	6	37	3	3	1

Tablo 2. Enfeksiyon grubundan izole edilen *Candida* spp izolatlarının E-Test şeritleri ile belirlenen antifungal duyarlılık profilleri

Antifungal ilaç	Enfeksiyon Grubu																				
	<i>C.albicans</i> (n=20)					<i>C.glabrata</i> kompleks (n=20)					<i>C.krusei</i> (n=4)					<i>C.kefyr</i> (n=6)					
	S	DBD	R	WT	Non-WT	S	DBD	R	WT	Non-WT	S	DBD	R	WT	Non WT	S	DBD	R	WT	Non-WT	
FL	20					20														6	
VO	20								17	3	4									1	5
KE	20					20					4					6					
İT	11	9							20					4							
AND	20					20					4									6	
AP					20				20				4								

FL: Flukonazol, VO: Vorikonazol, KE: Ketokonazol, İT: İtrakonazol, AND: Anidulofungin, AP: Amfoterisin B

Tablo 3. Kolonizasyon grubundan izole edilen *Candida* spp izolatlarının E-Test şeritleri ile belirlenen antifungal duyarlılık profilleri

Antifungal ilaç	Kolonizasyon Grubu																			
	<i>C. albicans</i> (n=18)					<i>C. glabrata</i> kompleks (n=20)					<i>C. krusei</i> (n=4)					<i>C. kefyr</i> (n=8)				
	S	DBD	R	WT	Non-WT	S	DBD	R	WT	Non-WT	S	DBD	R	WT	Non-WT	S	DBD	R	WT	Non-WT
FL	18					20														8
VO	18								13	7	4									8
KE	15	3				20					4									
İT	8	10							20					4						
AND	18					20					4									8
AP				18					20					4						

FL: Flukonazol, VO: Vorikonazol, KE: Ketokonazol, İT: İtrakonazol, AND: Anidulofungin, AP: Amfoterisin B

TARTIŞMA

Candida enfeksiyonlarının patojenezini açıklayabilmek için yapılan araştırmalar, konak immünitesi ve *Candida* virulans faktörleri etrafında yoğunlaşmaktadır. Bu faktörler arasında en çok araştırılanlar, salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz enzim aktivitesi ve biyofilm oluşumudur^(2,5,6,7,10,21). Özellikle proteinaz ve fosfolipaz enzimlerinin *C. albicans*'ın virülansında önemli rol oynadığı bildirilmiştir⁽²²⁾.

Arslan ve ark.⁽²³⁾ çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* izolatlarının %64'ünde proteinaz pozitifliği, %75'inde fosfolipaz pozitifliği belirlemiş ve en fazla proteinaz ve fosfolipaz pozitifliğini vajinal akıntı örneklerinde saptamışlardır. Kantarcioğlu ve Yücel'in⁽²⁴⁾ çalışmasında 60 *C. albicans* izolatının %95'inde, Öksüz ve ark.'larının⁽²⁵⁾ çalışmasında ise 81 *C. albicans* izolatının %56.7'sinde proteinaz pozitifliği rapor edilmiştir. Röriğ ve ark.⁽²⁶⁾ çalışmasında, fosfolipaz ve proteinaz pozitifliği en yüksek oranda *C. albicans*'da rapor edilmiştir. Fule ve ark.⁽²⁷⁾ çalışmasında ise *C. albicans* izolatlarında %81.1 oranında fosfolipaz pozitifliği belirlenmiştir. Bu izolatların %56,66'sında yüksek pozitiflik gözlemlendiği, *albicans*-dışı *Candida* izolatlarında ise fosfolipaz pozitifliği belirlenmediği rapor etmişlerdir. Udayalaxmi ve ark.⁽²⁸⁾ ile Samaranayake ve ark.'nın⁽²⁹⁾ çalışmalarında da *C. albicans*'ın *albicans*- dışı *Candida* türlerinden daha fazla oranda fosfolipaz ürettiği gösterilmiştir. Kalaiarasan ve ark.'nın⁽³⁰⁾ çalışmasında VVK hastalarından izole edilen 51 *candida*

