

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOLE DİRENÇLİ *CANDIDA*
ALBICANS İZOLATLARINDA SİTOKROM P450
14 α -DEMETİLİZ ENZİMİNDE
DEĞİŞİKLİKLERE YOL AÇAN
MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

LERZAN MANASTIR

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOLE DİRENÇLİ *CANDIDA*
ALBICANS İZOLATLARINDA SİTOKROM P450
14 α -DEMETİLİZ ENZİMİNDE
DEĞİŞİKLİKLERE YOL AÇAN
MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

LERZAN MANASTIR

Danışman Öğretim Üyesi

PROF. DR. MİNE YÜCESOY

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 04 KBSAĞ 091 sayı ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez projemizin tamamlanmasında geçen uzun süreçte bilgi ve deneyimlerinden yararlandđđım, desteğini ve çabasını benimle paylaŐan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine YÜCESOY'a, tez izleme komitesinde yer alan ve tez projemizin gelişimine bilgi ve katkılarıyla yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a, tez izleme komitesinde yer alan hocam Sayın Prof. Dr. Nedim ÇAKIR'a ve her zamanki gibi bilgilerini bizimle paylaşarak destek olan Anabilim Dalı Başkanımız hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ABACIOğLU'na teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yardımını benden hiç esirgemeyen mkemmел arkadaş Uzman Dr. Cem ERGON'a, bana zaman ayırıp, destek olan Yard. Doç. Dr. Hakan TOPAçOğLU'na, arkadaşlarım Dr. Melih GÜNDÜZ ve Dr. İlhan GÜRBÜZ'e, birlikte paylaŐtđđımız arkadaşlarıma, aileme ve kızıma teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|---|---|
| TABLO LİSTESİ | v |
| ŞEKİL LİSTESİ | vi |
| KISALTMALAR | vii |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. SUMMARY | 3 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 5 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 7 |
| 4.1. Tarihçe | 7 |
| 4.2. Genel Özellikler | 7 |
| 4.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı | 8 |
| 4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri | 9 |
| 4.4.1. Yapışma (Aderans) | 10 |
| 4.4.2. Biyofilm Yapımı (“Slime” Üretimi) | 10 |
| 4.4.3. Enzimler | 11 |
| 4.4.3.1. Proteinazlar | 11 |
| 4.4.3.2. Fosfolipazlar | 11 |
| 4.4.3.3. Lipazlar | 12 |
| 4.4.4. Morfolojik Değişim | 12 |
| 4.4.5. Fenotip değişimi | 13 |
| 4.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi | 13 |
| 4.4.7. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği | 13 |
| 4.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar | 13 |
| 4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz | 14 |
| 4.5.1.1. Ağız Kandidozu | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| 4.5.1.2. Özefagus Kandidozu | 14 |
| 4.5.1.3. Sindirim Sistemi Kandidozu | 14 |
| 4.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz | 14 |
| 4.5.1.5. Deri Kandidozu | 15 |
| 4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz | 15 |

| | |
|--|----|
| 4.5.3. Sistemik Kandidoz..... | 15 |
| 4.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı | 15 |
| 4.6.1. Direk Bakı ve Kültür | 16 |
| 4.6.2. Serolojik Tanı | 18 |
| 4.6.2.1. Antijen Saptayan Testler:..... | 18 |
| 4.6.2.2. Antikor saptayan testler..... | 19 |
| 4.6.3. Deri testleri | 21 |
| 4.6.4. Moleküler Tanı | 22 |
| 4.6.4.1. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri..... | 22 |
| 4.6.4.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZT) | 22 |
| 4.6.4.1.2. Sekanslama (Dizi Analizi)..... | 23 |
| 4.6.4.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri..... | 23 |
| 4.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç | 24 |
| 4.7.1. Polyenler | 24 |
| 4.7.1.1. Amfoterisin B | 24 |
| 4.7.1.2. Nistatin | 25 |
| 4.7.2. Azol Türevleri..... | 25 |
| 4.7.3. 5 Flusitozin (Florositozin) | 29 |
| 4.7.4. Hücre Duvarına Etkili Antifungaller | 29 |
| 4.7.5. Allilaminler | 30 |
| 4.8. Antifungal Duyarlılık Testleri | 30 |
| 4.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler | 31 |
| 4.8.1.1. Makrodilüsyon yöntemi | 31 |
| 4.8.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi | 32 |
| 4.8.1.3. Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi..... | 32 |
| 4.8.1.4. Yarı katı agar dilüsyon yöntemi | 32 |
| 4.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler | 33 |
| 4.8.2.1. Disk difüzyon yöntemi | 33 |
| 4.8.2.2. E test yöntemi..... | 33 |
| 4.8.3. Diğer Yöntemler | 33 |
| 4.8.3.1. Flovsitometrik yöntem | 33 |
| 4.8.3.2. Ergosterol kantitasyonu..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 5. GEREÇ VE YÖNTEMLER | 35 |
| 5.1. Suşlar | 35 |
| 5.2. Tanımlama Yöntemleri | 35 |
| 5.3. Antifungal Duyarlılık Çalışması | 35 |
| 5.3.1. Duyarlılık Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması | 36 |
| 5.3.1.1. Besiyeri Hazırlanması | 36 |
| 5.3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Konsantrasyonları | 36 |
| 5.3.1.3. Maya İnokulumlarının Hazırlanması | 36 |
| 5.3.2. Testin Uygulanışı | 37 |
| 5.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi | 37 |
| 5.4. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) | 37 |
| 5.4.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon) | 38 |
| 5.4.2. REA Yönteminin Uygulanması | 39 |
| 5.4.2.1. REA İçin Yapılan PZT İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması | 39 |
| 5.4.2.2. REA İçin Yapılan PZT Çalışmasında Kullanılan Öncüller | 40 |
| 5.4.2.3. REA İçin Yapılan PZT Karışımı ve Isı Döngüsü | 40 |
| 5.4.2.4. REA İçin Yapılan PZT Ürününün Görüntülenmesi | 41 |
| 5.4.2.4.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması | 41 |
| 5.4.2.4.2. REA İçin Yapılan PZT Ürününün Görüntülenmesi | 41 |
| 5.4.2.5. REA Çalışması | 42 |
| 5.4.2.5.1. Purifikasyon Çalışması | 42 |
| 5.4.2.5.2. REA İşleminin Uygulanması | 42 |
| 5.5. Dizi Analizi İçin PZT Yönteminin Uygulanması | 43 |
| 5.5.1. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması | 43 |
| 5.5.2. Dizi Analizi-PZT Uygulaması İçin Karışım ve Isı Döngüsü | 44 |
| 5.5.3. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi | 45 |
| 5.5.3.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması | 45 |
| 5.5.3.2. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi | 45 |
| 5.5.4. Dizi Analizi Çalışması | 45 |
| 5.5.4.1. Dizi Analizi Çalışması İçin Sentezlenen Öncüller | 46 |
| 5.5.4.2. Dizi Analizi Çalışmasının Yorumlanması | 46 |

| | |
|---|----|
| 5.6. İlaç Atım Pompalarının Substrat ve İnhibitörü Olan Maddeler ile Duyarlılık Çalışması..... | 46 |
| 5.6.1. Substrat Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması | 46 |
| 5.6.1.1. Duyarlılık Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması | 47 |
| 5.6.1.1.1. Besiyeri Hazırlanması | 47 |
| 5.6.1.1.2. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması | 47 |
| 5.6.1.2. Maya İnokulumlarının Hazırlanması..... | 47 |
| 5.6.1.3. Testin Yapılışı | 47 |
| 5.6.2. İnhibitör Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması..... | 48 |
| 5.6.2.1. Duyarlılık Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması | 48 |
| 5.6.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması | 48 |
| 5.6.2.1.2. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması | 48 |
| 5.6.2.2. Maya İnokulumlarının Hazırlanması..... | 48 |
| 5.6.2.3. Testin Yapılışı | 48 |
| 5.7. İstatistiksel Analiz | 49 |
| 6. BULGULAR | 50 |
| 6.1. Antifungal Duyarlılık Çalışması Sonuçları | 50 |
| 6.2. Flukonazole Dirençli <i>C. albicans</i> Suşlarının Soyutlandığı Hasta Bilgileri..... | 52 |
| 6.3. <i>C. albicans</i> Suşlarının Fenotipik Özellikleri | 53 |
| 6.4. REA İçin PZT Çalışması Sonuçları..... | 53 |
| 6.5. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması Sonuçları..... | 57 |
| 6.5.1. Dizi Analizi Çalışması Sonuçları..... | 58 |
| 6.6. İlaç Atım Pompalarının Substrat ve İnhibitör Maddeler ile Duyarlılık Çalışması Sonuçları | 75 |
| 6.6.1. Substrat Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması | 75 |
| 6.6.2. İnhibitör Maddeler ile Duyarlılık Çalışması Sonuçları | 79 |
| 7. TARTIŞMA..... | 82 |
| 8. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 97 |
| 9. KAYNAKLAR..... | 99 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Tablo-1. Flukonazole R/DBD <i>C. albicans</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları | 51 |
| Tablo-2. Flukonazole D <i>C. albicans</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları..... | 52 |
| Tablo-3. Flukonazole R/DBD ve D suşların amino asit değişimi sonuçları..... | 60 |
| Tablo-4. Flukonazole R/DBD olarak belirlenen <i>C. albicans</i> suşları ile kontrol suşlarının substrat grubu maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları..... | 77 |
| Tablo-5. Flukonazole D olarak belirlenen <i>C. albicans</i> suşları ile kontrol suşlarının substrat grubu maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları | 78 |
| Tablo-6. Flukonazole R/DBD <i>C. albicans</i> suşlarının inhibitör maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları | 80 |
| Tablo-7. Flukonazole D <i>C. albicans</i> suşlarının inhibitör maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları..... | 81 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil- 1. DSY 289 ve DSY 347 <i>C. albicans</i> suşlarının REA sonrasında elde edilen jel görüntüsü | 54 |
| Şekil- 2. Flukonazole R/DBD <i>C. albicans</i> suşlarının REA görüntüsü..... | 55 |
| Şekil- 3. Flukonazole D on adet <i>C. albicans</i> suşu ile elde edilen REA ürünlerinin jel görüntüsü | 56 |
| Şekil- 4. Flukonazole R/DBD <i>C. albicans</i> suşlarının dizi analizi öncesi yapılan PZT ürünlerinin jel görüntüsü | 57 |
| Şekil- 5. Flukonazole D <i>C. albicans</i> suşlarının dizi analizi öncesi yapılan PZT ürünlerinin jel görüntüsü | 58 |
| Şekil- 6. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda dizi analizi ile saptanan nükleotid değişiklikleri sonuçları | 71 |
| Şekil- 7. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları | 75 |
| Şekil- 8. <i>C. albicans</i> sitokrom P450 lanosterol 14 alfa demetilaz enziminin üç boyutlu görünümü..... | 86 |

KISALTMALAR

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

GİS: Gastrointestinal Sistem

SDA: Sabouraud Dekstrozu Agar

KOÜ: Koloni Oluşturan Ünite

AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu

KOH: Potasyum Hidroksit

BHI: Beyin Kalp İnfüzyon

SABHI: Sabouraud-BHI

RIA: Radio Immun Assay

EIA: Enzim Immun Assay

LA: Lateks Aglütinasyon

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

Real-time PZT: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

Sap: Salgısal aspartik proteinaz

EUCAST: "European committee for antimicrobial susceptibility testing"

CDC: Centers for Disease Control

Öncül: primer

"ATP binding cassette": ATP bağlayan kaset tipi pompalar

"Major facilitators": major kolaylaştırıcı tip pompalar

EDTA: etilen diamin tetra asetat

SDS: sodyum dodesil sülfat

NB: "northern blotting"

"Site-directed" mutagenesis: yönlendirilmiş mutagenizasyon

1. ÖZET

Flukonazole Dirençli *C. albicans* İzolatlarında Sitokrom P450 14 α -demetilaz Enziminde Değişikliklere Yol Açan Mutasyonların Araştırılması

Yaşamı tehdit eden fungal infeksiyonların sıklığında görülen artış, günümüzde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu infeksiyonlar için risk altında olan transplantasyon ve yoğun bakım hastalarının sayısının giderek artması ve ampirik antifungallerin kullanımı sorunu daha da önemli hale getirmiştir. Özellikle flukonazolün yaygın ve tekrarlanarak kullanımı klinik yanıtızsızlık ile sonuçlanan direnç sorununa yol açmıştır. Çalışmamız flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında direnç mekanizmalarının araştırılması amacıyla planlanmıştır. Araştırmamızda flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı *C. albicans* suşlarında direnç mekanizmalarından birini oluşturan lanosterol 14 alfa demetilaz enziminde meydana gelen Y132H ve diğer mutasyonların incelenmesi ve atım pompalarının bu dirençteki rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamıza Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Mikoloji laboratuvarından soyutlanan 650 adet *C. albicans* suşundan flukonazole dirençli olarak belirlenen üçünün yanı sıra on adet flukonazole duyarlı suş ile diğer Üniversitelerden gönderilen flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı dört adet *C. albicans* suşu dahil edilmiştir. Araştırmada kontrol suşları olarak DSY 289, DSY 347, DSY 292 numaralı *C. albicans* suşları kullanılmıştır.

C. albicans suşlarının antifungallere duyarlılıkları “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Buna göre araştırmamıza alınan flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı yedi *C. albicans* suşunun biri dışında tümü flusitazine dirençli, tümü AmB’ye duyarlı, biri dışında tümü itrakonazol ve ketokonazole dirençli, diğer bir tanesi dışında yine tümü klotrimazole duyarlı olarak bulunmuştur. Flukonazole duyarlı on adet *C. albicans* suşunun altısının flusitazine orta duyarlı, dördünün flusitazine dirençli olduğu, tümünün AmB, ketokonazol ve klotrimazole duyarlı, itrakonazole ise doza bağımlı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Çalışmaya alınan tüm suşlarda restriksiyon enzim analizi ile Y132H mutasyonu; dizi analizi ile lanosterol 14 α -demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* gen bölgesindeki diğer mutasyonlar araştırılmıştır. Suşların DNA eldesi Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel,

Almanya) ile üretici firma önerisi doğrultusunda, EDTA, litikaz, sorbitol tampon gibi maddeler eklenerek sağlanmıştır. Çalışmaya alınan suşlarda 673 bp'lik polimeraz zincir tepkimesi ürününün varlığı belirlendikten sonra purifikasyon işlemi takiben *PagI* enzimi ile kesim uygulanmıştır. İncelenen flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı ve duyarlı tüm suşlarda 315 ile 358 bp'lik iki adet bant varlığı saptanmış, bu nedenle tüm suşlarda Y132H mutasyonunun bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Tüm suşlara *ERG11* gen bölgesindeki 1600 bp'lik alanın çoğaltıldığı polimeraz zincir tepkimesini takiben dizi analizi uygulanmış ve sonuçlar Bio-edit version 7.0 programı ile değerlendirilmiştir. Dizi analizi sonuçları incelendiğinde, tüm suşlarda restriksiyon enzim analizi ile de araştırılan Y132H mutasyonunun bulunmadığı saptanmıştır. Flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı suşlardan birinde, flukonazole duyarlı suşlardan iki tanesinde hiçbir mutasyon belirlenmemiştir. İncelenen duyarlı suşlarda D116E, K128T, E266D, L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H, V437I mutasyonları; dirençli/doza bağımlı duyarlı suşlarda ise D116E, K143R, D153E, E266D, S412T, G464S, G465S, R469K, V488I mutasyonları saptanmıştır. Dirençli, doza bağımlı duyarlı suşlardan üç tanesinde daha önce flukonazole direnç gelişiminde rolü olduğu bildirilmiş K143R, G464S, G465S ve V488I mutasyonları belirlenmiştir. Dizi analizi sonucunda sadece bu grup suşlarda belirlenen S412T, R469K mutasyonlarının da dirençte rolü olabileceği, ancak bu mutasyonların ileri çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Direnç ile ilişkili diğer bir mekanizma olan atım pompalarının araştırılması için "Clinical and Laboratory Standards Institute" M27-A2 standartlarına uygun mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılık çalışması uygulanmıştır. Subtrat ve inhibitör etkili maddeler kullanılarak yapılan bu çalışma değerlendirildiğinde, özellikle Dokuz Eylül Üniversitesi'nde soyutlanan üç adet flukonazole dirençli *C. albicans* suşunda atım pompa ekspresyonundaki artışın direnç gelişiminde etkili olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; çalışmamıza alınan dirençli/doza bağımlı duyarlı *C. albicans* suşlarında flukonazole direnç gelişiminde etkili mekanizmaların lanosterol 14 alfa demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* genindeki K143R, G464S, G465S, V488I gibi mutasyonlar ile atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu; ancak bu suşlarda flukonazole direnç gelişiminde etkili *ERG11*'in fazla ekspresyonu, *ERG3* genindeki mutasyonlar gibi diğer mekanizmaların da araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

2. SUMMARY

Investigation of Mutations Which Cause Alterations in Cytochrome P450 14 α -Demethylase Enzyme of Fluconazole Resistant *Candida albicans* Isolates

Increase in frequency of life-threatening fungal infections has contributed to an important problem nowadays. The increase in the number of the transplantation and intensive care patients who are at risk for fungal infections and empirical use of antifungals has elevated the importance of the problem. Especially widespread and repeated use of fluconazole resulted in resistance problem correlating with clinical failure. Our study was planned to investigate resistance mechanisms in fluconazole resistant *C. albicans* isolates. In our study, investigation of Y132H and other mutations in *ERG11* gene that encodes lanosterole 14 α -demethylase enzyme which is one of the resistance mechanisms in fluconazole resistant/dose dependent susceptible *C. albicans* isolates and determination of the role of efflux pumps in this resistance were aimed.

In this study three fluconazole resistant and ten fluconazole susceptible isolates chosen from 650 *C. albicans* strains isolated from Dokuz Eylül University Hospital Mycology Laboratory and four fluconazole resistant/dose dependent susceptible *C. albicans* isolates obtained from other universities were included. DSY 289, DSY 347 and DSY 292 numbered *C. albicans* isolates were used as control strains.

The susceptibility of *C. albicans* isolates were determined by broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 standards. All of the seven fluconazole resistant/dose dependent susceptible *C. albicans* isolates were found to be resistant to flucytosine except one, all isolates were susceptible to amphotericine B and all isolates except one were resistant to itraconazole and ketoconazole and all of them except one were susceptible to clotrimazole. Six fluconazole susceptible *C. albicans* isolates were found to be resistant to flucytosine and the others were intermediate. All of the ten isolates were susceptible to amphotericine B, ketoconazole, clotrimazole.

Restriction enzyme analysis was performed to all isolates for Y132H mutation and sequence analysis was done for other mutations in *ERG11* gene which encodes lanosterole 14 α -demethylase enzyme. DNA extraction was performed with Nucleospin Tissue Kit

(Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions by adding EDTA, lyticase, sorbitol buffer.

After determining a 673 bp polymerase chain reaction product, digestion with PstI enzyme was performed following purification. 315 and 358 bp fragments were determined in all fluconazole resistant/dose dependent susceptible and susceptible *C. albicans* isolates and for this reason it is concluded that Y132H mutation does not exist in our strains.

Sequence analysis was performed to all strains after amplification of 1600 bp fragment of *ERG11* gene by polymerase chain reaction and the results were evaluated with Bio-edit version 7.0 program. When the sequence analysis results were interpreted, it was found that Y132H mutation does not exist in all isolates as determined by restriction enzyme analysis. No mutation was detected in one of the fluconazole resistant/dose dependent susceptible, two of the fluconazole susceptible *C. albicans* isolates. D116E, K128T, E266D, L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H, V437I mutations were determined in fluconazole susceptible *C. albicans* isolates and D116E, K143R, D153E, E266D, S412T, G464S, G465S, R469K, V488I were found in resistant/dose dependent susceptible *C. albicans* isolates. K143R, G464S, G465S and V488I mutations which has been reported as important for fluconazole resistance previously were determined in three of the fluconazole resistant/dose dependent susceptible isolates. S412T and R469K mutations determined only in this group of strains by sequence analysis were thought to play a role in resistance but they should be evaluated with advanced studies.

