



Sistemik Kandidoz Etkeni *Candida parapsilosis* İzolatlarında Azol Direncinin Ortaya Çıkışı

The Emergence of Azole Resistance in *Candida parapsilosis* Isolates Causing Systemic Candidosis

Sema Nur ALTINTAŞ¹ [ID], Canset Nur AYDOĞAN² [ID], İsmail Selçuk AYGAR³ [ID]

¹Sağlık 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].

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

³Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 11.04.2021. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 20.05.2021.

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 [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]

Özet

Bu çalışmada 10 yıl önce izole edilen *C. parapsilosis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşları ile günümüz izolatlarındaki antifungal duyarlılık değişimini karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmaya 10 yıldan daha uzun süre önce izole edilmiş 17 stok *Candida* izolatı ve 47 yeni izolat olmak üzere toplam 64 klinik *Candida* izolatı dahil edildi. Klinik izolatların dağılımı; *C. parapsilosis* 25, *C. albicans* 20, *C. tropicalis* 9, *C. glabrata* 6, *C. krusei* 3 ve *C. lusitanae* 1 izolat şeklinde idi. Çalışma izolatları flukonazol ve vorikonazol için ve ayrıca dirençli suşların tedavisinde önemli bir seçenek olan kaspofungin için disk difüzyon yöntemi ile test edildi. Sonuçlar CLSI M60 ve ayrıca CLSI M44-A2 kriterlerine göre değerlendirildi. Çalışma grubu 39 erkek, 21 kadın ve 4 çocuktan oluşurken, yaş ortalaması 55.4 (±21.2) idi. *C. parapsilosis* için uzun dönem stoklanmış izolatlarda flukonazol direnci saptanmazken, yeni izolatların %14.3'ünün (2/14) doza bağımlı duyarlı olduğu ve %35.7'sinin (5/14) flukonazole dirençli olduğu saptandı. *C. parapsilosis* için direnç oranındaki artış (0/11'den 5/14'e; p = 0.03768) ve antifungal duyarlılık zon çaplarının ortalamasındaki düşüş (30.1 mm'den 16.9 mm'ye; p<0.0001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde idi. *C. parapsilosis* için vorikonazol duyarlılık zon çaplarının ortalamasındaki düşüş (33.5 mm'den 21.4 mm'ye; p <0.0001) de anlamlı düzeyde idi. Yeni izolatlarda *C. albicans* ve *C. tropicalis* için de zon çapı ortalamaları düşüş gösterirken bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değildi. Kaspofungin zon çaplarında ise bu üç tür için bir düşüş izlenmedi. Sonuç olarak, *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatlarından farklı olarak *C. parapsilosis* için flukonazol duyarlılığında ve flukonazol ve vorikonazol duyarlılık zon çapı ortalamalarında anlamlı derecede düşüş olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Antifungal, Disk difüzyon, CLSI M60, İnvaziv kandidiyazis, MALDI-TOF MS.

Abstract

In this study, we aimed to compare the antifungal susceptibility of *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *C. tropicalis* strains isolated 10 years ago with present isolates. A total of 64 clinical *Candida* isolates were included in the study, including 17 stock *Candida* strains isolated more than 10 years ago and 47 present

isolates. Distribution of clinical isolates was as follow: 25 *C. parapsilosis*, 20 *C. albicans*, 9 *C. tropicalis*, 6 *C. glabrata*, 3 *C. krusei*, and 1 isolate *C. lusitaniae*. All isolates were tested for fluconazole and voriconazole by disk diffusion method, and were also tested for caspofungin, an important option in the treatment of resistant strains. The results were evaluated according to the CLSI M60 and CLSI M44-A2 criteria. The study group consisted of 4 children, 21 women, and 39 men, while the mean age was 55.4 (\pm 21.2). While no fluconazole resistance was found for the long-term stocked *C. parapsilosis* isolates, it was found that 14.3% (2/14) of the new isolates were dose-dependent susceptible and 35.7% (5/14) were fluconazole resistant. The increase in the resistance rate (from 0/11 to 5/14; $p = 0.03768$) for *C. parapsilosis* and the decrease in the mean of the antifungal sensitivity zone diameters (30.1 to 16.9; $p < .0001$) were statistically significant. The decrease in the mean of inhibition zone diameters of voriconazole for *C. parapsilosis* (33.5 to 21.4; $p < .0001$) was also significant. In the new isolates, the mean value of zone diameters was decreased also for *C. albicans* and *C. tropicalis*, but these decreases were not statistically significant. No decrease was observed in caspofungin zone diameters for all three species. In conclusion, differing from *C. albicans* and *C. tropicalis*, it was found that there was a significant decrease in fluconazole susceptibility and fluconazole and voriconazole mean susceptibility zone diameters for *C. parapsilosis* isolates.

Keywords: Antifungal, Disk diffusion, CLSI M60, Invasive candidiasis, MALDI-TOF MS.