suşu virülans faktörleri açısından araştırılmıştır. Proteinaz ve esteraz aktivitesi 19 *Candida* izolatında belirlenmiştir. *C. albicans* izolatlarının tamamında fosfolipaz aktivitesi gözlenmiştir. Sekiz *C. glabrata* kompleks suşundan beşinin güçlü proteinaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Esteraz enzim aktivitesi, *Candida* izolatlarının invazyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır⁽³¹⁾. Çalışmamızla uyumlu olarak; Aktaş ve ark.'nın⁽³²⁾ çalışmasında, çeşitli klinik örneklerden 125 *Candida* suşu izole edilmiş ve esteraz aktivitesi açısından incelenmiştir. Esteraz aktiviteyi 59 *C. albicans* suşunun sadece birinde negatif bulunurken geri kalan tüm *C. albicans* suşlarında pozitif sonuç gözlenmiştir. Yücesoy ve ark.'nın⁽³³⁾ çalışmasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen, *C. albicans* izolatlarının 63 ünde (%95), *C. tropicalis* izolatlarının 23'ünde (%93), *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının'(%57)'sinde ve *C. glabrata* kompleks izolatlarının 1'inde (%10), esteraz aktivitesi belirlenmiştir. Kalaiarasan ve ark.'nın⁽³⁰⁾ çalışmasında esteraz aktivitesi *C. glabrata* kompleks suşlarının %30'unda ve *C. krusei* suşlarının %20'sinde pozitif bulunmuştur. *Candida* türlerinde esteraz enzim aktivitesinin farklı oranlarda bulunabileceği, bu enzimin özellikle *Candida albicans* ile gelişen VVK patogenezinde rol alabileceğini düşünülmüştür.

Candida enfeksiyonlarının epidemiyolojisine paralel olarak *Candida* izolatlarının biyofilm oluşumu da araştırılmaktadır⁽²³⁾. Kalaiarasan ve ark.'nın⁽³⁰⁾

çalışmasında *Candida krusei* suşlarının tamamı biyofilm üretebilmiştir. Cevahir ve ark.'nın⁽³⁴⁾ çalışmasında *C. albicans* izolatlarında biyofilm pozitifliği %36.1, *albicans*-dışı *Candida* izolatlarında %60.4 oranında saptanmıştır. Vinitha ve ark.'nın⁽³⁵⁾ çalışmasında *C. albicans* izolatlarının %51'i biyofilm oluştururken, *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının %90.3'sinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Çalışmamızda bu literatürleri destekleyen sonuçlar raporlanmıştır. Bununla birlikte, çalışmamızın aksine Gültekin ve ark.'nın⁽³⁶⁾ çalışmasında, çoğunluğu vajinal sürüntü örneği olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilen 83 *C. glabrata* kompleks izolatının sadece ikisinde (%2.4) biyofilm oluşumu (kandan ve vajinal örnekten izole edilen izolatlar) saptanmıştır.

Genel olarak yapılan çalışmaların sonuçları göstermiştir ki; *C. albicans* ve *albicans*-dışı *Candida* izolatları hidrolitik enzimleri değişen miktarlarda üretebilmektedir ve uygun koşullar altında enfeksiyona neden olabilmektedirler.

Candida enfeksiyonlarının doğru ve etkin tedavisinde antifungal ilaç direnci önemli bir ölçüttür. Pfaller ve ark.'nın⁽³⁷⁾ global antifungal surveyans çalışmalarında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* izolatlarında yapılan incelemede; tüm coğrafi bölgelerde *C. albicans* izolatlarında hem flukonazol hem de vorikonazol direnci saptanmıştır. Richter ve ark.'nın⁽³⁸⁾ VVK hastalarından, alınan vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarında flukonazol direncini sadece *C. glabrata* kompleks (%15.2) ve *C. krusei* (%41.7) izolatında gözlemişler, *C. albicans* izolatlarında flukonazol direncine rastlanmamışlardır. Shi ve ark.'nın⁽³⁹⁾ çalışmasında vajinal kandidozlu hastalardan izole edilen 1844 *Candida* izolatında antifungal duyarlılık çalışılmıştır. *C. albicans* suşlarının çoğu azollere, polienlere ve ekinokandinlere duyarlı bulunmuştur. *C. glabrata* kompleks izolatlarının azollere karşı gösterdiği MIC değerlerinin *C. albicans*'lardan yüksek olduğu gözlenmiştir. *C. albicans* izolatlarının %7.7'sinde flukonazol, %10.2'sinde itrakonazol ve %6.2'sinde vorikonazol direnci rapor edilmiştir. *C. glabrata* kompleks %3.4'ü flukonazol, 29.1'i itrakonazol dirençli bulunmuştur⁽³⁹⁾. Çalışmamızda enfeksiyon ve kolonizasyon gruplarında çalışmaya dahil