Efflux pumps which is another mechanism for resistance were investigated by susceptibility testing performed by microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 standards. When the study performed by using substrates and inhibitors was evaluated, possible overexpression of efflux pumps was determined especially in three fluconazole resistant *C. albicans* strains isolated in Dokuz Eylül University Hospital.

In conclusion, mutations such as K143R, G464S, G465S and V488I in *ERG11* gene which encodes lanosterole 14 α -demethylase enzyme and overexpression of efflux pumps were determined to be effective mechanisms in our fluconazole resistant/dose dependent susceptible *C. albicans* isolates, however other mechanisms of resistance such as overexpression of *ERG11*, mutations in *ERG3* gene should also be investigated.

3. GİRİŞ VE AMAC

Son yıllarda, kanser kemoterapisi, kemik iliği ve organ nakli, AIDS gibi nedenlerle immun sistemi baskılanmış hastalarla; hemodiyaliz, periton diyalizi, parenteral beslenme, geniş spektrumlu antibiyotik ve glukokortikoidlerin uygulandığı kişilerde sistemik fungal infeksiyonların sıklığında artış gözlenmektedir. Fungal infeksiyonlara yol açan fırsatçı mantarlar içerisinde *Candida* ve *Aspergillus* türleri en sık görülen etkenlerden ikisidir. Bu infeksiyonlar, önemli bir mortalite ve morbidite sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (1,2). Yapılan bir çalışmada hastane kaynaklı kandidemi tablosunun hastanın yatış süresini otuz gün uzattığı ve mortalitenin de %35 olduğu bildirilmektedir (3). Bu nedenle invaziv kandidozun erken dönemde tanınması ve uygun antifungal sağaltıma başlanması önemlidir.

Mikoloji laboratuvarlarında hastaların örneklerinden üreyen maya türleri için geleneksel yöntemlerle cins ya da tür düzeyinde tanımlama yapmak 2-5 gün kadar sürmekte ve çoğunlukla tanı konulmadan önce ampirik antifungal sağaltıma başlanmaktadır. Bu yaklaşım ise zaman alıcı ve pahalı olup, uygun antifungal sağaltıma başlanamaması ya da *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi antifungallere dirençli/daha az duyarlı türlerin varlığı gibi nedenlerle yetersiz kalmaktadır (4). Ayrıca ciddi klinik tablolardaki olguların *Candida* infeksiyonlarının sağaltımı önemli bir sorun oluşturmakta, antifungal ajanların kısıtlılığı ve gelişen direnç, sorunu daha da önemli hale getirmektedir (4).

Kandidoz sağaltımı azollerin tanınması ile büyük ölçüde kolaylaşmış olmasına karşın flukonazolün sık kullanımı direnç gelişimine neden olmuştur. Direnç gelişiminde konak, etken ve ilaca bağlı çok faktörlü kompleks bir mekanizmanın varlığı söz konusudur (5).

Antifungal ilaçlar içerisinde amfoterisin B, toksisitesi ve yan etkilerinin sıklığı gibi nedenlerle sınırlı kullanılmakta olup, azol grubu ilaçlar biyoyararlanımlarının yüksekliği, güvenlik profillerinin iyi oluşu gibi nedenlerle yeğlenmektedir (5). Ancak son yıllarda azol grubu ilaçlara dirençli *Candida* türleri bildirilmiştir (5). Özellikle uygulanan uzun süreli sağaltımlar ve flukonazolün sürekli kullanımından çok aralıklı kullanımı direnç gelişimine yol açmaktadır. *Candida* türlerinde azoller için söz konusu olan direnç mekanizmaları farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. Bunlar;

- i) Hücre içerisinde ilaç birikiminde azalma,
- ii) Erg 11p'nin (lanosterol demetilaz) azollere afinitesinde azalma,

iii) Erg 11p'nin hücre sel içeriğinde artma,

iv) Ergosterol biyosentezinde rol alan sterol $\Delta 5-6$ desaturaz enziminin inaktivasyonu olarak sıralanabilir (5). Hücre içerisinde ilaç birikiminde azalma ya ilacın hücre içerisine alımında azalma ya da spesifik ilaç pompalarının fazla salınımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Erg11p'nin azollere afinitesinde azalma, 14α -demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* geninde ilaç bağlanmasını bozan yapısal değişikliklere yol açan nokta mutasyonlar ile olmaktadır.

Araştırmamızda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan flukonazole dirençli ve doza bağımlı duyarlı *Candida albicans* suşlarında sitokrom P450 14α -demetilaz enziminde değişikliklere yol açan *ERG11* genindeki nokta mutasyonlar saptanarak, elde ettiğimiz verilerin ışığında flukonazole dirençli ve doza bağımlı duyarlı suşlardaki direnç mekanizmaları belirlenebilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

M.Ö. dördüncü yüzyılda Hippocrates'in ağızdaki pamukçuğu tanımlaması ile *Candida* 'larla ilgili çalışmaların başladığı kabul edilmektedir (6).

1771'de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini bildirmiş, 1839'da ise Bernard Langenbeck tifolu bir hastanın ağızındaki afttan mantar soyutladığı halde bu etkenin tifo ile ilişkili olduğunu düşünmüştür (6,7).

1842'de Gruby tarafından Langenbeck'in soyutladığı bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğu bildirilmiştir. 1842'de Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturulup, bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmıştır (6,7).

1849'da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda olabileceğini göstermişlerdir (6,7).

1847'de Robin tarafından mantarın *Oidium albicans* olarak sınıflanması ile albicans ismi ilk kez kullanılmıştır. 1923'de Roth Berkhout eski Roma senatosunda giyilen beyaz cüppe için kullanılan *Candida* terimini önermiştir (6).

Antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940'lı yıllardan itibaren ise *Candida* infeksiyonlarının sıklığı artmış, konuyla ilgili gelişmeler hız kazanmıştır (6,7).

4.2. Genel Özellikler

Candida türleri, doğada sık rastlanan, vücudumuzda normal flora üyesi olarak yer alan, fırsatçı patojenler olup, bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında infeksiyonlara neden olurlar (7,8).

Candida 'lar; eşeyli üreme göstermeyen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* gibi *Deuteromycetes* sınıfı-*Cryptococcales* takımı içinde yer alanların yanı sıra; eşeyli üreme gösteren *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* gibi *Ascomycetes* sınıfı *Saccharomycetales* takımı içinde yer alanlarla yaklaşık 200 kadar tür içeren heterojen bir grup oluştururlar (8,9). *Candida* türleri içerisinde *C. albicans* predominant insan patojenidir (9).

Candida türleri ökaryotik, genellikle oval veya yuvarlağımsı olup, 3 ile 6 µm büyüklüğünde, tomurcuklanma ile üreyen maya mantarlarıdır (7,10,11). Tomurcuklanan bu hücreler blastokonidya adını alır ve büyüyerek hif formu oluştururlar. Blastokonidyalardan birbirlerinden ayrılmadan uzayıp aralarında boğumlar bulunan hücre zincirleri yaparlarsa yalancı hifleri oluştururlar (9,10). Gerçek hifler ise maya hücresi veya hifin bir dalından oluşabilir ve duvarları birbirine paralel olup, boğumlanma göstermezler (9,10). *C. glabrata* hariç, tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir (7,10). Çimlenme borusu (“germ tube”) testi, *C. albicans*’ın, diğer *Candida* türlerinden ayrılmasını sağlayan hızlı, kolay ve değerli bir testtir (12,13).

Candida’lar Gram pozitif boyanma özelliğindedirler (10). Sabouraud dekstroz agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C’de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli, uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat yada parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar (10,13,14)

4.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı

Candida hücreleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi cisimciğı, ribozom ve zar ile çevrili çekirdekten oluşur (15).

Hücre duvarı hücrenin şeklini koruyan, konak hücre ile etkileşimini sağlayan, geçirgen bir bariyerdir. Elektron mikroskopik çalışmalara göre hücre duvarı en az beş katmanlıdır. *Candida* türlerinin hücre duvar yapısı, karmaşık içeriklerinin yanı sıra maya formundan hif formuna değişim sırasında kitin içeriğindeki artış ile dikkat çekicidir (11).

Hücre duvar yapısının yaklaşık olarak %80-90 kadarı karbonhidrat, %6-25’i protein, %1-7’si lipidlerden oluşmaktadır (16). Karbonhidratlar, β-glukan, mannan ve kitindir. β-glukan dallanmış β-1,3 ve β-1,6 glukoz polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β-1,4 N-asetil glukozamin polimerlerinden oluşur. Hücre duvarının en önemli bileşeni mannopteinler olup, proteinlerle kovalan bağlar yapan mannoz polimerlerinden oluşur. β-1,6 glukozamin hücre duvar yapısının diğer bileşenleri için aracı rol oynarken, β-1,3 hücreye şeklini verir ve rijiditesini sağlar. Kitin ise hücre duvarının en az ancak önemli bir bileşenidir. Şekerler arasında yer alan hidrojen bağları ile bağlanmış uzunlamasına yapıları kitin molekülleri

mikrofibrilleri oluşturur. Maya hücrelerinde kısa zincirler olarak görülen bu mikrofibriller hücre duvarlarında uzun karmaşık zincirler olarak yer alırlar (16). Glikolipidler hücre duvar sentezi, sinyal ileti yolları ve hücre antijenleri olarak önemli işlevlere sahiptir (16).

Candida hücre membranı diğer ökaryot hücrelere benzer şekilde sterol içerir. Sterol içeriği ergosterol ve zimosterol olup, bunlardan ergosterol antifungal ilaçlar için önemli bir hedeftir (15,16). Ergosterol hücre membranının geçirgenliği, akışkanlığı, bütünlüğü için bir biyoregülatör olarak iş görür. Hücre bölünmesi ve büyümesinde önemli görevi olan kitin sentetaz gibi membrana bağımlı birçok enzimin fonksiyonu için de ergosterol önemlidir (5).

4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Candida türlerinin oluşturduğu infeksiyonların patogenezinde, konağa ait kolaylaştırıcı ve zemin hazırlayıcı faktörlerin yanı sıra, mantara ait virulans faktörlerinin varlığı oldukça önemlidir (17).

Konağın *Candida* türlerine karşı direnç faktörleri arasında, deri ve mukoza bütünlüğü, epidermal proliferasyon, fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları, lizozim, laktoferrin, doğal öldürücü (NK) hücreler, kompleman sistemi, T hücre bağımlı immunité, sitokinler, sıvısal immunité sayılabilir. Konağa ait zemin hazırlayan faktörler ise; cerrahi işlemler, protez kapakların kullanımı, kortikosteroid ve immün baskılayıcı sağaltımlar, peptik ülser, diyabet, AIDS, endokrin hastalıklar (hipoparatroidizm, adrenokortikal yetersizlik, Cushing hastalığı), yanık şeklinde sıralanabilir (17,18).

İnfeksiyona karşı direnç gelişiminde deri önemli bir rol oynar. Deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması deriyi invazyona duyarlı hale getirir. *Candida* hücreleri dermise invaze olup, dolaşıma girerlerse nötrofiller, monositler ve eozinofiller ile karşılaşılırlar (19,20). İnfeksiyona ilk tepkiyi monosit ve makrofajlardan ziyade nötrofiller verir. Nötrofillerin öldürme mekanizmaları superoksit, hidrojen peroksit, monokloramin gibi oksidatif maddeler aracılığı ile olabildiği gibi, defensin, laktoferrin, lizozim, azuridin gibi oksidatif olmayan granüller aracılığıyla da gerçekleşebilir. Yapılan çalışmalar, maksimal etki için bu mekanizmaların birlikte çalışması gerektiğini göstermektedir. Nötrofillerin fungusidal aktiviteleri için interferon γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi sitokinler kadar koloni sitümüle edici faktörler (CSFs) varlığına da gerek vardır. *Candida* infeksiyonlarında IL-1-IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 gibi sitokinlerin görev yaptığı bildirilmiştir (21). Monosit

ve eozinofiller, benzeri mekanizmalar ile *Candida* 'lara karşı savunma işlevlerini yerine getirmektedir. Trombositlerin antikandidal aktivitelerinin olduğu, lenfositlerin ise toksik maddeler salgıladıkları düşünülmektedir. Hücre duvarında bulunan mannan lenfosit yanıtını belirleyen en önemli komponenttir (21). Fagositik hücreler mannoz reseptörü, kompleman reseptörü (CR) ve Fc reseptörleri gibi reseptörler aracılığıyla *Candida* hücrelerini tanırırlar.

Candida 'ya karşı immün yanıt oluşumunda sıvısal faktörler önem kazanmakta olup, özellikle IgG sınıfı antikorlar üzerinde durulmaktadır. Sıvısal bağışıklık kadar *Candida* türleri üzerine inhibitör etkili olan çok sayıda maddenin önemi vurgulanmaktadır (7).

Candida virulans faktörleri, adezyon, biyofilm yapımı, toksinler, proteinazlar, fosfolipazlar, morfolojik değişim fenotip değişimi, hidrofobisite, moleküler benzeme, hücre duvarı yapısı ve çeşitli sideroforları kullanma yeteneği şeklinde sıralanabilir (17,18).

4.4.1. Yapışma (Aderans)

Kolonizasyon ve infeksiyonda ilk basamak olan aderans *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (22). İnsan infeksiyonları açısından *C. albicans*'ın en adheran tür olması önemlidir.

C. albicans hücrelerinin konağın epitel ve endotel hücrelerine tutunmasında iC₃b, C₃d, fibronektin ve östrojen reseptörleri, mannoptein, salgısal aspartik proteinaz, faktör 6 (antijen 6), laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinler gibi moleküllerin rolü bulunmaktadır (22). Çoğu *C. albicans* adezini glikoproteindir ve "agglutinin-like sequence" (Als) ailesi, Ala 1 ve Hwp 1'i içermekte ve 8 gen ile kodlanmaktadır. *ALS* genleri, üreme durumlarına bağlı olarak farklı şekillerde eksprese edilmektedir (23).

4.4.2. Biyofilm Yapımı ("Slime" Üretimi)

Candida türleri kateter, yapay eklem, protez kalp kapağı gibi medikal aletlerin yüzeylerine yapışıp biyofilm üreterek kolonizasyon ve infeksiyon oluşturabilirler. Ekstrasellüler bir polimer olan biyofilm oluşumu için mantarın "slime" faktörüne, konağın da fibrin ve fibronektinlerine gerek olduğu bildirilmektedir (24,25).

Biyofilm oluşturma yeteneği ile virulans arasında pozitif bir ilişki varlığı söz konusudur. Biyofilmler içine hapsolan etkenin antifungal ilaçlara daha dirençli oldukları ve infeksiyon için aracı rol oynadıkları bildirilmektedir (24-26).

“Slime” üretimi, özellikle *C. parapsilosis* için önemli bir virulans faktörü olup, kateter kaynaklı infeksiyonlarda yüksek oranda rol oynamaktadır (24,25).

4.4.3. Enzimler

Candida türlerinin dokulara penetrasyonunda rol oynayan önemli virulans faktörleri arasında hidrolitik enzimlerin salgılanması yer almaktadır. Hidrolitik enzimler arasında salgısal aspartik proteinaz, fosfolipaz ve lipaz aileleri önemli grupları oluştururlar.

4.4.3.1. Proteinazlar

Ekstrasellüler proteinazlar *C. albicans* kadar *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* tarafından da salgılanmakta olup, tanımlamak için salgısal aspartik proteinazlar (sap) terimi kullanılmakta sap terimi proteini, *SAP* ise proteini kodlayan 10 kadar geni ifade etmektedir (27).

SAP1, *SAP2*, *SAP3* genleri yalnızca maya hücrelerinde; *SAP4*, *SAP5*, *SAP6* ise hif yapılarında bulunmaktadır (23,27). *C. albicans* ile *C. dubliniensis*'in benzer sayıda *SAP* genleri taşıdıkları ve salgıladıkları proteinazların virulans için önemli olduğu bildirilmektedir (23,27).

C. albicans sap'larının doku penetrasyonu yanında konak yüzeylerine adansta da rol aldığı belirtilmektedir (27).

4.4.3.2. Fosfolipazlar

Son yıllarda *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojen mantarlarda virulans faktörü olarak önem kazanan ekstrasellüler fosfolipazlar, konak hücre membranındaki gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize ederek hasara yol açarlar.

Fosfolipaz enzimi etki mekanizmalarına göre A, B, C ve D ile lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz transaçilaz olarak sınıflandırılmış olup; bu türlerin tümü *C. albicans* suşlarında non-*albicans*'lara oranla daha fazla üretilmektedir (27,28).

Çeşitli çalışmalarda fosfolipaz aktivitesinin virulans ile ilişkili olduğu ve patolojik örneklerden soyutlanan suşlarda normal bireylerdekinden daha yüksek oranlarda fosfolipaz bulunduğu gösterilmiştir (29,30).

4.4.3.3. Lipazlar

Lipazlar hidrolitik enzimlerin diğer bir grubu olup, on üyeli bir gen ailesi tarafından kodlanırlar (*LIP 1-10*). Bu genlerin salınımı *invivo-invito* şartlarda oldukça değişken ve bağımsız olup, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarının lipaz aktivitesi gösterdiği ve bu genleri eksprese ettiği saptanmıştır (31). Ancak lipazların fonksiyonları henüz tam açıklığa kavuşmamış olup, konu ile ilgili araştırmalar halen sürmektedir (27).

4.4.4. Morfolojik Değişim

Candida türleri çeşitli koşullara bağlı olarak maya, çimlenme borusu, yalancı ve gerçek hif oluşturabilmektedir. Çimlenme borusu ve hif formlarının aderanslarının maya formuna göre daha fazla olduğu, özellikle doku invazyonunda gerçek ve yalancı hiflerin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (32,33).

Maya ve hif formunda üreyebilen *Candida* türleri polimorfik olarak tanımlanmaktadır. Maya-hif dönüşümü sırasında maya hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörler tarafından algılanan sinyaller (ısı, pH, aminoasitler gibi) hücre içine iletilir, hücre içinde cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelir. Oluşan iyon akımı sonucunda hif uzaması gerçekleşir. Hif formuna dönüşümün ilk basamağı ise çimlenme borusu ("germ tube") oluşumudur (18).

4.4.5. Fenotip değişimi

C. albicans hücrelerinde başlıca iki şekilde fenotipik değişim gerçekleşmektedir:

1) *C. albicans* kolonileri 10^{-1} - 10^{-4} sıklıkta, yıldız, şapka, düz, pürtüklü, düzensiz, kırık ve tüylü gibi farklı fenotipler arasında değişim göstermektedir (18).

2) W-O değişimi şeklinde gerçekleşen değişim ise yuvarlak-oval, tomurcuklu beyaz ("white") faz hücrelerinin; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürtüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük opak ("opaque") faz hücrelerine dönüşümü şeklindedir (34).

Fenotipik değişimin in vivo şartlar altında antifungal ilaçlara direnç gelişiminde etkili olduğu belirtilmektedir (35).

4.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Mayaların, patogenezi esnasında hidrofobik proteinlerini hücre duvar yüzeyinde eksprese ettikleri ve konak hücresi ile hidrofobik ilişkiye girdikleri saptanmıştır (36).

4.4.7. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği

Sideroforlar, demiri depolandığı dokudan veya transferrinden alan, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. *Candida*'lar, üremeleri için gerekli olan demiri, diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya Enterobacteriaceae ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedirler (37).

4.5. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar çeşitli infeksiyonlara yol açabilirler. İnfeksiyonlar klinik olarak kutanöz ve mukozal, kronik mukokutanöz ve sistemik kandidoz olmak üzere başlıca üç tipte incelenmektedir (17).

4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Kutanöz *Candida* infeksiyonları genellikle doğal olarak oluşmakta ve travma, diabet, AIDS, gebelik, genç veya ilerlemiş yaş, doğum kontrol hapları, kortikosteroidler veya antibiyotiklerle sağaltım, kan glukoz düzeyinin yüksekliği, hücrel immün yetmezlik, endokrin dengesizlik ve derinin uzun süre nemli kalması gibi bazı koşullar nedeniyle artış göstermektedir (11).