Giriş

Kandidoz, günümüzde immün sistemi baskılanmış popülasyonda ve yoğun bakım hastalarında önde gelen fungal enfeksiyon türüdür [1]. Son ve kapsamlı epidemiyolojik araştırmalara göre *Candida* türleri tüm hastane kaynaklı invaziv fungal enfeksiyonların yaklaşık %75-88'inden sorumludur ve *albicans*-dışı *Candida* türlerinin görülme sıklığındaki artışa rağmen *Candida albicans* halen en sık karşılaşılan kandidemi etkeni olmak üzere *Candida* türleri nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları arasında beşinci sırada yer almaktadır [2,3]. *Candida* türleri ile ilişkili sistemik enfeksiyonlarda ölüm oranları tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişme ve ilerlemelere rağmen %40-50 aralığındadır ve özellikle HIV (*Human immunodeficiency virus*) ile enfekte kişiler, yoğun bakım ünitesi hastaları ve kanser kemoterapisi alan ya da organ nakli olan hastalar arasında önemli morbidite nedenlerinden biridir [2,4]. Sağlık ve tıp alanındaki yeni teknolojik ve bilimsel gelişmelerle beklenen yaşam süresinin uzaması ve kronik hastalıkların tedavi yönetimlerindeki ilerlemelerle birlikte *Candida* enfeksiyonları için risk altında olan kişilerin sayısı her geçen gün artarken, bu süreç yoğun bakım ünitesi hastalarında antifungal ilaçların kullanımının yaygınlaşması ile sonuçlanmıştır. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar sınırlı sayıda ve ilacın dozunu ve verilme sıklığını sınırlayan çeşitli yan etkiler yanında giderek artmakta olan antifungal ilaç direnci bu

enfeksiyonların yönetiminde önemli bir problem haline gelmiştir [1]. Direnç sorunu özellikle görülme sıklığı giderek artan *albicans*-dışı *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda karşımıza çıkmaktadır [3,5].

Antifungal ilaçların klinik etkinliğini öngörmeye referans duyarlılık testleri olarak kullanılan broth mikrodilüsyon ve disk difüzyon testleri için standartlar geliştirilmiş ve bu standartlar yıllar içerisinde güncellenmektedir. İlk dönemlerdeki testlerden farklı olarak günümüzde türe spesifik sınır değerleri tanımlanmış ve böylece ticari testler de dahil olmak üzere farklı yöntemler arasındaki uyumsuzluklar azaltılmaya çalışılmıştır. Ticari yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmakla beraber disk difüzyon yöntemi uygun maliyetli ve halen yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma öncesinde T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (25 Eylül 2019 19/290) etik onay alındı. Çalışmaya 17 stok *Candida* izolatu (stok süresi 10 yılın üzerinde olan) ve 47 yeni *Candida* izolatu (stok süresi bir yıldan daha kısa olan veya çalışma sırasında prospektif olarak elde edilen) olmak üzere toplam 64 farklı izolat dahil edildi. Çalışma izolatlarının tümü yatan hasta örneklerinden (kan, solunum yolu örnekleri vb.) elde edilen klinik izolatlardan oluşmaktadır. Sonuçların standardizasyonu ve kontrolü için

çalışmaya üç ayrı ATCC (*American Type Culture Collection*) suşu dahil edildi; *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) ve *C. krusei* (ATCC 6258).

İzolatların tanımlanması ve duyarlılık testleri

Çalışmaya dahil edilen izolatların tamamı laboratuvarımızda kullanılan rutin laboratuvar tanı yöntemleri ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Tanımlamalar yeni izolatlar için rutin kültür besiyerlerindeki koloni görünümüleri, ışık mikroskopisinde maya hücrelerinin görülmesi, germ tüp testi ve Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) analizi ile yapıldı. Eski izolatlar ise geçmişte geleneksel (germ tüp testi, klamidospor oluşturma, API ID 32C : BioMerieux-Fransa, CHROMagar Candida: BBL-Fransa) ve moleküler yöntemler (PCR: *Polymerase Chain Reaction*, PCR-RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*) ile tür düzeyinde tanımlanmış olup, bu çalışmada önceki sonuçlar MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrulandı. *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılıkları CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) M60 standartlarına göre uygulanan disk difüzyon yöntemi ile belirlenerek değerlendirildi, sonuçlar ek olarak CLSI M44-A2 kriterlerine göre de değerlendirildi [6,7]. Antifungal duyarlılık testleri için flukonazol (25 µg), vorikonazol (1 µg), kaspofungin (5 µg) diskleri kullanıldı. Kullanıma hazır ticari diskler Bioanalyse (Ankara, Türkiye) tarafından tedarik edilmiştir.

İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen antifungal duyarlılık verilerinin farklı *Candida* türleri ve izolatların izole edildikleri dönem (yeni izolatlar ve 10 yıl önce stoklanan izolatlar) gibi parametreler için farklılık gösterip göstermediği temel istatistiksel yöntem ve hesaplamalar yapılarak değerlendirildi. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 16.0 (Statistical Package For Social Sciences 16.0 for Windows, SPSS Inc.) yazılım programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık ise $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. Ortalamalar arasında farkın anlamlılığı için t-test ve gruplar arası karşılaştırmalar için Pearson Chi-Square ve Fisher Exact Probability Test yöntemleri kullanıldı.

Bulgular

Çalışmada toplam 64 klinik *Candida* izolatu test edildi. Klinik izolatların dağılımı; 25 *C. parapsilosis* 20 *C. albicans* , dokuz *C. tropicalis*, altı *C. glabrata*, üç *C. krusei* , bir *C. lusitanae* izolatu şeklinde idi (Tablo 1-5). Çalışma grubu 39 erkek, 21 kadın ve dört çocuktan oluşurken, yaş ortalaması 55.4 (± 21.2) idi.