ettiğimiz antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimine rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; *C. albicans* ve *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının virülans faktörü kabul edilen hidrolitik enzimleri farklı oranlarda ürettiği ve yine farklı oranlarda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Virülans faktörleri açısından enfeksiyon ve kolonizasyon grupları arasında önemli bir fark saptanmamıştır. Bu durum *Candida* enfeksiyonlarında, virülans faktörlerinin yanı sıra, enfeksiyon gelişimine olanak sağlayan risk faktörlerinin varlığı ve konak savunma mekanizmalarının da önemli rol oynadıklarını düşündürmüştür. Her iki grubun antifungal duyarlılık profili benzer bulunmuştur. Antifungal ilaç direncine rastlanmamıştır. Virülans faktörlerinin belirlenmesi *Candida* enfeksiyonlarının patogenezinin açıklanmasına ve antifungal duyarlılık profilinin belirlenmesi de uygun tedavilerin seçilmesine yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Çalışmanın ilk aşamasında bize yardımcı olan Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Asistan doktorlarından Dr. Bünyamin Uğur Ilgın ve Dr. Gizem Özcanlı'ya yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (07.09.2016 tarih ve 1005 karar numarası) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Ankara Numune Training and Research Hospital, Clinical Research Ethics Committee (09.07.2016; 1005).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, et al. A prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis.* 2009;199(12):1883-90. <https://doi.org/10.1086/599213>
2. Achkar JM, Fries BC. *Candida* Infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):253-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>
3. Hong E, Dixit S, Fidel PL, Bradford J, Fisher G. Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition. *J Low Genit Tract Dis.* 2014;18(1):31-8. <https://doi.org/10.1097/igt.0b013e318287aced>
4. Suárez P, Belloz A, Puellos M, Youngz G, Duranz M, Arechavala A. Vaginal colonization and vulvovaginitis by *Candida* species in pregnant women from Northern of Colombia. *Archivos de Medicina (Col).* 2018;18(1):50-63. <https://doi.org/10.30554/archmed.18.1.2010.2018>
5. Al-Ahmadey ZZ, Mohamed SA. Vulvovaginal candidiasis; Agent and its virulence factors. *Microbiol Res Int.* 2014;2(3):28-37.
6. Deorukhkar SC, Saini S. Non-albicans *Candida* species: Its isolation pattern, species distribution, virulence factors and antifungal susceptibility profile. *Int J Med Sci Public Health.* 2013;2(3):533-8. <https://doi.org/10.5455/ijmsph.2013.080320131>
7. Pekintürk N, Değerli K, Özkütük N, Ecemiş T, Kurutepe S, Özbakkaloğlu B. *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, esteraz ve slime aktivitelerinin enfeksiyon-kolonizasyon ayırımındaki rolleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2012;32(1):171-6. <https://doi.org/10.5336/medsci.2011-23496>
8. World Health Organization (WHO). Flow charts on the management of sexually transmitted diseases. WHO Regional, Office for South East Asia: New Delhi; 2000. [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/205098>] (Erişim Tarihi: 12.10.2016).
9. World Health Organization (WHO). Sexually transmitted and other reproductive tract infections; a guide to essential practice. WHO, Reproductive Health and Research. Geneva: Switzerland; 2005. [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43116>] (Erişim Tarihi: 12.10.2016).
10. Kalaiselvi G. Role of phospholipase and proteinase as virulence factors of *Candida albicans* isolated from clinical samples of inpatients in a tertiary care hospital. *IJSRR.* 2014;3(2):167-76.
11. Yücesoy M, Karaman M. Oral kandidozlu ve sağlıklı bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz ve esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi. *Infeksi Derg.* 2003;17(4):483-6.
12. Saxena N, Maheshwari D, Dadhich D, Singh S. Evaluation of congo red agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates. *J Eval Med Dent Sci.* 2014;3 (59):13234-8. <https://doi.org/10.14260/jemds/2014/3761>
13. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the E-test method using Mueller-Hinton Agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4977-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4977-4979.2004>
14. Dannaoui E, Espinel-Ingroff A. Antifungal susceptibility testing by concentration gradient strip Etest method for fungal isolates: A review. *J Fungi* 2019;5:108-36. <https://doi.org/10.3390/jof5040108>
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard-3rd ed document M27-A3. CLSI, Wayne; 2008.
16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Clinical Breakpoints-fungi (v7.0). [www.eucast.org/clinical_breakpoints/] (Erişim Tarihi 01.11.2016).
17. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: Technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis.* 1997;24(5):776-84. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.5.776>
18. Coşkun MV, Ağan i, Uyanık MH, Hancı H, Özden K. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin flukonazol E test duyarlılıklarının CLSI referans mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılması. *Marmara Pharm J.* 2017;21(2):400-6. <https://doi.org/10.12991/marupj.301167>
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. M27-S4, CLSI, Wayne; 2017.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2846-56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00937-12>
21. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2002;32(3-4):235-8.

22. Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoğlu E. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, proteinaz ve hemolitik aktiviteleri. Mikrobiyol Bul. 2010;44(1):71-7.
23. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. Infeksi Derg. 2003;17(4):471-81.
24. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolate with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002;45(5-6):160-5. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x>
25. Öksüz S, Sahin İ, Yıldırım M, et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis. 2007;60(5):280-3.
26. Röriğ KCO, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop 2009;42(2):225-7. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000200029>
27. Fule SR, Das D, Fule RP. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non-albicans isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in a rural area. Indian J Med Microbiol. 2015;33(1):92-5. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.148392>
28. Udayalaxmi, Jacob S, D'Souza D. Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-albicans species of *Candida* isolated from genitourinary tract. J Clin Diagn Res. 2014;8(11):15-7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10121.5137>
29. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JAM, et al. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. J Med Microbiol. 2005;54(6):583-93. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45762-0>
30. Kalaiarasan K, Singh R, Chaturvedula L. Changing virulence factors among vaginal non-albicans *Candida* species. Indian J Med Microbiol. 2018;36(3):364-8. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_94
31. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. Infect Immun. 1996;64(8):2936-40. <https://doi.org/10.1128/iai.64.8.2936-2940.1996>
32. Aktaş E, Yiğit N, Ayyıldız A. Esterase activity in various *Candida* species. J Int Med Res. 2002;30(3):322-4. <https://doi.org/10.1177/147323000203000315>
33. Yücesoy M, Marol S. *Candida* türlerinin esteraz aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2003;37(1):59-63.
34. Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ. *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. Infeksi Derg 2003;17(1):67-70.
35. Vinitha M, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: Study on hospitalized patients in Southern India. J Glob Infect Dis. 2011;3(1):4-8. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77288>
36. Gültekin B, Tiryaki Y, Aydın N. Klinik örneklerden izole edilen *Candida glabrata* suşlarında salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz aktivitelerinin ve biyofilm oluşumunun araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2013;43(1):17-21. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2013.017>
37. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1366-77. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-09>
38. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Phaller MA. Antifungal susceptibility of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2155-62. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2155-2162.2005>
39. Shi Y, Zhu Y, Fan S, Liu X, Liang Y, Shan Y. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of yeast from vulvovaginal candidiasis. BMC Infect Dis. 2020;20(1):287. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-04985-w>