4.5.1.1. Ağız Kandidozu

Ağız kandidozu, daha sık olarak ağız mukozası, diş etleri, damak gibi mukozal yüzeyler üzerinde kremi, beyaz renkte kaldırılabilen, ağrılı psödomembranöz plaklar şeklindedir (38). Oral kandidozun günümüzde AIDS'li hastaların hemen hemen %100'ünde görülen AIDS'i tanımlayıcı bir durum olduğu bilinmektedir (12).

4.5.1.2. Özefagus Kandidozu

En sık disfaji, yutma sırasında tıkanma hissi ve göğüs ağrısı semptomlarına yol açar. Kesin tanı endoskopi sırasında alınan biopsiden *Candida*'nın soyutlanmasıyla konulmaktadır (38).

4.5.1.3. Sindirim Sistemi Kandidozu

Gastrointestinal sistemde mide tutulumu, özefagustan sonra ikinci sıklıktadır. Burada lezyonlar tek veya multipl ülserler ile karakterizedir.

4.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz

Vulvovajinal kandidoz, en sık görülen klinik formlardan biridir. Vulvovajinal kandidozların %80'ininden *C. albicans* sorumludur. Onu *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izlemektedir. Sağlıklı kadınların %10-20'sinde *Candida* türleri vajinada normal flora üyesi olarak bulunmaktadır (7,38).

4.5.1.5. Deri Kandidozu

Deri kandidozu, derinin koltuk altı, kasık, meme altı gibi daha çok sıcak ve nemli kat yerlerinde görülür. *Candida* türleri, tırnak ve tırnakla birlikte çevresindeki yumuşak dokuyu da infekte ederek onikomikoz ve paroniki'ye neden olurlar (7,38).

4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz; deri, müköz membranlar, saç ve tırnaklarda *Candida* türlerinin oluşturduğu kronik persistan bir enfeksiyondur. Bu hastalık, endokrinopatiler, timoma, infeksiyöz hastalıklar, vitiligo, alopesi ve otoimmün hastalıklar ile sıklıkla birlikte olabilmektedir (7,11,38).

4.5.3. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz, kandidemiyi izleyen bir tablodur. Kandidemi, kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın, enfeksiyon belirti ve bulguları olan bir hastada en az bir yada daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi anlamına gelmektedir (10,17). İnfeksiyonun en sık yerleştiği bölgeler; kalp (perikardit, miyokardit, endokardit), meninksler (menenjit), idrar yolu (üretit, sistit), deri, göz, karaciğer ve dalaktır (10).

Hastane enfeksiyonları arasında da fungusların ve özellikle bunlardan *Candida* enfeksiyonlarının ayrı bir önemi söz konusudur. Hastane kökenli kandidoz etkeni olarak en sık görülen türün *C. albicans* olduğu, bunu non-*albicans Candida* türlerinden *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın izlediği bildirilmektedir (10).

4.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida enfeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, eksüda, solunum yolu örnekleri, doku biyopsi örnekleri, ağız ve vagen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri örnekleri sayılabilir (39). *Candida* enfeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için;

- i) Klinik örneklerin direk mikroskopik bakısı
- ii) Kültürden *Candida* türlerinin soyutlanması

iii) Organizmanın tür düzeyinde tanımlanması

iv) Dokuda bulunan *Candida* türlerinin histopatolojik olarak saptanmaları gerekmektedir (40,41).

4.6.1. Direkt Bakı ve Kültür

Klinik örneklere uygulanacak ilk işlem direk bakıdır. Direk bakı için yaş preparat hazırlanabildiği gibi %10'luk potasyum hidroksit, Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi, kalkoflor beyazı gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar da kullanılabilir. Doku örneklerindeki *Candida*' ların araştırılmasında ise periyodik asit-schiff (PAS), methanamin gümüş boyaları kullanılmaktadır (41,42).

Candida türleri için önerilen primer izolasyon besiyerleri SDA, sikloheksimit gibi antimikotik ve kloramfenikol-gentamisin gibi antibiyotikler eklenmiş SDA, inhibitör mold agar, koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar olup, SDA en sık kullanılanıdır. SDA besiyerine ekilen örnekler 30°C de inkübe edilir. *Candida* türleri genellikle 24 saat içerisinde düzgün yüzeyli, hafif kubbeli, beyaz krem renkli, 1-2 mm çapında, tereyağ kıvamında maya kokulu koloniler oluşturur. *C. albicans* koyun kanlı agarda yıldız şeklinde saçaklı koloniler oluşturur (12,13,39).

Kültürde üreyen maya kolonilerinin tanımlanmasında kullanılan en basit ve hızlı test çimlenme borusu testidir. Bu test için az bir miktar koloni ile 0.5 ml insan veya tavşan plazması/serumu bir tüp içerisinde süspanse edilip, 35°Cde 3 saati aşmamak koşuluyla inkübe edilir. Bu süre sonunda lama damlatılan bir damla ile lam-lamel preparatı hazırlanır ve mikroskopta incelenir. Çimlenme borusu maya hücresinden boğumlanmadan çıkan, kenarları birbirine paralel, boyu maya hücresinin üç dört katı kadar, genişliği maya hücresinin yarısı kadar olan bir uzantı şeklinde tanımlanabilir (12,43).

C.albicans ve *C. dubliniensis*'in çimlenme borusu testi pozitifdir (8). İmmun yetmezlikli ve antifungal sağaltım alan hastalarda veya testin uzun inkübasyonu nedeniyle yanlış negatif sonuçlar alınabilir (8). *C. tropicalis* hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcuttur ve blastokonidyaları *C. albicans*'inkilerden daha geniştir (12,43).

Daha ileri tanımlama için mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlarda lam kültürü yöntemi uygulanır. Mısır unu-tween 80 agar oda ısısında 48-72 saat inkübe edilir (14). Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlamaya gidilir (12,14).

C. albicans gerçek ve yalancı hifler, yalancı hiflerin çevresinde kümeler oluşturmuş blastokonidyalar ile terminal klamidosporlar oluştururlar (10,14).

C. tropicalis yalancı hifler boyunca, tekli veya küçük düzensiz kümeler halinde az sayıda blastokonidya üretimi ve nadiren yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, göz yaşı damlası şeklindeki hücreler oluşturur (10,14).

C. guilliermondii az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri oluşturur, gerçek hif üretmez (10,14).

C. parapsilosis kısa yalancı hifler boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler halinde dizilmiş blastokonidyalar ve nadiren dev hücreler olarak isimlendirilen büyük hifler üretir (10).

C. krusei ağaç benzeri bir görünüme sahip uzamış blastokonidyalar ve yalancı hifler oluşturur (10).

C. glabrata oval ve uçlarından tomurcuklanan maya hücreleri üretir, yalancı hif oluşturmaz (10).

C. kefyr tipik olarak bir derede yüzen kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturur (10).

Bazı *Candida* türlerinin soyutlanması ve tanımlanması için kromojenik besiyerleri kullanılır. Bu amaçla kullanılan CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, Fransa), *Albicans* ID2 agar (AID; bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), *Candida* ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), Candiselect medium (Sanofi Diagnostics, Marnes-La-Coquette, Fransa), BiGGY agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere), Fluoroplate *Candida* (Merck, Almanya), Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur), Murex *Candida albicans* (Murex Diagnostics, A.B.D.) gibi çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bu besiyerlerinde tanı, türe özgü ekzoenzim aktivitesi ile çeşitli kromojenik substratların parçalanması sonucu

farklı kromojenik ayrışma ürünlerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu temeline dayanmaktadır (43,44). Adı geçen besiyerleri içinde özellikle CHROMagar *Candida* ile *Albicans* ID2 ve *Candida* ID agar'ın başta *C. albicans* olmak üzere bazı non-*albicans Candida* türlerini de duyarlı ve özgül bir şekilde tanımlayabilen basit ve değerli besiyerleri oldukları bildirilmiştir (45-47).

Candida türlerinin tanımlanması için kullanılan metabolik testler arasında karbonhidrat asimilasyon, karbonhidrat fermentasyon ve üreaz testleri gibi testler bulunmaktadır. Karbonhidrat asimilasyon testleri mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılır ve oksijen varlığında karbon kaynağı olarak, özel bir karbonhidratı kullanabilme özelliğine dayalı testlerdir. Karbonhidrat asimilasyonu ve/veya enzim saptama amacıyla Bacti-Card *Candida* (Remel Laboratories, Kanada), Murex *C. albicans*-50 (Murex Diagnostics, Norcross A.B.D.) ve *Albicans*-sure (Clinical Standards Laboratories, Rancho Dominguez, A.B.D.) API 20C AUX (bioMeriux-Vitek, Fransa), API *Candida* (bioMeriux, Fransa), Uni-Yeast-Tek kit (Remel Laboratories, Kanada) ve Microscan Yeast Identification Panel (Baxter-MicroScan, West Sacramento, A.B.D.) gibi ticari testler bulunmaktadır. Bu testler belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki turbidite artışını veya renk üretimini kullanırlar (13,44). Bu testler içerisinde API 20C AUX en yaygın kullanılanı olup, 48-72 saatte sonuç vermektedir (44).

4.6.2. Serolojik Tanı

Tüm dünyada hızla artan invaziv fungal infeksiyonlar ve geniş sağaltım seçenekleri nedeniyle *Candida* infeksiyonlarına tanı konulması giderek daha çok önem kazanmaktadır. Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tanısında kullanılmak üzere çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir. Bu amaç için *Candida* türlerine özgü antijenler, antikorlar veya metabolitlerin saptandığı testler söz konusudur (48,49).

4.6.2.1. Antijen Saptayan Testler:

Sistemik kandidoz tanısı için hücre duvar antijenleri ve sitoplazmik antijenler aranmaktadır. *C. albicans* tarafından üretilen sap indüklenebilir bir enzim olup, kandidoz tanısında kullanılabilen bir antijendir. *C. albicans* sitoplazmik proteinleri 90 kDa'luk ısı şok

proteinin (HSP 90) yıkım ürünü olan 47 kDa'luk bir protein ile daha sonraları bir enolaz olduğu saptanan 48 kDa'luk bir proteinden oluşur. Bu proteinler tanı amacıyla olguların serumlarında aranabilmektedir. Bu antijenleri saptamak için bir lateks aglütinasyon ticari testi olan CAND-TEC (Ramco Laboratories, Inc., Houston, A.B.D.) üretilmiştir. Tanımlayıcı diğer bir antijen, *C. albicans*'ın temel hücre duvar mannopteini olan mannan'dır. Sağlıklı bireylerde antimannan antikoru tarafından serumdan hızla temizlendiğinden düşük konsantrasyonlarda saptanabilir. Sistemik kandidozlu olgularda, serumda dolaşan mannan antijenlerini saptamak için radyo immün assay (RIA), enzim immün assay (EIA), lateks aglütinasyon (LA) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Mannanemi altta yatan hastalığa, örnekleme sıklığına, immün yetmezliğin derecesine, ilgili *Candida* türlerine, sistemik kandidozun tanımlanmasına, bağlayıcı antikorumun titresine, özgüllüğüne ve kullanılan test yöntemine göre sistemik kandidozlu hastaların yaklaşık %31 ile %90'ında görülmektedir (41,44,48,50).

Kandidoz tanısında olgularda aranan bir diğer antijen de fungal hücre duvarının bir parçası olan (1-3)- β -D-glukan'dır. (1-3)- β -D-glukan'ın *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida* gibi funguslarda bulunup, türe özgül olmaması nedeniyle invaziv kandidoz tanısı için kısmen yararlı olduğu düşünülmektedir. Ancak yine de kısa sürede sonuç elde edilebilmesi, bu testleri tarama testi olarak cazip hale getirmektedir (50). (1-3)- β -D-glukan'ın *Zygomycetes* hariç tüm fungusların karakteristik bir hücre duvar bileşeni olması nedeniyle glukanın kan ve diğer steril vücut sıvılarında saptanabilmesi sistemik fungal infeksiyon için iyi bir belirleyici olmaktadır. Saeki ve ark.'nın (51) bir çalışmasında *Candida* türleri açısından kan kültürleri pozitif olan hastaların serumlarında β -D-glukan %93'ün üzerinde duyarlılık ve özgüllük ile saptanmıştır.

Tekrarlayan serum örneklerinde test sonuçlarının değerlendirilmesi önerilmekte böylece antifungal ajanların gereksiz kullanımlarının engellenebileceği düşünülmektedir. *Candida* antijenlerinin saptanmasına yönelik testler önemli bir tartışma alanı oluşturmakta ancak yıllardan beri özgün bir test önerilememektedir (52).

4.6.2.2. Antikor saptayan testler

Antikor saptayan testlerin immün yetmezlikli hastalarda düşük düzeyde antikor varlığı nedeniyle yalancı negatif, yüzeysel kolonizasyonlu hastalarda antikor titrelerinin yüksekliği nedeni ile yalancı pozitif sonuçlara yol açabildiğinden tanı değeri sınırlıdır. İmmün

yetmezlikli hastalarda antikor üretimi, değişken olduğundan ya da hiç olmadığından sistemik kandidoz tanısında daha az yararlı; antijen salınımı fazla olduğundan antijen varlığının saptanması tanı için daha değerli olarak kabul edilmektedir (44). 1980'den sonraki çalışmalarda, saflaştırılmış antijenler ve insan serumunda antikor saptayan RIA, EIA ile özgün antijenlere karşı antikorların kantitasyonuna kadar değişen pek çok yöntem kullanılmıştır (44,53). Saflaştırılmış antijenler esas olarak hücre duvarından ve *C. albicans* blastokonidya ve çimlenme borularının sitoplazmalarından elde edilir. *C. albicans* hücre duvarı içeriğinden altı farklı tip (I-VI) antijen tanımlanmıştır. Bu antijenlerden bir tanesi mannan olup, kanda *Candida* hücrelerinin sayıları arttıkça antimannan antikorlar da artış göstermektedir. Deventhar ve arkadaşları (54) immun yetmezlikli hastalarda mannan antikorlarının hemaglutinasyon inhibisyon testi ile duyarlılıklarını %64 özgüllüklerini %86 bulurken; Sendid ve arkadaşları (55) benzeri bir çalışma sonucunda duyarlılığı %53, özgüllüğü %94 olarak saptamışlardır. Çimlenme borusu antijenleri infektif dokudaki *C. albicans* filamentöz fazı ile ilişkili olduğundan doku invazyonu sırasında bu antikorların (CAGT) saptanması invaziv kandidoz için yararlı bulunmuştur. İnvaziv kandidoz riski taşıyan hastalardan alınan ardışık serumlarda mikrobiyolojik tanı konulmadan önce CAGT'ın gösterilmesi tanı koydurucu olarak kabul edilmektedir (56).

İnvaziv kandidoz olgularında hasta serumlarında *C. albicans*'ın 54.3 kDA, 52 kDA, 47 kDA, 44 kDA'luk sitoplazmik antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar araştırılmaktadır. 47 kDA antijeni enolaz enziminin substratı olup, iyileşmekte olan invaziv kandidoz olgularında bu antijene karşı belirgin antikor yanıtı oluşmasına karşın fatal seyirli olgularda yanıt yok yada çok az olarak saptanmaktadır (57).

Na ve Song (58) sap'a karşı oluşan antikorların invaziv kandidoz olgularında duyarlılık ve özgüllük oranlarını %70 ve %76 olarak belirlemiş ve tanı için değerli olmadığı sonucuna varmıştır.

İnvaziv kandidoz tanısı için antikor testlerinin kullanımlarında bir azalma söz konusu olmakla birlikte immun yetmezlikli hastalar için halen tanı değerini korumaktadır (59).

4.6.2.3. Kombine Testler

Bazı araştışıcılar yaygın kandidoz tanısı için kombine uygulanan antijen-antikor testlerinin yararlı olduğunu savunmaktadırlar (55). İnvaziv kandidozlu bir grup hastada kan kültürleri ile birlikte antijen ve antikor saptayan testler kullanılmış hastaların %73'ünde en az bir pozitif kan kültürü ile birlikte, testlerden bir veya iki tanesi pozitif bulunmuş, hastaların bazılarında ise kan kültürleri pozitif olmadan 15 gün önce serolojik testlerin olumlu olduğu saptanmıştır. Eř zamanlı olarak antijen-antikor testleri ile kan kültürlerinin çalışılmasının tanı için daha yararlı bulunduğu belirtilmiştir (49).

Antijen-antikor testlerinin birlikte kullanıldığı retrospektif bir çalışmada ise 43 hastadan alınan 162 serum örneğinde, *C. albicans* mannan serum antijenini saptayan test ile, duyarlılık ve özgülük %40 ile % 98 olarak saptanmakta, yalnızca antikor testi ile bu değerler sırasıyla %53 ve 94 bulunurken, antijen ile antikor testi kombine edildiğinde duyarlılık ve özgülük %80 ve %53 olarak belirlenmektedir (55). Bu nedenle invaziv kandidoz tanısı için kombine olarak mannan antijen ve antikorlarını saptamanın daha yararlı olduğu kabul edilmektedir (51,55).

4.6.2.4. Metabolit saptayan testler

Kimyasal bir metabolit olan D-arabinitol *C. krusei* ve *C. glabrata* dışında bir çok *Candida* tarafından üretilmekte olup, serumda veya idrarda ölçülmesi fungal metabolizmadaki değişikliklerin bir göstergesi olarak kabul edilir. Gaz-likid kromatografisi yöntemi ile idrarda D-arabinitol/L-arabinitol oranında artış saptanmasının nötropenik hastalarda infeksiyon göstergesi olduğu bildirilmiştir (44). Serumda D-arabinitol saptanması için ise daha gelişmiş tekniklere gereksinim duyulmaktadır.

4.6.3. Deri testleri

Kandidin gibi *Candida* ekstrelerinin deri-içi injeksiyonu ile gerçekleştirilir. Normal sağlıklı kişilerin %94'ünde, 48 saat sonra 10 mm çapında bir endürasyon ortaya çıkar. Bu tip reaksiyonlar geçirilmiş ya da subklinik infeksiyonları gösterir. Deri testinde *Candida* antijenlerine yanıt vermeyen kişinin yetersiz immüniteye sahip olduğu varsayılır (60).

4.6.4. Moleküler Tanı

Son yıllarda özellikle hastanede ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan immun suprese, organ nakli yapılmış, altta yatan hastalığı olan riskli hasta gruplarında fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığında artış gözlenmektedir (61,62). Bu nedenle *Candida* infeksiyonlarının erken dönemde tanınması ve uygun antifungal sağaltıma başlanması önem kazanmıştır (63).

Moleküler tanı yöntemleri; tanı yanında cins veya tür düzeyinde *Candida*' ların tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (64).

Moleküler tanı yöntemleri hibridizasyon "probe"larının kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki gruptur (65).

4.6.4.1. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri

4.6.4.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZT)

Bu amaçla özgül bir gen bölgesine uç kısımlarından homolog olan dizgilerden oluşmuş bir çift sentetik oligonükleotid öncül (primer) ve termostabil *Taq* DNA polimeraz kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. Amplifikasyon için kullanılan hedef gen bölgeleri, 18S, 28S, 5.8S rDNA alt ünitelerine ait tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı, iyi korunmuş bölgelerin genleri ile "internal transcribe spacer" (ITS1, ITS2), sitokrom p450 lanosterol 14-alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz, ısı şok proteinini kodlayan gen bölgeleri olarak sayılabilir (65). Ayrıca rRNA genleri içerdikleri korunmuş ve değişken bölgeleri ile filogenetik analizler için uygun hedef bölgelerdir.

Einsele ve arkadaşlarının (66) yaptıkları bir çalışmada mantar kolonizasyonu olan ve olmayan febril nötropenili hastalarla, kanıtlanmış invaziv fungal infeksiyonlu olgular ve sağlıklı gönüllülerden kan örnekleri alınıp, 18SrRNA gen bölgesine yönelik PZT uygulanmıştır. Yöntem ile saptanabilen en düşük mantar miktarı 1 koloni oluşturan ünite

(KOU)/ml kan olup, her olguda tek örnek çalışıldığında, duyarlılık %88, birden fazla örnek çalışıldığında %98 olarak bulunmuştur

Risk grubunda bulunan hastalar için daha kısa sürede sonuç alınan PZT yöntemi ile erken tanı konulup uygun sağaltıma başlanması çok önemlidir. Kültüre dayalı yöntemlerle örneklerin çoğunda *Candida* saptanması için 48 saat tür tanımlaması için genellikle ek bir 48 saat daha gerekmektedir. PZT ile ise daha kısa sürede sonuca ulaşıldığı bildirilmektedir (64, 67-69).