C. parapsilosis izolatlarının 11'i eski 14'ü yeni izolat idi. *C. parapsilosis* izole edilen 25 hastanın 24'ünü (%96) YBÜ (Yoğun Bakım Ünitesi) hastaları oluşturmakta idi. *C. parapsilosis* izole edilen hastaların yaş ortalaması ise 48.24 (± 25.5) idi. Eski *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol direnci saptanmazken (0/11), yeni izolatlarda dirençli suşların oranı CLSI M60'a göre %35.7 (5/14) ve M44-A2'ye göre %50.0 (7/14) olarak bulundu. Eski izolatlar ile karşılaştırıldığında, yeni *C. parapsilosis* izolatlarında hem CLSI M60'a göre hem de CLSI M44-A2'ye göre direnç oranlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış olduğu bulundu; sırasıyla $p = 0.03768$ ve $p = 0.00714$. Dirençli suşlar dışında, CLSI M60'a göre yeni *C. parapsilosis* izolatlarının ikisi flukonazole DBD (doza bağımlı duyarlı) ve diğer ikisi vorikonazole OD (orta duyarlı) iken, yeni izolatlardan biri flukonazol dışında vorikonazol ve kaspofungine de dirençli bulundu (Tablo 1). Kaspofungin dirençli bu tek izolat dışında çalışmada test edilen diğer tüm *Candida* izolatları hem CLSI M44-A2'ye göre hem de CLSI M60'a göre kaspofungine duyarlı olarak bulundu. *C. parapsilosis* izolatlarında CLSI M44-A2'ye göre doza bağımlı duyarlı olarak değerlendirilen üç izolat CLSI M60'a göre duyarlı kategorisine geçerken, dirençli kategorisinde bulunan iki izolat DBD kategorisine geçti ve toplam beş *C. parapsilosis* izolatuında kategori değişikliği izlendi (Tablo 5).

C. parapsilosis için eski ve yeni izolatlar karşılaştırıldığında ayrıca, duyarlılık zon çapı ortalamalarının yeni izolatlarda flukonazol için 30.1 mm'den 16.9 mm'ye ($p < 0.0001$) ve vorikonazol için 33.5 mm'den 21.4 mm'ye ($p < 0.0001$) düştüğü saptandı. Kaspofungin için duyarlılık zon çapı ortalamalarında eski ve yeni izolatlar arasında bir farklılık izlenmedi, sırasıyla 15.1 mm ve 15.4 mm ($p = 0.39858$).

Tablo 1. *C. parapsilosis* izolatları için numune ve hasta bilgileri ile antifungal duyarlılık zon çapları.

Tür	Grup	Numune	Cinsiyet	Yaş	Klinik-Birim	F (mm)	V (mm)	K (mm)
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	kadın	55	Genel cerrahi YBÜ	30	30	14
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek	21	Genel cerrahi YBÜ	30	34	15
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek bebek	2	Yanık merkezi YBÜ	30	35	17
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	kadın	53	Genel cerrahi YBÜ	30	33	15
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek	64	Genel cerrahi YBÜ	30	34	14
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek	62	Genel cerrahi YBÜ	32	34	17
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek çocuk	14	Çocuk hst. YBÜ	29	33	13
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	kadın	54	Genel cerrahi YBÜ	32	33	13
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek	73	Nöroloji YBÜ	30	30	14
<i>C. parapsilosis</i>	eski	kan	erkek	66	Beyin cerrahisi YBÜ	28	35	14
<i>C. parapsilosis</i>	eski	yara	erkek	51	Nefroloji kliniği	30	38	20
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	28	Genel cerrahi YBÜ	10	17	14
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	vasküler kateter	erkek	30	Genel cerrahi YBÜ	13	17	14
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	kız bebek	1	Yenidoğan YBÜ	30	40	13
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	BOS	kız çocuk	3	Çocuk hst. YBÜ	32	32	14
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	70	Anestezi YBÜ	18	22	20
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	vasküler kateter	erkek	74	Anestezi YBÜ	14	21	18
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	kadın	86	Anestezi YBÜ	14	20	15
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	37	Anestezi YBÜ	12	16	16
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	kadın	63	Anestezi YBÜ	0	0	9
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	kadın	82	Genel cerrahi YBÜ	28	34	14
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	kadın	76	Beyin cerrahisi YBÜ	12	16	16
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	40	Beyin cerrahisi YBÜ	17	24	19
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	42	Beyin cerrahisi YBÜ	17	23	16
<i>C. parapsilosis</i>	yeni	kan	erkek	59	Anestezi YBÜ	20	17	17

F: Flukonazol, V: Vorikonazol, K: Kaspofungin. YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

CLSI M60 kriterlerine göre *italik* değerler DBD (doza bağımlı duyarlı), **koyu** renk dirençli ve diğer değerler duyarlı.**Tablo 2.** *C. albicans* izolatları için numune ve hasta bilgileri ile antifungal duyarlılık zon çapları.

Tür	Grup	Numune	Cinsiyet	Yaş	Klinik-Birim	F (mm)*	V (mm)*	K (mm)*
<i>C. albicans</i>	eski	kan	kadın	54	Yanık merkezi YBÜ	38	38	21
<i>C. albicans</i>	eski	kan	kadın	48	Tıbbi onkoloji kliniği	38	38	19
<i>C. albicans</i>	eski	kan	erkek	71	Anestezi YBÜ	32	34	19
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	28	Gastroenteroloji kliniği	42	44	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	48	Kalp damar cerrahisi YBÜ	34	38	22
<i>C. albicans</i>	yeni	endotrakeal aspirat	erkek	63	Genel cerrahi YBÜ	37	37	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	kadın	43	Palyatif kliniği	32	34	21
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	56	Anestezi YBÜ	34	38	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	52	Anestezi YBÜ	34	42	22
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	24	Anestezi YBÜ	30	32	21
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	78	Nöroloji YBÜ	30	32	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	kadın	85	Nöroloji YBÜ	35	30	20
<i>C. albicans</i>	yeni	endotrakeal aspirat	kadın	42	Palyatif kliniği	30	35	21
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	77	Tıbbi onkoloji kliniği	30	25	18
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	67	Genel cerrahi YBÜ	37	35	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	kadın	57	Kardiyoloji YBÜ	30	32	20
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	erkek	42	Gastroenteroloji kliniği	38	32	19
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	kadın	87	Yanık merkezi YBÜ	32	38	20
<i>C. albicans</i>	yeni	endotrakeal aspirat	erkek	83	Tıbbi onkoloji kliniği	30	30	19
<i>C. albicans</i>	yeni	kan	kadın	53	Anestezi YBÜ	30	33	18

F: Flukonazol, V: Vorikonazol, K: Kaspofungin. YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

*CLSI M60 kriterlerine göre tüm izolatlar flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine duyarlı bulundu.

Tablo 3. *C. tropicalis* izolatları için numune ve hasta bilgileri ile antifungal duyarlılık zon çapları.

Tür	Grup	Numune	Cinsiyet	Yaş	Klinik-Birim	F (mm)*	V (mm)*	K (mm)*
<i>C. tropicalis</i>	eski	kan	kadın	63	Hematoloji kliniği	29	21	19
<i>C. tropicalis</i>	eski	kan	kadın	83	Dahiliye YBÜ	26	25	18
<i>C. tropicalis</i>	eski	vasküler kateter	erkek	74	Genel cerrahi YBÜ	25	21	20
<i>C. tropicalis</i>	yeni	kan	erkek	73	Anestezi YBÜ	25	27	20
<i>C. tropicalis</i>	yeni	kan	erkek	68	Anestezi YBÜ	22	20	20
<i>C. tropicalis</i>	yeni	kan	erkek	75	Anestezi YBÜ	27	20	20
<i>C. tropicalis</i>	yeni	kan	erkek	74	Anestezi YBÜ	28	20	20
<i>C. tropicalis</i>	yeni	endotrakeal aspirat	erkek	87	Beyin cerrahisi YBÜ	24	22	19
<i>C. tropicalis</i>	yeni	kan	kadın	80	Nöroloji YBÜ	20	18	19

F: Flukonazol, V: Vorikonazol, K: Kaspofungin. YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

*CLSI M60 kriterlerine göre tüm izolatlar flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine duyarlı bulundu.

Tablo 4. Diğer türler için numune ve hasta bilgileri ile antifungal duyarlılık zon çapları.

Tür	Grup	Numune	Cinsiyet	Yaş	Klinik-Birim	F (mm)	V (mm)	K (mm)
<i>C. glabrata</i>	yeni	endotrakeal aspirat	kadın	68	Anestezi YBÜ	18
<i>C. glabrata</i>	yeni	kan	erkek	68	Tıbbi onkoloji kliniği	24
<i>C. glabrata</i>	yeni	kan	erkek	65	Anestezi YBÜ	25
<i>C. glabrata</i>	yeni	kan	erkek	65	Kardiyoloji YBÜ	20
<i>C. glabrata</i>	yeni	kan	erkek	61	İç hastalıkları kliniği	20
<i>C. glabrata</i>	yeni	kan	kadın	46	Genel cerrahi kliniği	22
<i>C. krusei</i>	yeni	kan	erkek	37	Enfeksiyon hst. kliniği	...	24	18
<i>C. krusei</i>	yeni	kan	erkek	45	Enfeksiyon hst. kliniği	...	23	17
<i>C. krusei</i>	yeni	kan	erkek	67	KBB kliniği	...	40	19
<i>C. lusitanae</i>	yeni	kan	kadın	56	Anestezi YBÜ	13*	16*	17*

F: Flukonazol, V: Vorikonazol, K: Kaspofungin. KBB: Kulak burun boğaz. YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

CLSI M60 kriterlerine göre; **koyu** renkli değerler doza bağımlı duyarlı ve *italik* değerler duyarlı. *: tanımlanmamış

Tablo 5. CLSI M60 ve CLSI M44-A2'ye göre flukonazol duyarlılıkları.

Tür	n	n	Duyarlı	DBD	Dirençli	?	Duyarlı	DBD	Dirençli	
<i>C. albicans</i>	20	eski	3	3			3			
		yeni	17	17			17			
<i>C. parapsilosis</i>	25	eski	11	11			11			
		yeni	14	7	2	5	4	3	7	
<i>C. tropicalis</i>	9	eski	3	3			3			
		yeni	6	6			6			
<i>C. glabrata</i>	6			6			5	1		
<i>C. lusitanae</i>	1					1			1	
Toplam	61			47	8	5	1	49	4	8