Hızlı ve duyarlı olma özelliğine karşın PZT kullanılan malzemenin nispeten pahalı ve tekniklerin komplike oluşu, çok sayıda örneğe birden uygulanamaması gibi nedenler ile halen; kültür ve serolojik tanı gibi geleneksel uygulamaların önüne geçememiştir (64,65).

Günümüzde ('real-time') gerçek zamanlı PZT veya daha yeni floresan teknolojileri olan floresan enerji transferi gibi yöntemler ile bir saatten kısa sürede sonuç alınabilmekte ve kontaminasyon önlenmektedir (65).

4.6.4.1.2. Sekanslama (Dizi Analizi)

Mantarların alternatif bir tanımlama yöntemi nükleik asit dizi analizi yöntemi olup, kültürde üremiş mantarların tanımlanması veya kan, doku gibi örneklerde etken olan mantarların tanımlanması amacıyla kullanımı gittikçe daha çok önem kazanmaktadır (65) Geniş kapsamlı PZT ve dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi veri tabanından bilinen diziyile karşılaştırılır ve tanımlama yapılır. Yöntem teknik olarak karmaşık olup, gelişmiş laboratuvar olanakları gerektiren, pahalı bir yöntemdir. Ancak gelecekte kullanımı artacak ümit verici bir teknik olarak güncelliğini korumaktadır (65).

Dizi analizi verileri ile mantarların tanımlanması ve diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi belirlendiğinde sağaltım için antifungal ilaçların seçimi akılcı olarak yapılabilmektedir (70).

4.6.4.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri

Nükleik asit hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı bu yöntemler kültür doğrulaması için mikoloji labotatuvarlarında sık kullanılmaktadır. Mantarların tanımlanması için hazırlanmış

ticari genetik problemler özellikle kültürde üremiş küflerin tanımlanmasında tanı değeri bulmaktadır.

Sonuç olarak; *Candida* infeksiyonlarının moleküler tanısı için değişik yaklaşımlar uygulanabilmektedir. Tek başına kullanılabilen referans bir yöntem bulunmamakta; bu nedenle iki veya daha fazla yöntemin birlikte kullanılması önerilmektedir (64).

4.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç

Fungal infeksiyonlardaki artışa paralel olarak sağaltım amacıyla antifungal ilaçların kullanımındaki artış beraberinde antifungal direnç gelişimi sorununun gündeme getirmiştir (5, 71-73).

Antifungal direnç; geniş anlamı ile antifungal sağaltımdaki başarısızlık olarak tanımlanabilir (74,75). Direnç klinik ve mikrobiyolojik direnç şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Klinik direnç; bir infeksiyonun etkeni olan fungusun, laboratuvar deneylerinde tamamen duyarlı olduğu bulunan bir antifungal ilaç ile sağaltılmasına karşın infeksiyonun ilerlemesi veya relaps göstermesi olarak açıklanabilir. Mikrobiyolojik direnç ise primer yada intrensek ve sekonder yada kazanılmış direnç olarak karşımıza çıkar. Primer direnç *invivo* veya *invitro* şartlarda ilaç ile karşılaşmadan önce bulunan direnç; sekonder direnç ise ilaç ile karşılaştıktan sonra ortaya çıkan direnç olarak belirtilebilir (75,76).

Günümüzde sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılan antifungal ilaçlar; polyenler, azol türevleri, pirimidin sentez inhibitörleri, allilaminler, hücre duvar inhibitörleri ve yeni antifungaller olarak sayılabilir (72-74).

4.7.1. Polyenler

4.7.1.1. Amfoterisin B

Streptomyces nodosus'dan elde edilen bu ilaç fizyolojik pH'da suda çözünmediğinden, deoksikolat olarak hazırlanan parenteral formülleri kullanılmaktadır (77).

Nefrotoksik yan etkilerinden dolayı bu etkilerinin azaltılıp, ilaç etkinliğini arttırmak amacıyla lipid formülasyonlar geliştirilmiş ve klinik kullanıma sokulmuştur (77,78).

Amfoterisin B (AmB) ve lipid formülleri fungal hücre membranındaki esas sterol olan ergosterole bağlanarak osmotik dengeyi etkiler. Bağlanmayı hücre içi potasyum, magnezyum, şekerler ve metabolitlerin kaybı izler ve sonunda hücre ölümü gerçekleşir. AmB memeli hücrelerindeki kolesterole de bağlanmakta ancak fungal hücrelere göre daha az afinite göstermektedir (78). Ek olarak oksidatif hasara yol açarak *Candida*' lara karşı fungisidal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (77).

AmB *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri ve *Zygomycetes* sınıfındaki bir çok patojen fungusa karşı etkilidir. *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Aspergillus terreus* AmB'ye intrinsek dirençlidir. Bunun yanında hem *Candida* hem *Cryptococcus* türlerinde sekonder direnç bildirilse de nadir olarak görülmektedir (77).

AmB'ye karşı sekonder direnç gelişimi membran lipidleri ve özellikle steroidlerin değişimi ile ortaya çıkmaktadır. Ergosterol biyosentez basamağında yer alan $\Delta 5-6$ desaturaz enziminde oluşan değişiklikler nedeniyle ergosterolün bulunmadığı ve diğer sterollerin biriktiği durumlarda ise sekonder direnç gelişimi söz konusu olmaktadır (79,80). Diğer direnç mekanizmaları ise hücre membranının ergosterol içeriğinde azalma ve katalaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak oksidatif hasarın azalması olarak sayılabilir (79,80).

AmB'nin en ciddi yan etkisi nefrotoksisitesidir. Akut yan etkileri ise ateş, döküntü, myalji, hipotansiyon, bronkospazm şeklindedir (77).

4.7.1.2. Nistatin

Sistemik mantar infeksiyonları için uygun diğer bir polyen antifungal olan lipozomal nistatin ile ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir (74).

4.7.2. Azol Türevleri

Azoller, yüzeysel ve sistemik mantar infeksiyonlarının sağaltımında yaygın olarak kullanılan antifungallerdir. İlk olarak 1960'ların sonunda sentetik azol bileşikleri kullanıma girmiş olup, gittikçe artan sayıları ile önemli bir antifungal grubu oluşturmaktadırlar. Azol halkasında iki yada üç azot bulunmasına göre imidazoller (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol) veya triazoller (itrakonazol, flukonazol, vorikonazol) olarak sınıflandırılır. Geliştirilmekte olan yeni kuşak azoller ise posakonazol, ravukonazoldür (74,80).

Azoller, lanosterolün ergosterole dönüşümünde rol oynayan 20 kadar enzimden bir tanesi olan sitokrom P-450 bağımlı C14 α -demetilazı (Erg11p, lanosterol demetilaz) inhibe ederek fungistatik etki gösterirler. Lanosterol demetilazın substratı mayalarda lanosterol, küflerin çoğunda ise eburikoldür. Enzimi kodlayan gen mayalarda *ERG11*, küflerde *CYP51* olarak isimlendirilmektedir.

Azollerin primer hedefi olan bu enzimin inhibisyonu, enzimin aktif kısmında yer alan hem molekülünün içersindeki demir atomu ile azollerin nitrojen atomunun bağlanması sonucu gelişir. Böylece lanosterolün demetilasyonu için gereken oksijenin aktivasyonu engellenerek ergosterol yapımı bozulur ve 14 α metillenmiş steroller gibi sterol prekürsörleri birikerek, yapısı ile fonksiyonu değişmiş bir plazma membranı oluşur (74,80). Buna ek olarak azollerdeki diğer nitrojen atomu lanosterol demetilazın apoproteini ile direkt olarak ilişkiye girer ve bu nitrojen atomunun pozisyonuna göre azollerin enzime olan afinitesi değişebilir (5).

Azollerden ketokonazol oral olarak kullanılan ilk imidazol olup, *Candida* türlerine karşı etkili olmasına rağmen diğer azollere göre etkisi sınırlıdır (77). Ketokonazolün ciddi yan etkileri söz konusudur. Bunlar; hepatotoksisite, kusma, fotosensitivite, testesteron ve kortizol düzeylerinin düşmesi olarak sayılabilir (5,77).

İtrakonazol sadece oral olarak kullanılabilen bir bileşik olup, birçok *Candida* türüne ve flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata*'ya karşı etkilidir. Ketokonazol gibi itrakonazol de yağ dokusu ve eksüdalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu halde BOS'a geçişi zayıftır. En önemli yan etkileri hepatotoksisite ve ödemdir (81).

Flukonazol, oral ve parenteral olarak kullanılabilen, gastrik pH'dan etkilenmeyen, proteine az oranda bağlanma ve düşük lipofilik özellik göstermesi nedeniyle vücut sıvılarında ve BOS'da dağılımı iyi olan bir triazol bileşigidir. Böbreklerde metabolize olur ve %80'i değişmeden idrarla atılır. Sayılan bu özellikleri nedeni ile 15 yıldan beri mukozal ve invaziv kandidozlu olguların korunma ve sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır (82–84).

C. krusei flukonazole intrensek dirençlidir. Bazı *C. glabrata* izolatları flukonazole doza bağımlı duyarlı iken, %15 kadarı gerçek direnç göstermektedir. *C. tropicalis*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis* ve *C. inconspicua* izolatlarında genellikle yüksek flukonazol minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmaktadır. Flukonazole kazanılmış direnç başta *C. albicans* olmak üzere çeşitli *Candida* türlerinde gözlenmiştir (77).

Vorikonazol, *C. albicans* ve *A. fumigatus* ergosterol P-450 bağımlı C14 α -demetilaz enzimlerini flukonazole göre sırasıyla 1.6 ve 160 kat daha fazla oranda inhibe etmektedir. *C. albicans* ve *C. krusei* üzerinde yapılan çalışmalar, vorikonazolun ergosterol sentezini doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini ve bu açıdan flukonazolden daha etkili olduğunu göstermiştir. Oral ve parenteral alınabilen vorikonazol hızlı etkili olup, bioyararlanımı %90 civarındadır. Yan etki olarak görme bulanıklığı ve geçici transaminaz yüksekliği sayılabilir. AmB, flukonazol, itrakonazol gibi standart antifungal sağıaltımlar ile kıyaslandığında daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (81).

Posakonazol yapısal olarak itrakonazole benzer ve *Candida* spp başta olmak üzere bir çok fungusu karşı vorikonazolden daha fazla etkilidir. Özellikle *Aspergillus* spp.'ye itrakonazolden daha etkili bulunmuştur (74).

Ravukonazol en son geliştirilen azol türevi olup, invitro şartlarda *Candida* ve *Aspergillus* türlerine oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (74).

Azol türevlerine direnç farklı mekanizmalar ile gelişebilmektedir. Bu mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir:

- i) Hücre içinde ilaç birikiminde azalma
- ii) Erg 11p'nin (lanosterol demetilaz) azollere afinitesinde azalma
- iii) Erg 11p'nin hücresel içeriğinde artma
- iv) Ergosterol biyosentezinde rol alan sterol Δ 5-6 desaturaz enziminin inaktivasyonu (74,80,82).

i) Hücre içinde ilaç birikiminde azalma, ilacın hücre içine alımında bozukluk veya ilacın aktif pompalar ile atımının artması sonucu meydana gelmektedir (74). Hücre membran sterollerindeki ve/veya fosfolipidlerindeki değişim nedeni ile membran permeabilitesinde değişim ve dolayısıyla hücre içine ilaç alımında azalma ortaya çıkmaktadır (79). Ancak azollerin hücre içine alınması pasif difüzyon ile gerçekleştiğinden esas sorumlu mekanizmanın spesifik ilaç pompa sistemlerinin aşırı salınımı olduğu bildirilmektedir (74,85).

Funguslarda ATP bağlayan kaset ("ATP binding cassette" (ABC)) süper ailesi ve major kolaylaştırıcı ("major facilitators" (MFs)) süper ailesi olmak üzere iki tip aktif atım

pompa sistemi mevcuttur (86). ABC sistemi ATP hidrolizi, major kolaylaştırıcılar ise proton gradienti yoluyla gereken enerjiyi sağlar.

MFs'ler arasında bulunan *MDR1* (BENr, benR) geni flukonazol için özgül olup, *CDR1* ve *CDR2* ise ABC süper ailesinin başlıca genleridir (87,88). *CDR1* aşırı salınımının flukonazol, itrakonazol, ketokonazol gibi azollere çapraz dirence neden olduğu bildirilmektedir (74). *C. albicans* suşlarında flukonazol direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görüleni çoklu atım pompa taşıyıcılarının fazla yapımıdır (89).

Son yıllarda yeni bir MFs geni olarak bulunan *FLUI* geninin azol direnci ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (74).

ii) Erg 11p'nin azollere afinitesinde azalma: Hedef enzim C14 α -demetilaz (Erg11p)'yi kodlayan *ERG11* geni ile ilişkili olarak iki şekilde direnç gelişimi söz konusudur. Bunlardan bir tanesi, meydana gelen nokta mutasyonlar nedeniyle ilaç ile enzimin bağlanmasını bozan yapısal değişikliklerin ortaya çıkması ve buna bağlı olarak ilacın Erg11p'ye afinitesinin azalmasıdır.

Azol dirençli *C. albicans* suşlarında şimdiye dek toplam 83 amino asit değişimi bildirilmiştir (74,90). Direnç ile ilişkilendirilmiş nokta mutasyonlar: F72L, F105L, F126L, Y132H(F), F126L, K143R, K143E+T229A, T315A, G464S, S405F, R467K, G450E, olarak sayılabilir (90–92).

iii) Erg 11p enzimini kodlayan *ERG11* geninin aşırı ekspresyonu hücre içi Erg11p'de artışa ve ketokonazol, itrakonazol gibi azollere karşı çapraz direnç gelişimine neden olmaktadır. Bir çalışmada orofaringeal kandidozlu AIDS hastalarından soyutlanan flukonazole dirençli *C. albicans* izolatlarının %35'e yakınında *ERG11* ekspresyonunda artış ve buna bağlı olarak direnç gelişimi saptanmıştır (87,88).

Ek olarak *ERG* genlerinin düzenlenmesinde bir koordinasyon mevcut olduğundan, bu artış diğer *ERG* genlerinin ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Diğer *ERG* genlerinin hedefi olan azoller de bu yolla etkilenerek duyarlılıklarında azalma ortaya çıkmaktadır (93).

iv) Ergosterol biyosentezinde değişiklik: Ergosterol biyosentez yolunda bulunan *ERG3* geni ile kodlanan $\Delta 5$ -6 desaturaz enziminin inaktivasyonu ile biyosentez yolunun değişmesi veya *ERG3* genindeki mutasyonlara bağlı olarak ergosterol yerine 14α metil fekosterol birikimi azol direncine neden olmaktadır (79).

Sonuç olarak; azol türevlerine direnç gelişim mekanizmalarının birden fazla sayıda ve oldukça karmaşık olduğu ve de basamaklı bir tarzda ortaya çıktığı belirtilmektedir (94,95).

4.7.3. 5 Flusitozin (Florositozin)

5 Flusitozin, nükleik asit sentez inhibitörlerindedir. Sitozin permeaz aracılığıyla mantar hücresine girer ve burada sitozin deaminaz ile 5 florourasile dönüşür. Florourasil, urasil fosforibozil transferaz enzimi ile toksik metabolitlere dönüşür ve bu metabolitler nükleik asit sentezini ve sitozin deaminazı inhibe eder (74). 5 Flusitozin, sitozin deaminaz enzimi memelilerde bulunmadığı için seçici olarak funguslara toksik etki gösterir.

5 Flusitozin ile ilgili esas sorun flusitosin monoterapisi nedeni ile sekonder direncin kolaylıkla gelişebilmesidir. Direnç sıklıkla nokta mutasyonlarla oluşmaktadır (75). İntrensek direnç ise; sitozin deaminaz veya urasil fosforibozil transferaz aktivitesindeki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (75,79).

4.7.4. Hücre Duvarına Etkili Antifungaller

Hücre duvarına etkili antifungal ilaçlar, glukan, kitin ve mannan sentez inhibitörleri olarak üç grupta toplanır. Bu yapılar insan hücresinde bulunmadığı için bu grup ilaçların selektif toksisite avantajları bulunmaktadır.

Glukan sentez inhibitörleri, β -(1,3)-glukan sentaz enzimini inhibe eder. Papulakandin, akulesin, ekinokandin ve pnömokandin bu grupta bulunmaktadır. Kitin sentez inhibitörleri arasında polyoksin ve nikkomisinler yer almakta ve UDP-N-asetil glukozamin analogu olarak kitin sentezini engellemektedirler. Mannan sentez inhibitörleri arasında ise paramidisin ve benanomisin bulunur. Kaspofungin gibi ekinokandinler antifungal ilaçlar arasında en yeni gruptur. Etkilerini, β -(1,3)-glukan sentezini inhibe ederek gösterirler. Bunun yanında hücrenin ergosterol, lanosterol gibi diğer bileşenlerini de etkiledikleri saptanmıştır. *C. albicans*'ın taşıdığı *FKS1*, *FKS2*, *FKS3* genlerinde oluşan mutasyonların kazanılmış dirence yol açtığı bildirilmektedir (77,96).

4.7.5. Allilaminler

Allilaminler, skualenden lanosterol yapımında rol oynayan skualen epoksidaz ve 2,3-oksidoskualen siklaz enzimini inhibe ederek etki gösterir. Bu enzimlerin eksikleri sonucu ergosterol eksikliği oluşmakta ve skualen birikimi ile membran yapı ve fonksiyonları bozulmaktadır (97).

Klinik kullanımda olan tek sistemik allilamin terbinafin olup, *Candida* türlerinin çoğuna fungistatik, dermatofitler ve filamantöz funguslara fungisidal etkilidir (74). Allilaminlere direnç gelişiminde, çoklu ilaç pompa sistemlerinin aktivitelerinde artış veya pompaları kodlayan genlerin fazla regülasyonu rol oynamaktadır (97).

4.8. Antifungal Duyarlılık Testleri

Sistemik fungal infeksiyonların sağaltımı amacıyla antifungallerin kullanımında artış, beraberinde direnç sorununu gündeme getirmiştir. Böylece antifungal duyarlılık testlerinin kullanımı ve önemi artmıştır. Bu testlerin uygulanmalarını arttıran nedenler şu şekilde sıralanabilir (98):

- i) Ampirik antifungal kullanımında yol gösterici olmaları
- ii) Kandidemi gibi olgularda uzun süreli sağaltımlar için uygun ilacın seçiminde belirleyici olmaları
- iii) Tekrarlayan mukozal hastalıklarda alternatif sağaltımların uygulanmasına yardımcı olmaları

1983 yılında ‘‘Clinical and Laboratory Standards Institute’’ (CLSI) tarafından kurulan bir alt komite mayalar ile ilgili antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu çalışmalarına başlamış olup; 1992 yılında ilk referans yöntem olan buyyon makrodilüsyon yöntemini kabul ederek M27-P belgesini yayınlamıştır. Duyarlılık testleri üzerine etkili olan inokulum büyüklüğü ve hazırlanması, inkübasyon zamanı ve ısısı, besiyeri içeriği ve pH’sı, son noktanın belirlenmesi gibi faktörlerle ilgili çalışmalar sonrasında M27-T belgesi açıklanmıştır (99,100).

1997 yılında M27-A ve 2002 yılında M27-A2 olarak bildirilen belgelerle kullanılmakta olan antifungaller için duyarlılık ve direnç sınırları belirtilerek mayalar için testler standardize edilmiştir (101). 2002 yılında CLSI flukonazol için disk difüzyon testinin standartlarını M44-P olarak belirlemiştir (102). Küf mantarlarının duyarlılık testleri için ise M38-P belgesi kullanılmaktadır (99,100). “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST)’ın önerisi ise M27-A belgesi ile belirlenen mikrodilüsyon yöntemini, düz tabanlı plaklar ve %2 oranında glukoz ilaveli RPMI 1640 besiyeri kullanarak, 24 saatte spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %50 oranında azaldığı kuyucuktaki değerin MİK değeri olarak kabul edilmesi şeklindedir (103).