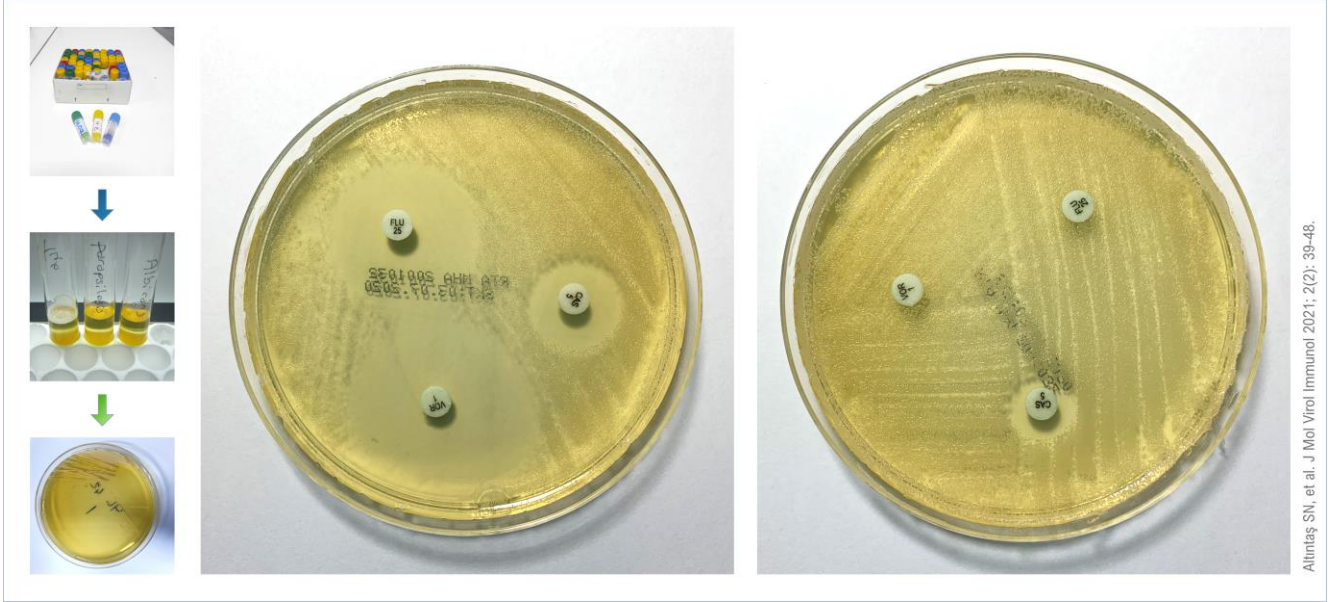
Koyu renkli değerler CLSI M60'a göre ve *italik* değerler CLSI M44-A2'ye göre değerlendirilmiştir. ?: tanımlanmamış

C. albicans izolatlarının üçü eski, 17'si yeni izolat idi. *C. albicans* izole edilen 20 hastanın; 13'ü YBÜ (yoğun bakım ünitesi) hastası, üçü kanser hastası ve ikisi palyatif bakım hastası olup *Candida* enfeksiyonları için riskli grupta yer almaktaydı (Tablo 2). *C. albicans* izole edilen hastaların yaş ortalaması 57.9 (± 18.2) idi. Eski ve yeni *C. albicans* izolatları arasında karşılaştırma

yapıldığında duyarlılık zon çapı ortalamalarının yeni izolatlarda flukonazol için 36 mm'den 33.2 mm'ye ($p = 0.11726$) ve vorikonazol için 36.7 mm'den 34.5 mm'ye düştüğü ($p = 0.22855$) izlendi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Kaspofungin için ise zon çapı ortalamalarında bir düşme izlenmedi, sırasıyla 19.7 mm ve 20 mm ($p = 0.29454$).

C. tropicalis izolatlarının üçü eski, altısı yeni izolat idi. *C. tropicalis* izole edilen dokuz hastanın sekizi YBÜ hastaları, biri ise hematoloji hastası idi (Tablo 3). Yaş ortalaması en yüksek olan grup *C. tropicalis* izole edilen hastalardı [75.2 (\pm 7.2)]. Eski suşlar ve yeni suşlar arasında karşılaştırma yapıldığında zon çapı ortalamalarının yeni

izolatlarda flukonazol için 26.7 mm'den 24.3 mm'ye ($p = 0.13642$) ve vorikonazol için 22.3 mm'den 21.2 mm'ye düştüğü ($p = 0.29325$) ancak bu farkın anlamlı düzeyde olmadığı saptandı. *C. tropicalis* izolatlarında kaspofungin için zon çapı ortalamalarında bir düşme izlenmedi, sırasıyla 18.3 ve 19.7 ($p = 0.10650$).



Resim 1. *C. parapsilosis* ATCC 22019 suşu (sol) ve çoklu ilaca dirençli bir *C. parapsilosis* izolatının (sağ) antifungal duyarlılık test sonuçları (*dirençli suş anestezi YBÜ'de tedavi gören 63 yaşındaki bir kadın hastanın kan kültüründen elde edilmiştir*).

Tartışma

Yaygın kullanılan antifungal ilaçlara dirençli invaziv fungal enfeksiyonlar küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir [8]. İnvaziv fungal enfeksiyonlar özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişiler (kanser veya HIV/AIDS-*Acquired Immune Deficiency Syndrome* hastaları) için ciddi bir sağlık tehdididir. Bazı *Candida* türleri, birinci basamak ve ikinci basamak antifungal ilaçlara, yani flukonazol ve ekinokandinlere (anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin) karşı giderek daha dirençli hale gelmektedir [8]. Bu durum, ekinokandinlerin flukonazole karşı yüksek düzeyde direnç gösteren *C. glabrata* enfeksiyonlarında tedavinin temelini oluşturduğu dikkate alındığında özellikle endişe vericidir [5,8].

Mevcut antifungal ilaçların sayısı sınırlıdır, yeni ilaçların geliştirilme hızı ise ilaç direnci gelişme insidansından daha düşüktür [9]. Çoklu ilaç direnci sergileyen mantar enfeksiyonları ile mücadelede farklı bir strateji olarak antifungal

ilaçların tedavide kombine edilerek kullanılması seçenekleri de gündeme getirilmektedir [9].

Çalışmamızda 10 yıl öncesinde izole ettiğimiz *Candida* suşları ile günümüz izolatlarında yaygın kullanılan antifungallere duyarlılık durumunu araştırdık. *C. parapsilosis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatları için eski ve yeni izolatları karşılaştırırken, bazı antifungallere doğal dirençli olan veya azalmış duyarlılık gösteren *C. krusei* ve *C. glabrata* türleri için sadece yeni izolatlarda direnç durumunu inceledik. Her hastanenin kendi tür dağılımını ve direnç profilini ortaya koyması ve izlemesi antifungal tedavi yönetiminde özel bir öneme sahiptir. Öyle ki, çalışmamızda ulaştığımız veriler ülkemizdeki ve dünya genelindeki bazı çalışmalarla benzerlikler gösterirken, hastanemiz verileri bazı noktalarda ayrılmaktadır.

Çalışmamızda, *C. parapsilosis* izolatlarında ortalama duyarlılık zon çaplarında flukonazol ve vorikonazol için istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.0001$ olmak üzere anlamlı düzeyde bir azalma

olduğu saptandı. *C. parapsilosis* izolatlarında eski izolatların tümü (11/11) flukonazol ve vorikonazole duyarlı iken CLSI M60'a göre yeni izolatların %35.7'si (5/14) flukonazole dirençli idi, flukonazole dirençli suşların eski ve yeni izolatlar arasındaki oranları arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde idi ($p = 0.03768$). Çalışma geneline baktığımızda bir *C. parapsilosis* izolatı dışında kaspofungin direnci izlenen başka bir izolat bulunmadı. Buna karşın *C. parapsilosis* izolatlarında yaygın kullanılan azollere karşı dikkat çekici düzeyde direnç geliştiğini saptadık.

Ülkemizde ve dünya genelinde yapılan çalışmalarda *C. parapsilosis* izolatları için bazı çalışmalarda düşük direnç oranları bildirilirken, yakın tarihli bazı çalışmalarda ise çalışmamıza benzer şekilde artmış direnç oranları raporlanmaktadır. Ekinokandinlerin genel klinik pratiğe girmesinden önce, flukonazol dünya çapında kandidoz tedavisi için birinci basamak antifungal durumundaydı ve halen antifungal profilakside tercih edilen bir antifungaldir [3]. Son yirmi yılda *C. parapsilosis* izolatları arasında azol dirençli suşların oranı artış eğilimindedir ve bu artış birçok ülkede yaygın kullanılan birinci basamak antifungal olan flukonazolün aşırı ve yanlış kullanımı ile ilişkilendirilmektedir [3].

C. parapsilosis enfeksiyonlarında dünya genelinde flukonazol direnci insidansının %2 ile %5 arasında değiştiği tahmin edilmektedir [10]. Bununla beraber farklı çalışmalarda ve farklı gruplarda bu oranların değiştiği görülmektedir. Örneğin, 2019 tarihinde Kamerun'da yürütülen bir çalışmada HIV ile enfekte kişilerden izole edilen 18 *C. parapsilosis* izolatının tümü flukonazole duyarlı bulunmuştur, aynı grupta *C. glabrata* direnci %3.03 (1/33), *C. tropicalis* direnci ise %50 (13/26) olarak bildirilmiştir [11]. Güney Afrika'da yürütülen ve kandidemi etkeni *C. parapsilosis* izolatlarının dahil edildiği 2016 tarihli çok merkezli bir çalışmada ise 531 *C. parapsilosis* izolatından %46.9'unun flukonazole dirençli olduğu ve flukonazole dirençli izolatların %44'ünün (123/282) aynı zamanda vorikonazole çapraz dirençli olduğu saptanmıştır [12]. Çalışmamızda 10 yıl önceki izolatlarımız, Kamerun çalışmasında olduğu gibi [11], flukonazole tamamen duyarlı iken, yeni izolatlarımızdaki direnç oranı %35.7

(5/14) olarak bulundu. Çalışmamızda flukonazol dirençli beş izolatın biri vorikonazole dirençli (%20) ve ikisi (%40) vorikonazole DBD idi. Çoğunlukla flukonazol ile vorikonazol arasında gelişen azol çapraz direncinin flukonazole dirençli *C. parapsilosis* izolatlarının yaklaşık üçte ikisinde görüldüğü bildirilmektedir [3]. Bizim verilerimizde bu oran %20 olarak bulunmakla beraber, DBD suşlar da dikkate alındığında literatürde belirtilen oranlara yaklaşmaktadır. Çalışmamıza benzer, hatta daha yüksek oranda azol direncinin raporlandığı Güney Afrika çalışmasında, triazolere dirençli *C. parapsilosis* ilişkili enfeksiyonların artan oranının, sınırlı kaynaklara sahip Güney Afrika hastanelerinde kritik hastalığı olan yenidoğanlar, çocuklar ve yetişkinler arasında kandideminin tedavisi için antifungal ilaçların seçimini sınırladığına dikkat çekilmiştir [12]. Kapsamlı çalışma verilerine göre *C. parapsilosis*, bebeklerde ve yenidoğanlarda tüm fungemi olgularının %17-50'sinden sorumlu olduğu için pediatrik popülasyona yönelik tehdidiyle iyi bilinen bir enfeksiyon etkenidir [10]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 25 *C. parapsilosis* izolatının %12'si (3/25) bebeklerden izole edilirken, pediatrik popülasyonda izole edilen tüm dört *Candida* türü *C. parapsilosis* idi. Bununla beraber dirençli *C. parapsilosis* suşlarının tamamı erişkin hastalardan izole edildi ve bu hastaların tamamı YBÜ'lerinde tedavi görmekte idi.