Antifungal duyarlılık testleri; dilüsyon ve difüzyon temeline dayalı yöntemler olarak iki grupta incelenebilir. Dilüsyon temeline dayanan testler; makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon ve yarı katı agar dilüsyon yöntemleridir. Difüzyon temeline dayanan testler ise disk difüzyon ve E test yöntemleridir. Ayrıca flovisitometrik ve ergosterol kantitasyonu gibi yöntemler de kullanılmaktadır (104–106).

4.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler

4.8.1.1. Makrodilüsyon yöntemi

CLSI tarafından belirlenen M27-A2 standartları içerisinde *Candida* türleri için önerilen referans yöntemdir. Bu yöntemde besiyeri olarak son konsantrasyonu 0.165mol/L olacak şekilde MOPS ile oda ısısında tamponlanan L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 sentetik besiyeri kullanılmaktadır (100,101). EUCAST son glukoz konsantrasyonunun %2 olmasının mayaların, MİK değerlerini değiştirmeden daha iyi üremesini sağlayarak MİK son noktasının saptanmasını kolaylaştırdığını belirtmektedir (103).

Candida türlerinde AmB direncinin saptanmasında RPMI 1640 besiyerine göre “antibiotic medium 3” besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Makrodilüsyon yöntemi zaman alıcı ve pahalı olduğundan az örnek sayısı için uygun görülmektedir (104-106). CLSI değerlendirmenin 48 saatlik 35°C deki inkübasyondan sonra AmB için gözle; azoller için gözle ve spektrofotometrik olarak yapılmasını önermektedir. AmB için, MİK değeri olarak, üremenin tam inhibe olduğu yani hiç bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon

kabul edilir. 5 Flusitozin ve azoller için gözle okumada kontrol kuyucuğundaki üremeye göre bulanıklığın belirgin olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilirken spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %80 oranında (1/5 dilüsyonluk) azaldığı kuyucuktaki değer kabul edilmektedir (100,101).

4.8.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi, yaklaşım olarak makrodilüsyon yöntemine benzer ancak makrodilüsyon yönteminin uygulama zorluklarından dolayı tercih edilmektedir. Bu yöntemde; U tabanlı 96 çukurlu mikrodilüsyon plakları, RPMI 1640 besiyeri, iki kat konsantrasyonda ilaç ve maya süspansiyonları kullanılır (105). CLSI, 24. ve 48. saatlerde gözle ve azoller için spektrofotometrik olarak değerlendirme önermektedir. Buna göre AmB için; üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon, 5 flusitozin ve azoller için ise gözle okumada üreme kontrole göre bulanıklığın belirgin olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon ve de spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %50 oranında azaldığı kuyucuktaki değer MİK değeri olarak kabul edilmektedir (102–105). Flukonazol için 64 µg/ml ve üzerindeki MİK değeri saptanan izolatlar dirençli (R), 16-32 µg/ml arasındaki MİK değerleri doza bağımlı duyarlı (DBD) ve 8µg/ml ve altı ise duyarlı (D) olarak kabul edilmektedir (107,108).

4.8.1.3. Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi

Bu yöntem, mikrodilüsyon yöntemine oksidasyon-redüksiyon indikatörü olan alamar mavisi, XTT veya MTT eklenmesi ile uygulanmaktadır. MİK değerlerinin daha kolay okunmasını ve daha objektif son nokta elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir (104).

4.8.1.4. Yarı katı agar dilüsyon yöntemi

Yarı katı agar dilüsyon yöntemi, tarama yöntemi olarak kullanılabilen basit ve hızlı bir testtir. Besiyeri olarak %0.5 agar ve %2 dekstroz içeren beyin-kalp infüzyon yarı katı agarı kullanılır. Kalite kontrol ve diğer referans izolatlar ile yapılan çalışmalarda makrodilüsyon testi ile uyum gösterdiği bildirilmiştir (104). Ayrıca bir başka çalışmada, aynı miktarda agar ve dekstroz eklenen RPMI 1640 agar kullanıldığında flukonazol ve AmB için mikrodilüsyon

yöntemi ile sırasıyla %71 ve %79 oranlarında uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (109). Provine ve arkadaşları (110) bu yöntemi ucuz ve tekrarlanabilir olması nedeniyle önermektedir.

4.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler

4.8.2.1. Disk difüzyon yöntemi

CLSI tarafından M44-P belgesinde standartlarının belirlendiği disk difüzyon yönteminde 25 ve 50 µg'lık flukonazol diskleri ile çeşitli besiyerlerinin kullanımının denendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (102,111,112). CLSI besiyeri olarak 0.5 µg/mL metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agarın kullanılmasını önermektedir (102). Flukonazol diskleri için sınır değerler CLSI tarafından ≥ 19 duyarlı, 15-18mm DBD, ≤ 14 mm dirençli olarak belirlenmiştir (102).

4.8.2.2. E test yöntemi

E test yöntemi, antifungal ajanın emdirildiği plastik şeritlerin kullanılarak MİK değerinin saptanabildiği bir difüzyon testidir. Pahalı olmasına rağmen uygulanması kolay bir yöntemdir. Azoller için fosfat tampon ile, AmB için MOPS ile tamponlanan ve %2 dekstroz eklenmiş RPMI 1640 agarın kullanılması önerilmektedir (104).

4.8.3. Diğer Yöntemler

4.8.3.1. Flovsiometrik yöntem

Flovsiometri yönteminde DNA'ya bağlanma yeteneği olan boyalar ile ölü ve canlı hücreler hızlıca birbirinden ayrılabilir (105). AmB, flukonazol, ketokonazol ve 5-FC ile yapılmış olan uygulamalarında referans yöntem ile uyumlu sonuçlar alınmıştır (113).

4.8.3.2. Ergosterol kantitasyonu

Bu yöntemde, ergosterol sentezi kantitatif ölçülerek özellikle azol grubu ilaçların etkinliği araştırılır (105). *C. albicans* izolatlarında flukonazol duyarlılığının araştırıldığı bir

Çalışmada ergosterol kantitasyonu ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar uyumlu bulunmuş; DBD ve R suşların ergosterol kantitasyonu ile birbirlerinden ayrılabildiği bildirilmiştir (114).

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Suşlar

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden Aralık 2003-Ocak 2005 tarihleri arasında soyutlanan ve rutin tanımlama yöntemleri uygulanmış toplam 650 adet *C. albicans* suşu alındı. Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan gönderilen üç adet, Uludağ Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan gönderilen bir adet flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı *C. albicans* suşu da çalışmaya dahil edildi. Bağlantı kurduğumuz Prof. Dr. Dominique Sanglard tarafından gönderilen DSY 289 no'lu Y132H mutasyonu bulunan suş ile beraber DSY 290, DSY 292 no'lu iki adet flukonazole dirençli ve DSY 347 no'lu bir adet flukonazole duyarlı *C. albicans* suşu da araştırmamızda kontrol olarak kullanıldı. Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) -80°C'de stoklandı.

5.2. Tanımlama Yöntemleri

Stok besiyerlerinden SDA'ya pasajlanan örnekler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilerek üretildi. Suşların flukonazol duyarlılıkları belirlendikten sonra seçilen suşlara tekrar çimlenme borusu testi uygulandı, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar Candida (CHROMagar, Fransa) besiyerlerindeki görünümleri değerlendirildi ve API 20C AUX (Biomérieux, Fransa) identifikasyon işlemi uygulandı. Uygulanan yöntemler sonucunda *C. albicans* olarak tanımlanan suşlar araştırmaya alındı.

5.3. Antifungal Duyarlılık Çalışması

Laboratuvarımızda soyutlanan ve tanımlanan 650 adet *C. albicans* suşu ile diğer Üniversitelerden gönderilen toplam dört adet *C. albicans* suşunun flukonazole duyarlılığı "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) tarafından önerilen M27-A2 standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı (101). Flukonazol duyarlılıklarına göre seçilen suşların diğer antifungallere duyarlılıkları için ise yine M27-A2 standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi uygulandı (101). Uygulanan mikrodilüsyon yönteminde kalite kontrol

suşları olarak *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 90018 ve *C. krusei* ATCC 6258 kullanıldı.

5.3.1. Duyarlılık Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması

5.3.1.1. Besiyeri Hazırlanması

CLSI önerisi olan L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, renk indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyeri (Sigma R 6504) son konsantrasyonu 0.165 mol/L olacak şekilde 3-N-morfolinopropan sulfonik asit (MOPS) (Sigma) ile 25°C'de pH 7.0'ye tamponlandı. Daha sonra 0.45 µm'lik filtreden süzülerek steril hale getirildi ve +4°C'de saklandı.

5.3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Konsantrasyonları

Duyarlılık çalışması için kullanılan antifungaller, flukonazol (AppliChem-BioChemica A6349,0100), 5 flusitozin (Fluka 47576), amfoterisin B (Fluka-BioChemica 10042), itrakonazol (Sigma 16657), ketokonazol (Sigma 2857), mikonazol (Sigma M3512), klotrimazol (Sigma 2914) şeklinde idi. Antifungallerin DMSO ile sulandırılarak stok solüsyonları hazırlandı. Stok solüsyonlar RPMI 1640 besiyeri ile dilüe edilerek istenen son konsantrasyonları elde edildi ve alikotlanarak -70°C de saklandı. Kuyucuklardaki son antifungal konsantrasyonları CLSI'nın önerisi doğrultusunda flukonazol için 64-0.125 µg/ml, 5 flusitozin için 64-0.125 µg/ml, ketokonazol ve AmB için 16-0.03 µg/ml, diğer antifungaller için flukonazol konsantrasyonlarında olacak şekilde ayarlandı.

5.3.1.3. Maya İnokulumlarının Hazırlanması

SDA'ya iki kez pasaj yapılarak saf kültürleri elde edilen ≥ 1 mm çaplı kolonilerden 3-5 koloni, 5 ml %0.9'luk serum fizyolojik içinde, bulanıklık derecesi Mc Farland 0.5 olacak şekilde süspanse edildi ve süspanسیون tüpleri vorteks ile karıştırıldı. Bu süspanسیونda $1-5 \times 10^6$ KOÜ/ml maya bulunmakta olup, RPMI 1640 ile dilüe edilerek $1-5 \times 10^3$ KOÜ/ml içeren maya süspanسیونu elde edildi. Testin uygulanması sırasında maya süspanسیونu besiyeri ile

1:1 oranında dilue olduğundan istenen son konsantrasyon olan $0.5-2.5 \times 10^3$ KOÜ/ml' ye ulaşılmış oldu.

5.3.2. Testin Uygulanışı

Steril, 96 kuyucuklu, U tabanlı mikrodilüsyon plakları kullanılarak CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi uygulandı (101). Plaklar 48 saat 35°C 'de inkübe edildi.

5.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm suşların 24. ve 48. saatlerde gözle ve azoller için ek olarak spektrofotometrik olarak değerlendirmeleri yapıldı. Gözle okumada M27-A2 önerisi doğrultusunda AmB için üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi. 5 Flusitozin, flukonazol ve diğer azoller için MİK değeri gözle okumada bulanıklığın belirgin azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon olarak belirlendi. Azoller için plaklar 5 dakika çalkalandıktan sonra spektrofotometrik olarak 492 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve üreme kontrole göre %50 oranında inhibisyon gerçekleşen kuyucuktaki değer MİK değeri olarak kabul edildi (101,102). CLSI önerisi doğrultusunda flukonazol için MİK değeri $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ R, $16-32 \mu\text{g/ml}$ DBD, $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ D, AmB için $> 1 \mu\text{g/ml}$ R, ≤ 1 D, 5 flusitozin için $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ R, $8-16 \mu\text{g/ml}$ orta duyarlı, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ D, itrakonazol için ≥ 1 R, $0.25-0.5 \mu\text{g/ml}$ DBD, $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ D olarak kabul edildi.

Antifungal duyarlılık çalışması sonucunda yedi adet flukonazole R/DBD *C. albicans* suşu belirlendi. Bunun yanında çalışmaya on adet flukonazole D *C. albicans* suşu dahil edildi.

5.4. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

REA çalışmasına yedi adet flukonazole R/DBD, on adet de flukonazole D *C. albicans* suşu alındı. Bu analizde Prof. Dominique Sanglard tarafından gönderilen flukonazole R ve Y132H mutasyonu bulunan *C. albicans* suşu (DSY 289) ile bu mutasyonun bulunmadığı flukonazole D *C. albicans* suşu (DSY 347) kontrol suşları olarak kullanıldı.

5.4.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

Üretilen suşlardan DNA ekstraksiyonu ‘‘yeast extract peptone dextrose’’ (YPD) agar’da (Difco, Franklin Lakes, A.B.D.) 37°C’de 48 saat inkübe edilen *C. albicans* suşlarının bir kolonisi 5ml’lik YPD buyyon (Difco, Franklin Lakes, A.B.D.) içeren tüplere alınarak 37°C’de 48 saat daha inkübe edilerek gerçekleştirildi (115). 5ml’lik YPD buyyon tüpleri içinde bulunan örnekler Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak, üretici firma önerisi doğrultusunda ekstraksiyona alındı. Ekstraksiyon uygulamasından önce kitin önerisi doğrultusunda bazı çözeltiler hazırlandı. Bunlar:

10 mM EDTA (pH: 8.0) (Applichem A 5097,0250)

Litikaz (Sigma L 2524)

Sorbitol tampon: 1.2M sorbitol, 10mM CaCl₂, 0.1M Tris/Cl, ayrı ayrı hazırlanıp otoklavlandıktan sonra eşit hacimlerde alınıp 35mM β-merkaptotanol ile karıştırılarak hazırlandı.

5 ml’lik YPD buyyon içinde bulunan örnekler 5,000×g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Çökeltiye 1ml 10 mM EDTA eklenip, 5,000×g’de 10 dakika daha santrifüjlendi ve süpernatant atılıp çökelti elde edildi. Elde edilen çökelti kit önerisi olan ön-lizis işlemine alınarak 600 µl sorbitol tampon ve 50Ü (5.8µl) litikaz ile ependorf tüplerinde süspanse edildi. Süspanسیون 30°C’de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda örnekler 2,000×g’de 10 dakika santrifüjlenip, süpernatant atıldıktan sonra elde edilen çökeltiye 180µl tampon T1 ve 25µl proteinaz K solüsyonu eklenerek, vortekslendi. Örnekler, 56°C’de su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan örnekler vortekslendikten sonra 200µl tampon B3 eklendi, tekrar vortekslendi ve 70°C’de 10 dakika inkübe edilerek lizis işlemi tamamlandı. Örneğe 210µl %96-100’lük etanol eklendi ve vortekslendi. Örnek 2 ml’lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan Nucleospin Tissue kolona dolduruldu ve 11,000×g’de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Bu işlem ile DNA’nın silika membrana bağlanması sağlandı. 500µl tampon BW eklendi ve 11,000×g’de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Kolona 600µl tampon B5 eklendi, 11,000×g’de 1 dakika santrifüjlendi ve yine sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı, böylece silika membranını yıkama işlemi gerçekleştirildi ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi.

Silika membranı kurutmak için 11,000×g'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Yüksek ürün ve konsantrasyonda DNA eldesi için silika membran üzerine önceden ısıtılmış (70°C) 50µl elüsyon tampon BE eklendi, oda ısısında 1 dakika inkübe edildi ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi; aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Böylece DNA eldesi 100µl hacimde tamamlandı.

5.4.2. REA Yönteminin Uygulanması

5.4.2.1. REA İçin Yapılan PZT İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

Tamponlar

- “*Taq*” DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas EPO 402) (5U/µl)
- 10x “*Taq*” tampon (MBI Fermentas EPO 402)
- 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas EPO 402)
- dNTP karışımı (Fermentas R0192): Her biri 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'den eşit hacimde bulunan karışımdan 50 µl'lik PZT için son konsantrasyonu 200µM olacak miktarda kullanıldı.
- TE tamponu (pH: 8.0): 2.5 ml 1 M Trizma “base” (Sigma T 6066) (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) karıştırılıp, hacim 250 ml'ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

TE tamponu için Tris ve Na₂EDTA çözeltisi hazırlanması:

1M Tris çözeltisi: 121.14 gr. tris (hidroksimetil) aminometan, 800 ml suda eritildi. 42 ml HCl ilave edilerek pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlanarak oda ısısında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA çözeltisi: 186.1 gr disodyum etilen diamin tetra asetat-2 H₂O, 800 ml suda eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

- Öncüller, 1ml TE çözeltisi ile sulandırıldı ve bu ana dilüsyondan distile su ile 10pmol/µl'lik alikotlar hazırlanıp -20°C'de saklandı.

5.4.2.2. REA İçin Yapılan PZT alışmasında Kullanılan Öncüller

REA-F öncülü (Sigma 9668-029)

5'-AGATCATAACTCAATATGGC-3'

Tm 53.0°C

REA-R öncülü (Sigma 9668-030)

5'-GTTGAGCAAATGAACGGTCA-3'

Tm 63.7 °C

5.4.2.3. REA İçin Yapılan PZT Karışımı ve Isı Döngüsü

REA uygulamak için yapılan PZT döngüsü Asai ve arkadaşlarının (116) önerdiği şekilde 50 µl'lik total hacimde aşağıdaki miktarlar kullanılarak optimize edildi.

| | Reaksiyon Hacmi | Son konsantrasyon |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Nükleaz içermeyen steril distile su | 32.2 ml | - |
| 10x''Taq''DNA tampon | 5 µl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 2.5 µl | 1.5 mM |
| dNTP karışımı | 1 µl | 0.2 mM |
| REA-F öncülü | 2 µl | 20 pmol |
| REA-R öncülü | 2 µl | 20 pmol |
| ''Taq''DNA polimeraz | 0.3µl | 2.5 U/50µl |
| DNA | 5 µl | - |
| Toplam hacim | 50 µl | - |

Reaksiyon ısı döngüsü

94°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C’de 30 saniye denatürasyon
60°C’de 30 saniye birleşme
72°C’de 1 dakika uzama
72°C’de 10 dakika son uzama
+4°C’de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

} 30 döngü

5.4.2.4. REA İçin Yapılan PZT Ürününün Görüntülenmesi

5.4.2.4.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

10X TBE: 108 gr Trizma “base” (Sigma T 6066), 55 gr borik asit (Sigma B 6768) 900 ml suda çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) eklendi ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Jel yükleme tamponu (6X): 0.25 gr bromfenol mavisi (Sigma B 5525), 0.25 gr ksilen siyanol FF (Sigma X 4126) ve 29.5 ml gliserol (Riedel-de Haën 15524) (~%86-88’lik) karıştırılıp, karışım steril distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

Agaroz: (Sigma A 5093)

Etidyum bromür: (Applichem A 1152,0100) (%1’lik solusyon)

DNA “ladder”: PZT ile elde edilen DNA ürününün tanımlanması için (MBI Fermentas SM 0371), üretici firma tarafından önerilen şekilde hazırlanarak kullanıldı.

5.4.2.4.2. REA İçin Yapılan PZT Ürününün Görüntülenmesi

TBE tamponu ile %2’lik agaroz jel hazırlandı, içine %5 oranında etidyum bromür solüsyonu eklendi ve karışım jel kalıbına döküldü. 10 µl PZT ürünü, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. 3µl DNA ladder ve ürünlerin 10 µl’si jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile doldurularak, jele bu tank içinde 120 V’da 40 dakika elektroforez yapıldı.

Sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi ve bilgisayarlı görüntüleme cihazında (Syngene GeneSnap, Synoptics Ltd., A.B.D.) görüntülendi. 673 baz çiftlik (bp) ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

5.4.2.5. REA Çalışması

PZT uygulanan suşların tümü purifiye edildikten sonra REA çalışmasına alındı.

5.4.2.5.1. Purifikasyon Çalışması

PZT çalışmasına alınan tüm suşlara üretici firma (Bio Basic Inc.EZ-10 Spin Column PCR Product Purification Kit) önerisi doğrultusunda saflaştırma işlemi uygulandı.

5.4.2.5.2. REA İşleminin Uygulanması

REA için RcaI enziminin izoşizomeri olan *PagI(BspHI)* enzimi (Fermentas ER 1281/400Ü), 10x tampon ile birlikte kullanılarak 20µl toplam hacim içerisinde reaksiyon gerçekleştirildi.

PagI (BspHI) enzimi

5'.. T'CATGA..3'

3'.. AGTAC'T..5'

Reaksiyon Hacmi

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Nükleaz içermeyen steril distile su | 7 µl |
| 10x tampon | 2 µl |
| <i>PagI (BspHI)</i> enzimi | 1 µl |
| DNA | 10 µl |
| Toplam hacim | 20 µl |

Reaksiyon karışımı 37°C'de 2 saat süreyle ısı bloğunda tutuldu.

Elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel yardımı ile etidyum bromür ile boyanıp, 120 V'da 40 dakika elektroforez uygulanarak görüntülendi. Sonuçlar, kontrol olarak kullanılan mutasyonlu ve mutasyonsuz *C. albicans* suşlarının mevcut bant paternlerine göre değerlendirildi.

5.5. Dizi Analizi İçin PZT Yönteminin Uygulanması

Dizi analizi için PZT çalışması için hedef bölge olarak lanosterol demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* gen bölgesi seçilerek, Marichal ve arkadaşlarının (117) uyguladığı PZT yöntemi kullanıldı.

Çalışmaya toplam yedi adet flukonazole R/DBD, on adet de flukonazole D *C. albicans* suşu alındı. Araştırmamıza REA çalışmasında kontrol olarak kullandığımız flukonazole R ve Y132H mutasyonu bulunan *C. albicans* suşu DSY 289 ile bu mutasyonun bulunmadığı flukonazole D *C. albicans* suşu DSY 347 de dahil edildi. DNA eldesi sağlandıktan sonra uygun tamponlar, öncüller, AmpliTaqGold DNA polimeraz enzimi (Applied Biosystems, Foster City, Kanada) kullanılarak dizi analizi-PZT çalışması gerçekleştirildi.

5.5.1. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

Tamponlar

AmpliTaqaGold DNA polimeraz enzimi (Applied Biosystems, FosterCity, Kanada) (5U/μl)

10x TaqaGold tampon ve 25 mM MgCl₂II (Applied Biosystems, FosterCity, Kanada)

dNTP karışımı (Fermentas R0192): REA PZT işleminde kullanıldığı şekilde hazırlandı.

TE tamponu (pH:8.0): REA PZT işleminde kullanıldığı şekilde hazırlandı.

Öncüller, 1ml TE çözeltisi ile sulandırıldı ve bu ana dilüsyondan distile su ile 10pmol/μl'lik alikotlar hazırlanıp -20°C'de saklandı.

Öncüller

ERG-A öncülü (PZT-F) (Sigma 9679-050)

5'-GAAGATCATAACTCAATATGGCTATTGTTG-3'

T_m=65.1°C

ERG-B öncülü (PZT-R) (Sigma 9679-051)

5'-GAAAGTTGCCGTTTTATTAAAACATAC-3'

T_m=62.4°C

5.5.2. Dizi Analizi-PZT Uygulaması İçin Karışım ve Isı Döngüsü

PZT döngüsü Marichal ve arkadaşlarının (117) önerdiği şekilde 50 µl'lik total hacimde aşağıdaki miktarlar kullanılarak optimize edildi.

| | Reaksiyon Hacmi | Son konsantrasyon |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------|
| Nükleaz içermeyen steril distile su | 32 ml | - |
| 10x AmpliTaqGold tampon | 5 µl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ II | 2.5 µl | 1.5 mM |
| dNTP karışımı | 1 µl | 0.2 mM |
| ERG-A öncülü | 2 µl | 20 pmol |
| ERG-B öncülü | 2 µl | 20 pmol |
| AmpliTaqaGold DNA polimeraz | 0.5 µl | 2.5 U/50µl |
| DNA | 5 µl | - |
| Toplam hacim | 50 µl | |

Reaksiyon ısı döngüsü

94°C'de 10 dakika ön denatürasyon

92°C’de 1 dakika denatürasyon
60°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 2 dakika uzama
72°C’de 10 dakika son uzama

} 30 döngü

+4°C’de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

5.5.3. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi

5.5.3.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

Aşağıdaki tüm malzemeler REA-PZT işleminin görüntülenmesinde kullanıldığı şekilde hazırlandı.

10X TBE

Jel yükleme tamponu (6X)

Agaroz

Etidyum bromür

DNA ‘‘ladder’’

5.5.3.2. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi

REA-PZT ürününün görüntülenmesi ile aynı şekilde gerçekleştirildi.

5.5.4. Dizi Analizi Çalışması

PZT çalışması sonunda yaklaşık olarak 1650 bp’lik bir amplifikasyon ürünü elde edildi. Bu bölgenin tamamına tek seferde dizi analizi uygulamanın sonuçlar açısından sorun yaratacağı göz önüne alınarak yeni sentezlenen öncüller yardımı ile DNA dizi analizi çift yönlü olarak ‘‘Big Dye TM terminator’’ yöntemi ve otomatik 3730.x.1 DNA analizörü ile Macrogen (Güney Kore) tarafından uygulandı.

5.5.4.1. Dizi Analizi Çalışması İçin Sentezlenen Öncüller

| | |
|----------------------|------------------------|
| ERG-C öncülü (PZT-F) | 5'-GACCGTTCATTTGCTC-3' |
| ERG-D öncülü (PZT-F) | 5'-TCTCCAGGTTATGCTC-3' |
| ERG-E öncülü (PZT-R) | 5'-GCAGAAGTAGAAGCAG-3' |
| ERG-F öncülü (PZT-R) | 5'-CATGACCTTTTGGACC-3' |

Sentezlenen öncüller ile birlikte ERG-A ve ERG-B öncülleri dizi analizi için kullanıldı.

5.5.4.2. Dizi Analizi Çalışmasının Yorumlanması

Dizi analizi sonuçları, Lai ve Kirsch (118) tarafından belirlenen yabancı tip (mutasyonsuz) *C. albicans* lanosterol demetilaz enzimi ile karşılaştırmak sureti ile Bio-Edit versiyon 7.0 programı kullanılarak değerlendirildi.

5.6. İlaç Atım Pompalarının Substrat ve İnhibitörü Olan Maddeler ile Duyarlılık Çalışması

Yedi adet flukonazole R/DBD *C. albicans* suşu ile on adet D *C. albicans* suşu ve kontrol suşları olarak *C. albicans* DSY 289, *C. albicans* DSY 292 suşları çalışmaya dahil edildi. Çalışma yöntemi olarak; CLSI M27-A2 önerileri doğrultusunda substrat ve inhibitör grubu ilaçlar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulandı.

5.6.1. Substrat Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması

Maebashi ve arkadaşlarının (119) Cdrp ve Mdrp substratları olarak kullandığı maddelerden rodamin6G, 4-nitrokinolinN-oksit (4-NQO), fenantrolin ile mikrodilüsyon yöntemi uygulandı.

5.6.1.1. Duyarlilik Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması

5.6.1.1.1. Besiyeri Hazırlanması

CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak RPMI 1640 besiyeri (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, renk indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren) (Sigma R6504) son konsantrasyonu 0.165 mol/L olacak şekilde 3-N-morfolinopropan sulfonik asit (MOPS) (Sigma) ile 25°C'de pH 7.0'ye tamponlanarak hazırlandı.

5.6.1.1.2. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması

Duyarlilik çalışması için kullanılan ilaçların hammaddeleri duyarlilik çalışmasında olduğu gibi DMSO ile eritildi ve RPMI ile dilüe edilerek istenen son konsantrasyonları elde edildi.

Substrat olarak kullanılan maddeler ve konsantrasyonları:

| | |
|-----------------|---|
| Cdr1p substratı | Rodamin6G (0.125-64 µg/ml) (Fluka 93698) |
| Mdr1p substratı | 4-NitrokinolinN oksit (0.03-2 µg/ml) (Sigma N8141) |
| Mdr1p substratı | Fenantrolin (0.03-16 µg/ml) (AppliChem-BioChemica A3826,0005) |

5.6.1.2. Maya İnokulumlarının Hazırlanması

Suşların maya inokulumları duyarlilik çalışmasında olduğu gibi CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak hazırlandı.

5.6.1.3. Testin Yapılışı

CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi uygulandı. Plaklar 48 saat, 35°C'de inkübe edildi. Sonuçlar 48 saat sonra gözle okundu. Gözle okumada üreme kontrole göre tam inhibisyon sağlanan kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi.

5.6.2. İnhibitör Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması

Pina-Vaz ve arkadaşlarının (120) kullandıkları atım pompa inhibitörleri olan ibuprofen, progesteron, β -östradiol, verapamil hammaddeleri sağlanarak, subinhibitör konsantrasyonları hazırlandı.

5.6.2.1. Duyarlılık Çalışması İçin Gereken Maddelerin Hazırlanması

5.6.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması

Substrat grubu maddelerle uygulandığı şekilde hazırlandı.

5.6.2.1.2. İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması

İlaç solüsyonları önerilen subinhibitör konsantrasyonlarına uygun olarak DMSO ile sulandırılarak, RPMI ile dilüe edilerek hazırlandı.

İnhibitör grubu olarak seçilen ilaçlar ve subinhibitör konsantrasyonları:

| | | | |
|--------------------|--------------------|-------------|--------------|
| Verapamil | (50-500 μ M) | 100 μ M | (Fluka94837) |
| β -östradiol | (50-500 μ M) | 50 μ M | (SigmaE2758) |
| Progesteron | (50-500 μ M) | 50 μ M | (SigmaP8783) |
| İbuprofen | (100-5000 μ M) | 100mg/L | (SigmaI4883) |

5.6.2.2. Maya İnokulumlarının Hazırlanması

Suşların maya inokulumları duyarlılık çalışmasında olduğu gibi CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak hazırlandı.

5.6.2.3. Testin Yapılışı

CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi uygulandı. Plaklar 48 saat, 35°C'de inkübe edildi. Sonuçlar 24.ve 48.saatlerde gözle ve spektrofotometrik olarak

okundu. Gözle okumada M27-A2 nerisi doğrultusunda MİK değeri olarak bulanıklığın belirgin oranda azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon kabul edildi. Spektrofotometrik olarak üreme kontrole göre %50 oranında inhibisyon gerçekleşen kuyucuktaki değer inhibitör maddelerin varlığında flukonazol MİK değerleri olarak belirlendi.

5.7. İstatistiksel Analiz

Farklı pompa inhibitörlerinin flukonazol R/DBD *C.albicans* suşlarının flukonazol MİK değerleri üzerindeki etkileri arasındaki korelasyon SPSS 11.0 programı kullanılarak belirlendi (120).

6. BULGULAR

6.1. Antifungal Duyarlılık Çalışması Sonuçları

Antifungal duyarlılık çalışması flukonazol, 5 flusitozin, AmB, ketokonazol, itrakonazol, mikonazol olmak üzere yedi adet antifungal kullanılarak gerçekleştirildi. Çalıştığımız *C. albicans* suşları için elde edilen MİK değerleri CLSI M27A-2 önerisi doğrultusunda flukonazol için: ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$: R, 16-32 $\mu\text{g/ml}$: DBD, ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$: D olarak kabul edilip, değerlendirildiğinde; dört adet R suş ile üç adet DBD suş olmak üzere toplam yedi adet R/DBD *C. albicans* suşu belirlendi. Kendi laboratuvarımızda soyutlanan izolatlardan çalışmaya aldığımız 650 adet *C. albicans* suşunun, üçünün (%0.46) flukonazole R olduğu saptandı. CLSI tarafından flusitozin için MİK değeri $\geq 32\mu\text{g/ml}$ dirençli olarak kabul edildiğinden (101) suşların biri flusitozine orta duyarlı, diğerleri flusitozine R, AmB için ise MİK değeri olarak $>1\mu\text{g/ml}$ dirençli kabul edildiğinden (77) tüm suşlar AmB'ye D olarak bulundu. İtrakonazol ve ketokonazol için MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ dirençli kabul edilmesi (121) nedeniyle suşların biri dışında tümünün bu azollere R olduğu saptandı. Mikonazol için direnç sınır noktası bildirilmemiş olup, klotrimazol için ise Pelletier ve arkadaşlarının (122) önerisi doğrultusunda MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ olanlar dirençli kabul edilince bir suş dışında izolatların tümü klotrimazole D olarak değerlendirildi. Flukonazole R/DBD olarak belirlenen suşların antifungal duyarlılık çalışması sonuçları Tablo-1'de görülmektedir.

Tablo-1. Flukonazole R/DBD *C. albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları *

| Suş No | Hastane** | İzolasyon Yeri | Antifungal İlaçların MİK Değerleri (µg/ml) | | | | | | |
|--------|-----------|----------------|--|-------------|-------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | | | Flukonazol | 5Flusitozin | AmB | İtrakonazol | Ketokonazol | Mikonazol | Klotrimazol |
| H1 | H | Tırmak | >64 | 32 | 1 | 4 | 4 | >64 | 1 |
| H2 | H | Ağız | 16 | 32 | 1 | 2 | 2 | 64 | 0.125 |
| H3 | H | Ağız | 32 | 16 | 0.500 | 2 | 2 | 64 | 0.125 |
| B | U | Ağız | 32 | 32 | 1 | 1 | 2 | >64 | 0.250 |
| 1978 | D.E. | Katater | >64 | 32 | 1 | >8 | >16 | >64 | 0.500 |
| 348 | D.E. | Vagina | >64 | 32 | 0.500 | 2 | 2 | >64 | 0.250 |
| 93-05 | D.E. | Kan | >64 | 64 | 1 | 0.500 | 0.500 | 0.125 | 0.250 |

*Çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

**İzolatların gönderildiği Üniversite Hastaneleri:

H: Hacettepe Üniversitesi

U: Uludağ Üniversitesi

D.E.: Dokuz Eylül Üniversitesi

Çalışmaya alınan flukonazole D suşların flukonazol için MİK değerleri dağılımı ise; 1 adet 0.125µg/ml, 3 adet 0.250µg/ml, 3 adet 0.500µg/ml, 1 adet 1µg/ml, 1 adet 4µg/ml, 1 adet 8µg/ml şeklindedir. Flukonazole duyarlı on adet *C. albicans* suşunun altısının flusitozine orta duyarlı, dördünün flusitozine dirençli olduğu, tümünün AmB, ketokonazol ve klotrimazole duyarlı, itrakonazole DBD olduğu saptanmıştır. D suşların antifungal duyarlılık sonuçları Tablo-2’de görülmektedir.

Tablo-2. Flukonazole D *C. albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

| Suş No | Hastane* | İzolasyon Yeri | Antifungal İlaçların MİK Değerleri (µg/ml) | | | | | | |
|--------|----------|----------------|--|-------------|-------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | | | Flukonazol | 5Flusitozin | AmB | İtrakonazol | Ketokonazol | Mikonazol | Klotrimazol |
| 533 | D.E. | Katater | 0.500 | 16 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 2 | 0.125 |
| 565 | D.E. | Balgam | 0.500 | 16 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 8 | 0.125 |
| 644 | D.E. | Balgam | 0.250 | 16 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 8 | 0.125 |
| 960 | D.E. | İdrar | 8 | 16 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 8 | 0.250 |
| 1221 | D.E. | İdrar | 0.125 | 16 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 8 | 0.125 |
| 1453 | D.E. | Balgam | 0.250 | 16 | 0.500 | 0.500 | 0.030 | 4 | 0.125 |
| 2157 | D.E. | Kan | 0.250 | 32 | 1 | 0.500 | 0.060 | 16 | 0.250 |
| 2177 | D.E. | Kan | 0.500 | 32 | 1 | 0.500 | 0.060 | 8 | 0.250 |
| 3-05 | D.E. | Ağız | 4 | 32 | 1 | 0.500 | 0.030 | 16 | 0.125 |
| 51-05 | D.E. | B.lavaj | 1 | 32 | 1 | 0.500 | 0.030 | 16 | 0.125 |

* D.E.: Dokuz Eylül Üniversitesi

6.2. Flukonazole Dirençli *C. albicans* Suşlarının Soyutlandığı Hasta Bilgileri

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarından soyutlanan suşlar olan 1978, 348, 93-05 numaralı suşlardan 1978 numaralı suş Temmuz 2003 tarihinden itibaren Dahiliye-Onkoloji servisinde pankreas kanseri tanısı ile takip edilen bir hastaya ait kateter izolatu olup, 28.09.2004-16.10.2004 tarihleri arasında flukonazol kullanılmıştır. 348 numaralı suş mide kanseri nedeniyle Ocak 2004 tarihinde Genel Cerrahi servisinde opere edilen ve Ekim 2004 tarihinde subileus tablosu ile yoğun bakıma yatırılan bir hastanın kan örneği olup, hastanın antifungal kullanımı ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır. 93-05 numaralı hasta izolatu ise karaciğer sirozu, alkolik hepatit, tipII diabet tanıları ile takip edilen ve 11.01.2004 tarihinde sepsis gelişmesi nedeniyle acil servisten yoğun bakıma yatırılmış bir hastaya ait olup, vaginal örneğinde *C. albicans* üremesi nedeniyle AmB tedavisine başlanmıştır. 348 ve 93-05

numaralı suşların ait olduğu hastalar Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde "eksitus" olmuşlardır.

Diğer Üniversitelerden gönderilen suşlardan H1 ve H2 suşları kronik mukokütanöz kandidoz'lu bir hastanın tırnak ve ağız izolatları olup, H3 suşu ise HIV(+) bir hastanın ağız örneğinden soyutlanmıştır. B suşu ise kronik mukokütanöz kandidoz'lu bir hastanın oral sürüntü izolatıdır.

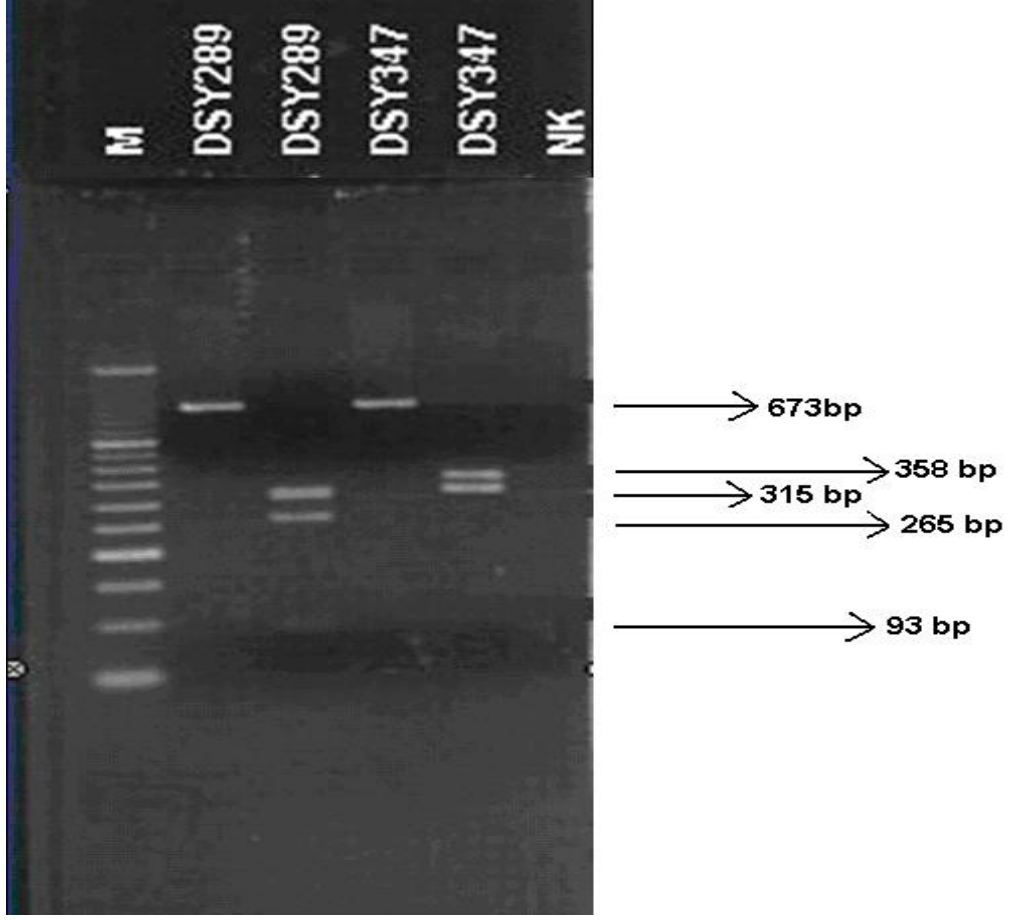
6.3. *C. albicans* Suşlarının Fenotipik Özellikleri

Stok besiyerlerinden SDA'ya pasajlanan flukonazol R/DBD ve D suşların 24.saatte kolonileri yaklaşık 1 mm boyutunda, S tipi, parlak, kirli beyaz renkli olarak izlendi. Koloniler 48.saatte 2-3 mm, S tipi, parlak, kirli beyaz renkli olarak gözlemlendi. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda beş gün boyunca koloni morfolojisi, görünümü ve üreme süresi gibi fenotipik özellikleri açısından fark saptanmadı.