Türkiye'den yapılan önceki çalışmalarda *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol direnci %0-7.4 aralığında bildirilmiştir [13-16]. YBÜ hastalarında 2007 tarihinde kandidemi etkeni olarak izole edilen *C. albicans* ve *C. parapsilosis* klinik suşların dahil edildiği bir çalışmada [16], *C. albicans* izolatlarında flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin dirençli izolat saptanmamış olup bu veri çalışmamızdaki eski ve yeni izolatlardan elde ettiğimiz sonuçlarla uyumluydu, çalışmamızda farklı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da, *C. albicans* izolatlarında flukonazol ve vorikonazol için antifungal duyarlılık zon çaplarının azaldığını tespit ettik. Bahsedilen çalışmada *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol, vorikonazol dirençli izolatların oranı ise %7.4 (2/27) ve %3.7 (1/27) olarak bildirilmiş ve bir *C. parapsilosis* izolatı flukonazole DBD olarak bulunmuştur [16]. Daha yeni bir çalışmada ise *C. parapsilosis*

izolatlarındaki flukonazol direnci önceki çalışmalara göre belirgin olarak daha yüksek oranda bulunmuştur [17]. Kan kültürlerinden izole edilen 118 stok *C. parapsilosis* izolatında flukonazol ve vorikonazol de dahil olmak üzere çeşitli antifungal ilaçlara duyarlılık durumunun mikrodilüsyon yöntemi ile (CLSI M27-A3) araştırıldığı 2019 tarihli bu çalışmada, iki izolat (%1.7) vorikonazole DBD olarak tanımlanırken, bir izolat (%0.8) flukonazole DBD ve 31 (%26.3) izolat flukonazole dirençli bulunmuştur. Bahsedilen çalışmada 2010-2014 yılları arasında izole edilen suşların incelendiği bildirilmiştir [17]. Çalışmamızda eski izolatları (2010 öncesi) ve yeni izolatları (2019 sonrası) havuzladığımızda 25 *C. parapsilosis* izolatından iki izolat (%8) flukonazole DBD ve beş izolat (%20) flukonazole dirençli olarak bulunurken, bir izolat (%4) vorikonazole dirençli ve iki (%8) izolat vorikonazole DBD olarak bulundu. *C. parapsilosis* izolatlarımızın %92'si (23/25) kan dolaşımı (21 izolat) ve vasküler kateter (iki izolat) izolatları olup, sayıca az olmakla beraber ilgili çalışma ile karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir [17]. Bununla beraber çalışmamızı farklı kılan nokta verilerimizin 10 yıl önceki direnç durumunu günümüzdeki durumla karşılaştırmaya olanak vermesidir. Çalışmamızda 10 yıl veya daha önce izole edilip stoklanan *C. parapsilosis* izolatlarında triazolere dirençli suşlar ya da DBD izolatlar bulunmazken, 10 yıl sonra flukonazole %35.7 (5/14) ve vorikonazole %7.14 (1/14) oranlarında direnç saptanması ve ayrıca DBD izolatların bulunması ve duyarlılık zon çaplarındaki anlamlı düşüş; son on yıldaki büyük değişimi açıkça ortaya koymaktadır. Yine dünyanın farklı bölgelerinde yapılan bazı çalışmalarda *C. parapsilosis* izolatlarında daha yüksek flukonazol direnç oranları da bildirilmektedir. Yukarıda bahsedilen Güney Afrika çalışmasında *C. parapsilosis* izolatlarının %46.9'unun, Çin'de yürütülen ve YBÜ tedavisi gören invaziv kandidoz gelişmiş hastaların dahil edildiği başka bir çalışmada ise *C. parapsilosis* izolatlarının %51.8'inin flukonazole dirençli olduğu bildirilmiştir [12,18]. Çalışmamızda 2019 yılında hastanemizde yatarak tedavi gören invaziv kandidoz gelişmiş YBÜ hastalarından izole ettiğimiz *C. parapsilosis* izolatlarındaki yüksek direnç oranı (CLSI M60'a göre %35.7) ülkemizde

bildirilen çalışmalar arasında en yüksek direnç oranlarının izlendiği çalışmalardan biri olup, son 10 yılda antifungal direnç profilinin ülkemizde önemli derecede değiştiğine ve *C. parapsilosis* ve flukonazol ikilisi için farklı bir duruma geçtiğimize işaret etmektedir. *C. parapsilosis* enfeksiyonlarda artan direnç flukonazolün yaygın ve uygun olmayan kullanımı ile ilişkilendirilmekle beraber, *C. parapsilosis* türü mayaların çevresel koşullara yüksek dayanıklılığı ve hastane ortamlarında uzun süre canlılığını sürdürebilmesi, bu türün YBÜ hastaları arasında hastane enfeksiyonları şeklinde yayılmasını kolaylaştırmakta ve dirençli suşların artan oranlarına neden olmaktadır [16,19]. Yoğun bakım ünitelerindeki invaziv prosedürlerin, total parenteral beslenme ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımı yanında, enfeksiyon kontrol önlemlerindeki eksikliğin, *C. parapsilosis* kandidemisinin hastane ortamlarındaki yüksek insidansı ile ilişkili muhtemel faktörler olduğu değerlendirilmektedir [16].

Çalışmamızda ayrıca bir *C. parapsilosis* izolatı (%4) kaspofungine *in-vitro* dirençli olarak bulundu. Ülkemizde yürütülen ve 2010-2014 izolatlarının incelendiği farklı bir çalışmada yine bir *C. parapsilosis* izolatı diğer bir ekinokandin olan anidulafungin için OD olarak rapor edilmiştir [17]. Türkiye'de yürütülen farklı bir çalışmada ise 27 *C. parapsilosis* izolatından sadece birinin (%3.7) kaspofungine dirençli olduğu raporlanmıştır [16]. Önceki çalışmalarda sunulan veriler diğer *Candida* türleri ile kıyaslandığında *C. parapsilosis* izolatları için daha yüksek minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin raporlandığını gösterirken, çalışmamızda olduğu gibi nadir de olsa ekinokandinlere dirençli *C. parapsilosis* suşlarının varlığı da bildirilmektedir. Bununla beraber, bu *in-vitro* azalmış duyarlılığın *C. parapsilosis* izolatlarının tedavisinde kaspofungin için klinik yansması açık değildir.

Antifungal duyarlılık testlerindeki hataları azaltmayı ve sonuçların tekrarlanabilirliğini ve standardizasyonunu hedefleyen CLSI referans yöntemlerindeki güncellemeler ile yöntemler arası farklılıkların, yani hata oranlarının azaldığı bildirilmektedir [5]. Bu çalışmada laboratuvarımız kütüphanesinde bulunan eski (en az 10 yıl önce izole edilen) ve yeni izolatlar hem 2009 yılında belirlenen M44-A2 kriterlerine göre hem de 2017

yılında yayımlanan son raporda (CLSI M60) yer alan türe özgü direnç sınır kriterlerine göre değerlendirildi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Her iki yöntem için test prosedürleri aynı olmakla beraber değerlendirme kriterleri farklılıklar içermektedir. Çalışmamızda bazı izolatların bu iki yöntem arasında kategori değiştirdiği izlendi. Örneğin, *C. parapsilosis* izolatlarında CLSI M44-A2'ye göre DBD olarak değerlendirilen üç izolatin CLSI M60'a göre duyarlı kategorisinde yer aldığı ve dirençli kategorisinde bulunan iki izolatin DBD kategorisine geçtiği, yani toplamda beş *C. parapsilosis* izolatında kategori değişikliği olduğu saptandı. CLSI-M60 tür spesifik kriterlerinin test sonuçlarını değerlendirmeyi ve yorumlamayı

hızlandırdığı gibi türe özgü değerler içermesi nedeni ile antifungal direnç epidemiyolojisi ile ilgili diğer çalışmalar ile karşılaştırmalar yapmayı kolaylaştırdığını gözlemledik.

Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızda *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatlarından farklılaşmış olarak *C. parapsilosis* izolatlarında antifungal direnç oranlarında son yıllarda dikkate değer bir artış olduğunu saptadık. Azalan duyarlılık zon çapları dikkate alındığında ise gelecekte *C. albicans* ve *C. tropicalis* için de benzer sorunların ortaya çıkabileceğini ve bu durumun izlenmesi gereken önemli bir değişim olduğunu düşünüyoruz.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. 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. Kumar A, Jha A. Introduction (Chapter 1). In: Kumar A, Jha A (eds), Anticandidal Agents. 2017, Academic Press, Chennai, India. pp: 1-5.
2. d'Enfert C, Bougnoux ME. Human Fungal Infections. In: McQueen CA (ed), Reference Module in Biomedical Sciences (3rd edition). 2014, Elsevier. pp: 1-13.
3. Papp C, Bohner F, Kocsis K, Varga M, Szekeres A, Bodai L, et al. Triazole Evolution of Candida parapsilosis Results in Cross-Resistance to Other Antifungal Drugs, Influences Stress Responses, and Alters Virulence in an Antifungal Drug-Dependent Manner. mSphere 2020; 5(5): e00821-20. [Crossref]
4. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4(2): 119-28. [Crossref]
5. Hazırolan 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]
6. 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.
7. 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.
8. Sawant B, Khan T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. Biomed Pharmacother 2017; 96: 1478-90. [Crossref]
9. Lee H, Lee DG. Novel Approaches for Efficient Antifungal Drug Action. J Microbiol Biotechnol 2018; 28(11): 1771-81. [Crossref]
10. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in Candida albicans and Emerging Non-albicans Candida Species. Front Microbiol 2017; 7: 2173. [Crossref]
11. Ngouana TK, Toghueo RMK, Kenfack IF, Lachaud L, Nana AK, Tadjou L, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility testing of non-albicans Candida species colonizing mucosae of HIV-infected patients in Yaoundé (Cameroon). J Mycol Med 2019; 29(3): 233-8. [Crossref]
12. Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, et al; TRAC-South Africa group. Emergence of azole-resistant Candida parapsilosis causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. J Antimicrob Chemother 2016; 71(7): 1994-2004. [Crossref]
13. Hazırolan G, Yıldırım D, Baran I, Mumcuoğlu İ, Aksu N. Yatan hasta örneklerinden izole edilen Candida izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg 2015; 72(1): 17-26 [Crossref]
14. Calgin MK, Cetinkol Y. Distribution and antifungal susceptibility patterns of Candida species at a university hospital in Northern Turkey. J Infect Dev Ctries 2018; 12(2): 97-101. [Crossref]

15. Kiraz N, Oz Y. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. *Med Mycol* 2011; 49(2): 126-31. [[Crossref](#)]

16. Dizbay M, Fidan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, et al. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. *Scand J Infect Dis* 2010; 42(2): 114-20. [[Crossref](#)]

17. Dalyan Cilo B, Aca H, Ener B. Kan rneklerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Suşlarının Tür Düzeyinde Tanımlanması ve Antifungal

Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 2019; 49(2): 61-6. [[Crossref](#)]

18. Liu W, Tan J, Sun J, Xu Z, Li M, Yang Q, et al; China-SCAN team. Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(1): 162-7. [[Crossref](#)]

19. Hoşbul T, Gümral R, Bektöre B, Tekin K, Şahiner F. *C. parapsilosis* İzolatlarının Soğuk Saklama Koşullarına Dayanıklılığı: 10 Yıllık Stoklama Sonrası Canlandırma. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2020; 50(2): 70-7. [[Crossref](#)]