6.4. REA İçin PZT Çalışması Sonuçları

REA optimizasyonu için ilk çalışma, kontrol olarak kullanılan flukonazole R ve Y132H mutasyonu bulunan *C. albicans* suşu DSY 289 ile flukonazole D Y132H mutasyonu bulunmayan *C. albicans* suşu DSY 347 kullanılarak gerçekleştirildi. PZT sonrası elde edilen 673bp'lik ürün *PagI* enzimi ile kesildi ve çalışma sonucunda, Y132H mutasyonu bulunan pozitif kontrol suşunda 315bp, 93 bp, 265bp'lik üç adet, bu mutasyonun bulunmadığı negatif kontrol suşunda ise 315bp, 358 bp'lik iki adet bant görüldü.

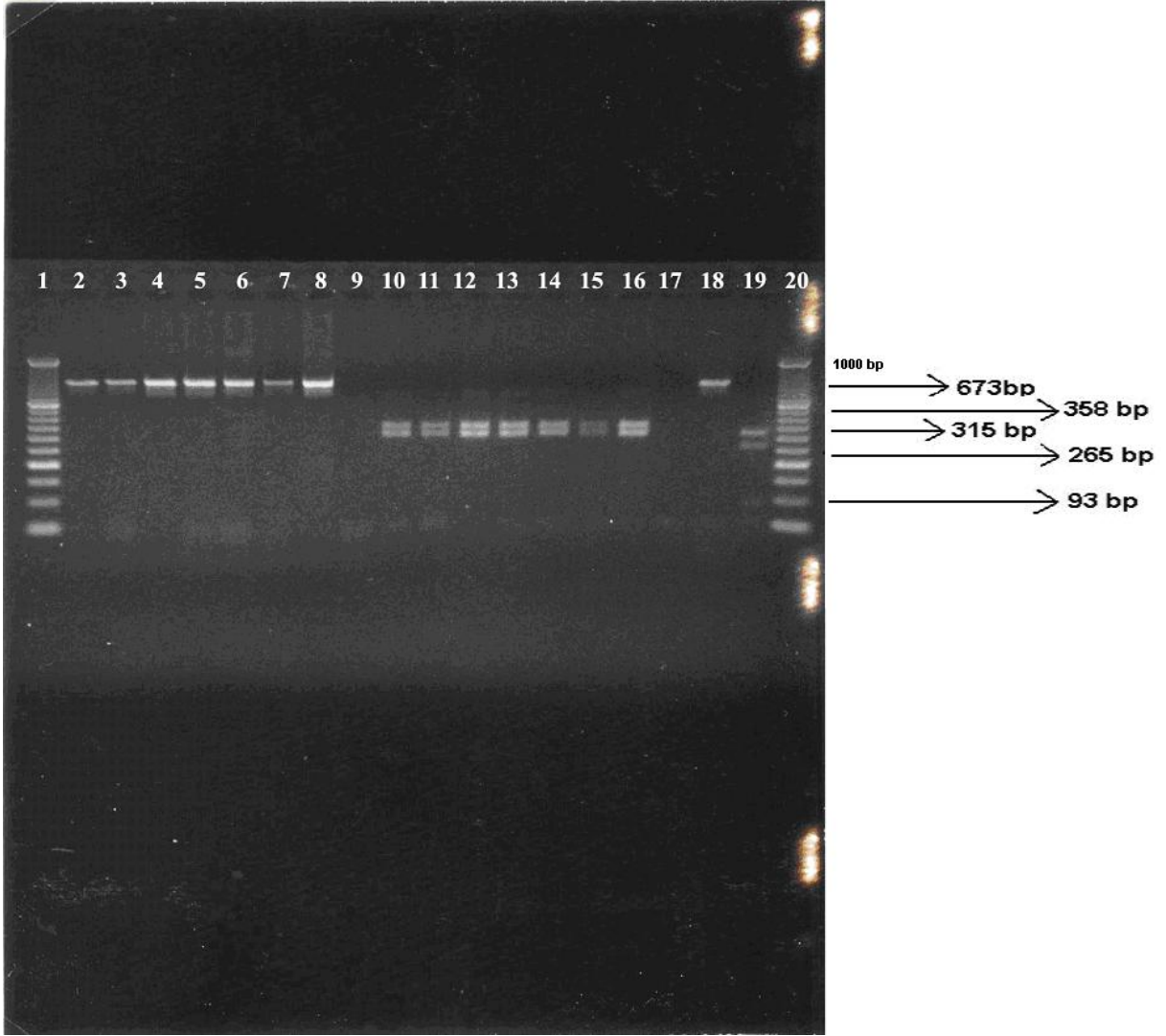
Her iki suş için elde edilen bantların jel görüntüleri şekil-1'de izlenmektedir.



Şekil- 1. DSY 289 ve DSY 347 *C. albicans* suşlarının REA sonrasında elde edilen jel görüntüsü

1. Marker (DNA ladder), 2. DSY 289 PZT ürünü, 3. DSY 289 REA ürünü, 4. DSY 347 PZT ürünü, 5. DSY 347 REA ürünü, 6. Negatif kontrol

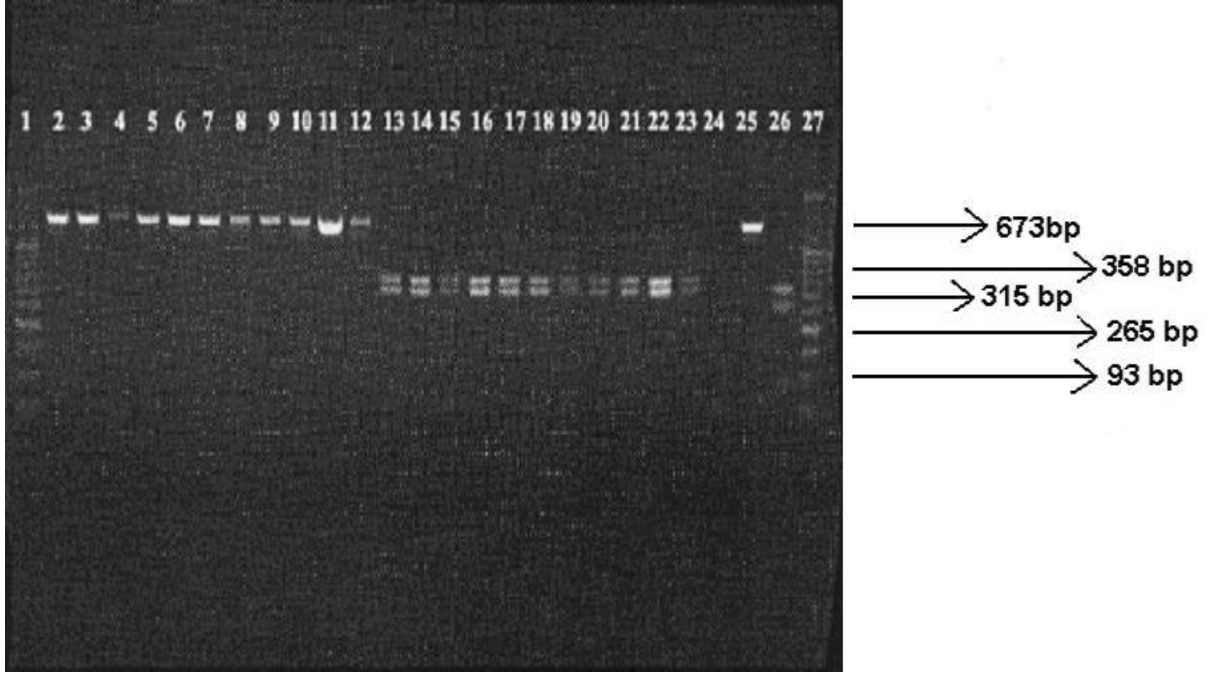
Çalışmaya flukonazole R/DBD yedi adet *C. albicans* suşu ile devam edildi ve söz konusu suşlarda 315 ve 358 bp'lik iki adet bant varlığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar şekil-2'de görülmektedir.



Şekil- 2. Flukonazole R/DBD *C. albicans* suşlarının REA görüntüsü

1. DNA ladder, 2. H1 PZT ürünü, 3. H2 PZT ürünü, 4. H3 PZTürünü, 5. B PZTürünü, 6. 1978 PZT ürünü, 7. 348 PZT ürünü, 8. 93-05 PZT ürünü, 9. Negatif kontrol, 10. H1 REA ürünü, 11. H2 REA ürünü, 12. H3 REA ürünü, 13. B REA ürünü, 14. 1978 REA ürünü, 15. 348 REA ürünü, 16. 93-05 REA ürünü, 17. Negatif kontrol, 18. DSY 289 PZT ürünü, 19. DSY289 REA ürünü, 20. DNA ladder

On adet D *C. albicans* suşu ile uygulanan REA çalışması sonucunda da 315 ve 358 bp'lik iki adet bant varlığı belirlendi. İzlenen REA ürünlerinin jel görüntüleri şekil-3'de görülmektedir.



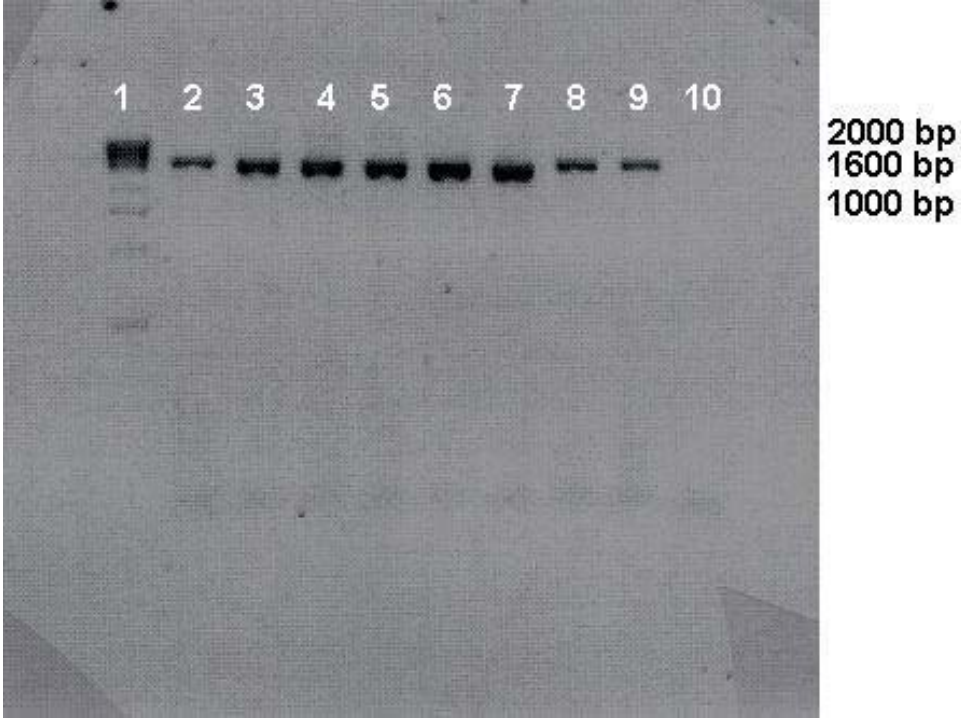
Şekil- 3. Flukonazole D on adet *C. albicans* suşu ile elde edilen REA ürünlerinin jel görüntüsü

1. DNA ladder, 2. 533 PZT ürünü, 3. 565 PZT ürünü, 4. 644 PZT ürünü, 5. 960 PZT ürünü, 6. 1221 PZT ürünü, 7. 1453 PZT ürünü, 8. 2157 PZT ürünü, 9. 2177 PZT ürünü, 10. 3-05 PZT ürünü, 11. 51-05 PZT ürünü, 12. DSY 347 PZT ürünü, 13. 533 REA ürünü, 14. 565 REA ürünü, 15. 644 REA ürünü, 16. 960 REA ürünü, 17. 1221 REA ürünü, 18. 1453 REA ürünü, 19. 2157 REA ürünü, 20. 2177 REA ürünü, 21. 3-05 REA ürünü, 22. 51-05 REA ürünü, 23. DSY 347 REA ürünü, 24. Negatif kontrol, 25. DSY 289 PZT ürünü, 26. DSY 289 REA ürünü, 27. DNA ladder

Sonuç olarak; çalışmaya alınan gerek flukonazole R/DBD gerekse flukonazole D suşlarda REA yöntemi ile Y132H mutasyonu ile ilişkili bant varlığı saptanmamıştır.

6.5. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması Sonuçları

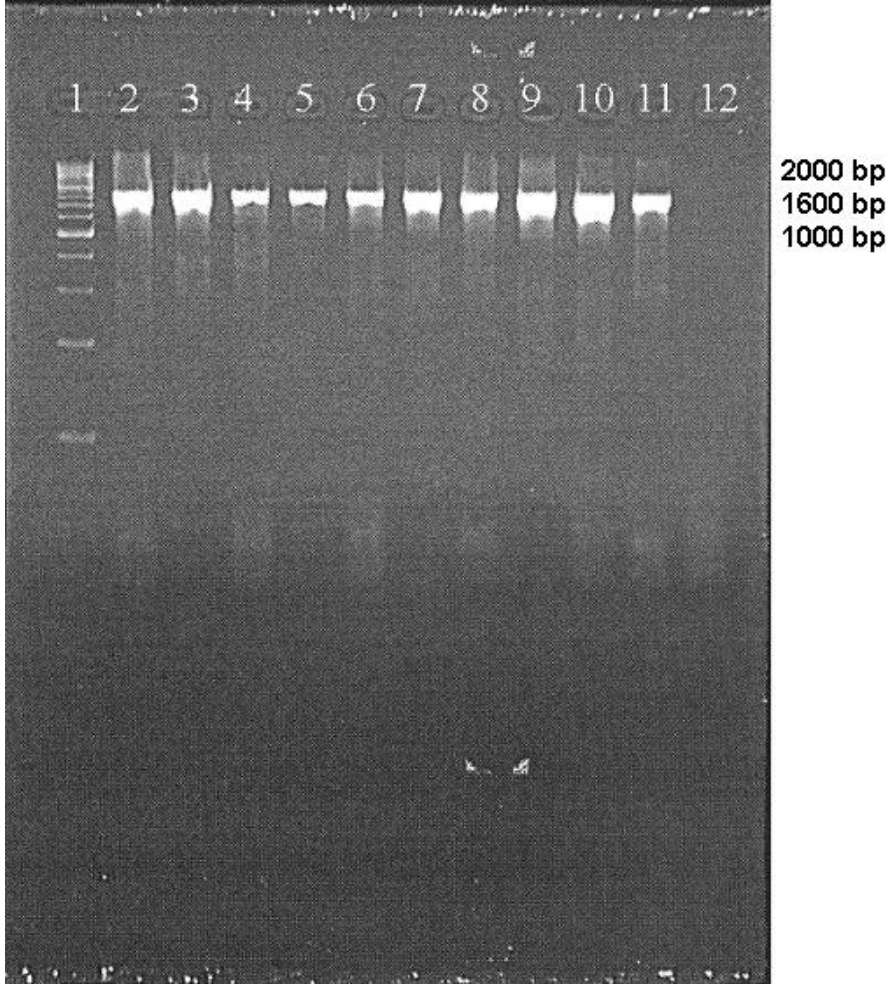
Flukonazole R/DBD ve D suşların tümünde dizi analizi öncesi PZT uygulaması sonucunda 1650 bp'lik ürün elde edildi. Flukonazole R/DBD suşların PZT görüntüsü Şekil-4'de izlenmektedir.



Şekil- 4. Flukonazole R/DBD *C. albicans* suşlarının dizi analizi öncesi yapılan PZT ürünlerinin jel görüntüsü

1. DNA ladder, 2. H1, 3. H2, 4. H3, 5. B, 6. 1978, 7. 348, 8. 93-05, 9. DSY 289, 10. Negatif kontrol

Flukonazole D on adet suşun dizi analizi öncesi yapılan PZT görüntüsü Şekil-5'de görülmektedir.



Şekil- 5. Flukonazole D *C. albicans* suşlarının dizi analizi öncesi yapılan PZT ürünlerinin jel görüntüsü

1. DNA ladder, 2. 533 , 3. 565, 4. 644, 5. 960, 6. 1221, 7. 1453, 8. 2157, 9. 2177, 10. 3-05, 11. 51-05 12. Negatif kontrol

6.5.1. Dizi Analizi Çalışması Sonuçları

Dizi analizi uygulaması sonucunda flukonazole R/DBD suşlarda D116E, K143R, D153E, E266D, S412T, G464S, G465S, R469K, V488I mutasyonları, D suşlarda ise D116E, K128T, E266D, L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H, V437I mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca flukonazole R/DBD ve D suşlarda amino asit değişimine yol açmayan sessiz mutasyonlar da saptanmış olup, dirençte rolü bulunmadığı düşünülerek tartışılmamıştır. Flukonazole R/DBD suşlardan 93-05 suşu ile D suşlardan 3-05 ve 1221 suşlarında mutasyon varlığı saptanmamıştır. Bu mutasyonlar içinde D116E, E266D, V437I, mutasyonları gerek

R/DBD suşlarda gerek D suşlarda bulunmaktadır. Söz konusu mutasyonlardan R suşlarda gördüğümüz S412T, R469K mutasyonları ile D suşlarda saptanan L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H mutasyonları daha önce literatürde *C. albicans* suşlarında bildirilmemiş mutasyonlardır. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda saptanan mutasyonların tümü 105-488 bp arasında bulunan ‘‘hot spot’’ bölge içerisinde yer almaktadır. Dizi analizi çalışması sonucunda saptanan amino asit değişimi sonuçları Tablo-3’de gösterilmiştir.

Tablo- 3. Flukonazole R/DBD ve D suşların amino asit değişimi sonuçları

| Suş No | Flukonazol MİK Değeri (µg/ml) | Amino Asit Değişimi |
|---------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| H1 | >64 | K143R E266D S412T R469K V488I |
| H2 | 16 | K143R E266D S412T R469K V488I |
| H3 | 32 | D116E E266D G464S G465S |
| B | 32 | K143R E266D V488I |
| 1978 | >64 | D116E E266D |
| 348 | >64 | D153E |
| 93-05 | >64 | - |
| 533 | 0.500 | E266D |
| 565 | 0.500 | E266D L281Y I282D T285H |
| 644 | 0.250 | E266D |
| 960 | 8 | D116E L280F L281M S284I |
| 1221 | 0.125 | - |
| 1453 | 0.250 | D116E |
| 2157 | 0.250 | V437I |
| 2177 | 0.500 | D116E K128T E266D |
| 3-05 | 4 | - |
| 51-05 | 1 | E266D L280Y L281M |

Dizi analizi sonucunda saptanan nükleotid değişiklikleri şekil 6'da, amino asit değişiklikleri ise şekil 7'de izlenmektedir.

| | | | | | | | | |
|--------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|----------|-----------|-------|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | |
| | | | | | | | | |
| X13296 | TCCCTTAGT | GTTACACAAC | CAGATCAGT | TATTATTAGGGG | TTCCATTTG | TTTACAAC | TTAGTATGG | CAAT |
| DSY289 | | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| | | | | | | | | |
| X13296 | ATTTATATT | CATTAGAAA | GATAGAGCT | CCATTAGTG | TTTTATTGG | ATTCCTTGG | TTGGTTCTG | CAGC |
| DSY289 | | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | | |

| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
|--------|---|--------------------|-------|-----------------------|----------|-------|-------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | TT | CATATGGTCAACAACCTT | TGAA | TTTTTCGAATCATGTCGTCAA | AGTATGGT | GATG | TATTTTCATTT |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
|--------|---|--------------|---------------|---------------------|-------------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| X13296 | ATGTTATTAGGGAAA | TTATGACGGTTT | ATTTAGGTCCAAA | AGGTCATGAATTTGTTTTT | AAATGCTAAAT | | |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| X13296 | TATCTGATGTTTCTGCTGAAGATGCTTATAAACATTTAACTACTCCAGTTTTTCGGTAAAGGGGTTATTTA | | | | | | |
| DSY289 | | | A | G | | | C |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | A | G | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | A | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | A | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | A | G | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | A | | | | C |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| X13296 | TGATTGTCCAAATTCAGATTAAATGGAAACAAAAAAATTTGCTAAATTTGCTTTGACTACTGATTCATTT | | | | | | |
| DSY289 | | | T | | | | |
| H1 | | | | | G | | |
| H2 | | | T | | G | | |
| H3 | | | T | | | | |
| B | | | T | | G | | |
| 1978 | | | T | | | | |
| 348 | | | | | | | G |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | T | | | | |
| 565 | | | T | | | | |
| 644 | | | T | | | | |
| 960 | | | T | | | | |
| 1221 | | | T | | | | |
| 1453 | | | T | | | | |
| 2157 | | | T | | | | |
| 2177 | | | T | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 |
|--------|---|-----------|----------|------------|-------------|------------|-------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | ATCTTTATTTG | GATGAAATG | GAGAAGAA | TTTTTGACCG | TTCAATTTGCT | CAACTATATT | CTGATTTAGAT |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

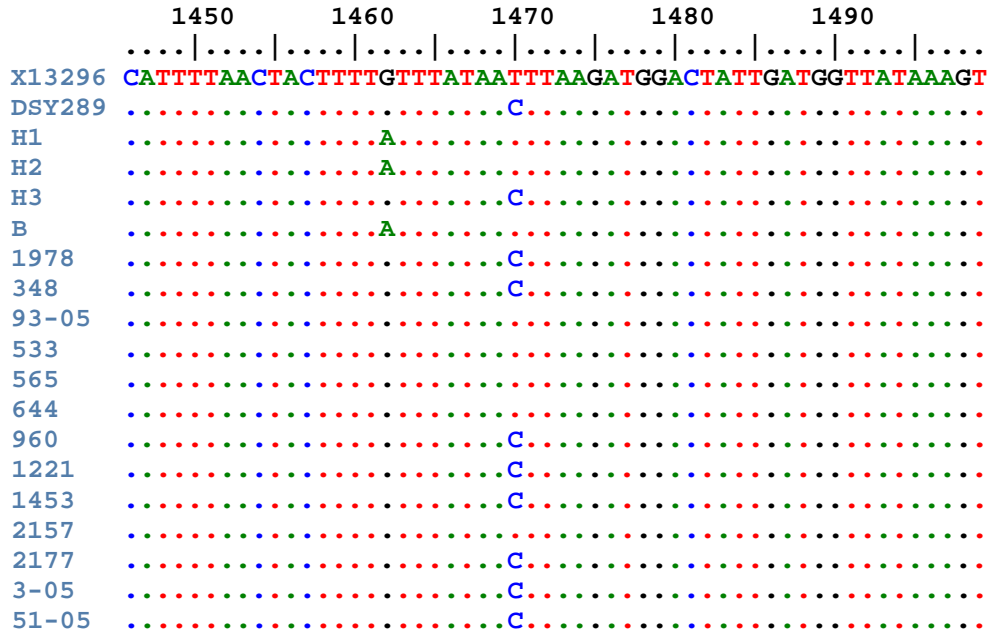
| | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | 730 | 740 |
|--------|---|-----------|-----------|------------|------------|-----------|---------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | AAAGGTTTTAC | CCCTATTAA | TTTTGTTTT | CCCTAAATTT | ACCTTTACCT | CATTATTGG | GAGCGTGATGCTG |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 890 | 900 | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 |
|--------|---|---------------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| X13296 | GAAATTGCTAATCTTTTAA | TGGTATTCTTATGGGTGGT | CAACATACTTCTGCTTCTACTTCTGCTTGGT | | | | |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 |
|--------|---|-------|-------|-------|-------------|-------|-------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | TCTTGTTACATTTAGGTGAAAAACCTCATTACAGATGTTATTTATCAAGAAGTTGTTGAATTATTGAA | | | | | | |
| DSY289 | | | | | | |G..... |
| H1 | | | | |C..... | | |
| H2 | | | | |C..... | | |
| H3 | | | | | | |G..... |
| B | | | | |C..... | | |
| 1978 | | | | |C..... | | |
| 348 | | | | |C..... | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | |C..... | | |
| 565 | | | | |C..... | | |
| 644 | | | | |C..... | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | |C..... | | |
| 1453 | | | | | | |G..... |
| 2157 | | | | |C..... | | |
| 2177 | | | | | | |G..... |
| 3-05 | | | | |C..... | | |
| 51-05 | | | | |C..... | |G..... |

| | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 |
|--------|---|----------|-----------|----------|-----------|-------------|-------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | AGAAAAAGGTG | GATTTGAA | TGATTTGAC | TTATGAAG | TTTACAAAA | TTACCATCAG | TCAATAACACT |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | G..... | | | | | | |
| H2 | G..... | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | G..... | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | |G..... | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | G..... | | | | | | |
| 565 | G..... | | | | | | |
| 644 | G..... | | | | | | |
| 960 | | | | | |G..... | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | |G..... | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 |
|--------|---|-------------|------------|------------|--------------|--------------|----------|
| | | | | | | | |
| X13296 | ATTAAAGGAACT | CTCAGAA | TGCATATGCC | ATTACATTCT | ATTTTTTAGAAA | AGTTACTAACCC | ATTAAGAA |
| DSY289 | |T..... | | | | | |
| H1 | |T..... | | | | | |
| H2 | |T..... | | | | | |
| H3 | |T..... | | | | | |
| B | |T..... | | | | | |
| 1978 | |T..... | | |C..... | | |
| 348 | |T..... | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | |T..... | | | | | |
| 565 | |T..... | | | | | |
| 644 | |T..... | | | | | |
| 960 | |T..... | | | | | |
| 1221 | |T..... | | | | | |
| 1453 | |T..... | | | | | |
| 2157 | |T..... | | |C..... | | |
| 2177 | |T..... | | | | | |
| 3-05 | |T..... | | | | | |
| 51-05 | |T..... | | | | | |



Şekil- 6. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda dizi analizi ile saptanan nükleotid değişiklikleri sonuçları

| | | | | | | | | |
|--------|---------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|
| | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | |
| | | | | | | | | |
| X13296 | SLSVTQQ | ISILLG | VPFVYN | LVWQY | LYSLRK | DRAPLV | FYWI | PWFGSA |
| DSY289 | | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | | |

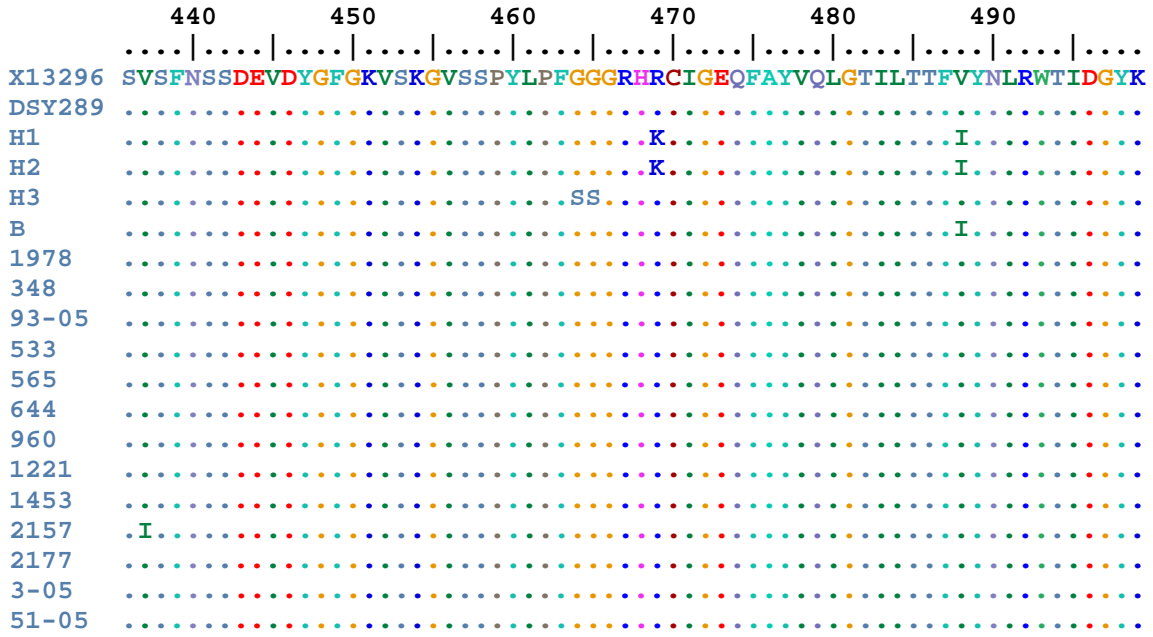
| | | | | | | | | |
|--------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | |
| | | | | | | | | |
| X13296 | MLLGKIM | TVYLGPK | GHEFVFN | AKLSDV | SAEDAY | KHLTTP | VFGKGV | IYDCPN |
| DSY289 | | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | | |

| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 |
|--------|---|--------|---------|-------|-------|-------|----------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | KRYV | PKIREE | ILNYFVT | DESF | KLKEK | THG | VANVMKTQPEITIF |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 |
|--------|---|---------|--------|-------|-------|-------|-------------------------|
| | | | | | | | |
| X13296 | KGFT | PINFVFP | NLPLPH | YWRD | AAQK | ISATY | MKEIKLRRERGDIDPNRDLIDSL |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| X13296 | EIANLLIGILMGGQHTSASTSAWFLHLGKPHLQDVLYQEVVELLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPSVNNT | | | | | | |
| DSY289 | | | | | | | |
| H1 | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |

| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 |
|--------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |
| X13296 | IKETLRMHMPLHSIFRKVTNPLRIPETNYIVPKGHYVLVSPGYAHTSERYFDNPEDFDPTRWDTAAAKAN | | | | | | |
| DSY289 | | | | | F | | |
| H1 | | | | | | T | |
| H2 | | | | | | T | |
| H3 | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| 1978 | | | | | | | |
| 348 | | | | | | | |
| 93-05 | | | | | | | |
| 533 | | | | | | | |
| 565 | | | | | | | |
| 644 | | | | | | | |
| 960 | | | | | | | |
| 1221 | | | | | | | |
| 1453 | | | | | | | |
| 2157 | | | | | | | |
| 2177 | | | | | | | |
| 3-05 | | | | | | | |
| 51-05 | | | | | | | |



Şekil- 7. Flukonazole R/DBD ve D suşlarda dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları

6.6. İlaç Atım Pompalarının Substrat ve İnhibitör Maddeler ile Duyarlılık Çalışması Sonuçları

Çalışmada flukonazole R *C. albicans* suşu DSY 289 ve flukonazole R *C. albicans* suşu DSY 292 kontrol suşları olarak kullanıldı. DSY 289 suşu *ERG11* geni aşırı ekspresyonu ile birlikte *CDRI* aşırı ekspresyonu olan Y132H ve S405F mutasyonları bulunan bir suş olup; DSY 292 suşu *ERG11* geni ile birlikte *MDRI* aşırı ekspresyonu olan ve G464S, R467K mutasyonları bulunan bir suştur. Söz konusu kontrol suşları ile beraber yedi adet flukonazole R/DBD ve on adet flukonazole D olarak belirlediğimiz *C. albicans* suşları çalışmaya dahil edildi. Sonuçlar değerlendirilirken, gözle üreme kontrole göre tam inhibisyon olan kuyucuktaki değer MİK olarak kabul edildi.

6.6.1. Substrat Grubu Maddeler ile Duyarlılık Çalışması

Duyarlılık çalışmasında Cdrp salınımını sağlayan substrat olarak rodamin6G, Mdrp salınımını sağlayan substratlar olarak 4-nitrokinolinN-oksit (4NQO) ve fenantrolin kullanıldı. Cdrp substratı olan rodamin6G için, DSY 289 suşunun MİK değeri olan 2 µg/ml ve DSY 292

suşunun MİK değeri olan 1µg/ml değerleri göz önüne alınarak tüm suşlar değerlendirildiğinde; 1µg/ml altında değer olmadığı, H1 suşunda iki kat, H3 ve B suşlarında dört kat artış bulunduğu belirlendi. 1978, 348, 93-05 numaralı suşların MİK değerleri ise 1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml olarak saptandı.

Mdrp substratı olan 4NQO için DSY 289 suşunun MİK değeri 0.015 µg/ml, DSY 292 suşunun MİK değeri 0.030 µg/ml olarak belirlendi. Bu değerlere göre; çalışmaya alınan suşların MİK sonuçları incelendiğinde H1 suşunun 0.250 µg/ml ile kontrollere göre yüksek, 1978, 348, 93-05 suşlarının ise 0.030 µg/ml değerleri ile DSY 292 suşu ile aynı değerde, diğer suşların MİK değerlerinin ise 0.030 µg/ml altında olduğu belirlendi.

Bir diğer Mdrp substratı olan fenantrolin ile yapılan duyarlılık çalışması sonucunda; DSY 289 suşunun MİK değeri 1 µg/ml, DSY 292 suşunun MİK değeri ise 2µg/ml olarak belirlendi. Çalışmaya alınan H3 ve B suşu dışında tüm suşların fenantrolin için MİK değerleri 2 µg/ml, H3 ve B suşunun ise 1 µg/ml olarak saptandı. Substrat grubu maddeler ile gerçekleştirilen duyarlılık çalışmasının sonuçları Tablo-4'de izlenmektedir.

Tablo- 4. Flukonazole R/DBD olarak belirlenen *C. albicans* suşları ile kontrol suşlarının substrat grubu maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları*

| Suş No | Antifungallerin MİK Değerleri (µg/ml) | | | Substratların MİK Değerleri (µg/ml) | | |
|---------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------------|--------|-------------|
| | Flukonazol | İtrakonazol | Ketokonazol | Rodamin6G | 4NQO** | Fenantrolin |
| DSY 289 | >64 | >2 | 4 | 2 | 0.015 | 1 |
| DSY 292 | >64 | 1 | 2 | 1 | 0.030 | 2 |
| H1 | >64 | 4 | 4 | 2 | 0.250 | 2 |
| H2 | 16 | 2 | 2 | 1 | 0.015 | 2 |
| H3 | 32 | 2 | 2 | 4 | 0.015 | 1 |
| B | 32 | 1 | 2 | 4 | 0.015 | 1 |
| 1978 | >64 | >8 | >16 | 1 | 0.030 | 2 |
| 348 | >64 | 2 | 2 | 1 | 0.030 | 2 |
| 93-05 | >64 | 0.500 | 0.500 | 2 | 0.030 | 2 |

*Çalışma iki kez tekrarlanmıştır.

**4NQO: 4-nitrokinolinN-oksit

Flukonazole D *C. albicans* suşlarının substrat grubu maddeler ile gerçekleştirilen duyarlılık çalışmasının sonuçları ise Tablo-5’de görülmektedir.

Tablo- 5. Flukonazole D olarak belirlenen *C. albicans* suşları ile kontrol suşlarının substrat grubu maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları*

| Suş No | Antifungallerin MİK Değerleri (µg/ml) | | | Substratların MİK Değerleri(µg/ml) | | |
|---------|---------------------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|--------|-------------|
| | Flukonazol | İtrakonazol | Ketokonazol | Rodamin6G | 4NQO** | Fenantrolin |
| DSY 289 | >64 | >2 | 4 | 2 | 0.015 | 1 |
| DSY 292 | >64 | 1 | 2 | 1 | 0.030 | 2 |
| 533 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 1 | 0.015 | 1 |
| 565 | 0.500 | 0.250 | 0.030 | 1 | 0.030 | 1 |
| 644 | 0.250 | 0.250 | 0.030 | 1 | 0.030 | 1 |
| 960 | 8 | 0.250 | 0.030 | 2 | 0.030 | 1 |
| 1221 | 0.125 | 0.250 | 0.030 | 2 | 0.030 | 1 |
| 1453 | 0.250 | 0.500 | 0.030 | 2 | 0.015 | 1 |
| 2157 | 0.250 | 0.500 | 0.060 | 1 | 0.015 | 1 |
| 2177 | 0.500 | 0.500 | 0.060 | 2 | 0.015 | 1 |
| 3-05 | 4 | 0.500 | 0.030 | 2 | 0.015 | 1 |
| 51-05 | 1 | 0.500 | 0.030 | 1 | 0.030 | 1 |

*Çalışma iki kez tekrarlanmıştır.

**4NQO: 4-nitrokinolinN-oksit

6.6.2. İnhibitör Maddeler ile Duyarlılık Çalışması Sonuçları

Pompa inhibitörleri olarak etkili olan ibuprofen, β -östrodiol, progesteron, verapamil'in hammaddeleri kullanılarak, yedi adet flukonazole R/DBD ve on adet de flukonazole D olarak belirlediğimiz *C. albicans* suşları ile kontrol suşları olarak DSY 289 ve DSY 292 suşları çalışmaya dahil edildi. Sonuçlar 24. ve 48. saatte gözle ve spektrofotometrik olarak değerlendirilerek inhibitörlerin varlığında flukonazol için MİK değerleri belirlendi. Daha sonra suşların önceki flukonazol MİK değerleri ile karşılaştırıldı.

Çalışma sonucunda DSY 289 ve DSY 292 suşlarının inhibitör maddeler varlığında flukonazol için MİK değerleri ibuprofen ve β -östrodiol için 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanırken, progesteron ve verapamil için >64 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu. Kontrol suşlarının MİK değerleri göz önünde bulundurularak tüm suşların sonuçları belirlendi. Buna göre H1, H2, H3, suşlarının inhibitörlerle elde edilen flukonazol MİK değerleri 64 $\mu\text{g/ml}$ ve üzerinde, B suşu için ise 64 $\mu\text{g/ml}$ ve 32 $\mu\text{g/ml}$ değerler olarak saptanırken, hastanemizden soyutlanan 1978, 348, 93-05 suşlarının MİK değerlerinin oldukça düşük olduğu görüldü. Tablo-6'de inhibitör maddeler varlığında belirlenen flukonazol MİK değerleri belirtilmektedir.

Tablo- 6. Flukonazole R/DBD *C. albicans* suşlarının inhibitör maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları*

| Suş No | Flukonazol | İnhibitör Maddelerin Varlığında Flukonazol MİK Değerleri(µg/ml) | | | |
|---------|------------|---|-------------|-------------|-----------|
| | | İbuprofen | β-Östrodiol | Progesteron | Verapamil |
| DSY 289 | >64 | 64 | 64 | >64 | >64 |
| DSY 292 | >64 | 64 | >64 | >64 | >64 |
| H1 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 |
| H2 | 16 | >64 | 64 | >64 | 64 |
| H3 | 32 | >64 | >64 | 64 | 64 |
| B | 32 | >64 | 32 | 32 | 64 |
| 1978 | >64 | 4 | 1 | 2 | 0.500 |
| 348 | >64 | 2 | 1 | 2 | 0.500 |
| 93-05 | >64 | 1 | 1 | 2 | 0.500 |

*Çalışma iki kez tekrarlanmıştır.

Flukonazole D on adet *C. albicans* suşunun inhibitör maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları ise Tablo-7’de gösterilmiştir.

Tablo- 7. Flukonazole D *C. albicans* suşlarının inhibitör maddeler ile duyarlılık çalışması sonuçları*

| Suş No | Flukonazol | İnhibitör Maddelerin Varlığında Flukonazol MİK Değerleri (µg/ml) | | | |
|--------|------------|--|-------------|-------------|-----------|
| | | İbuprofen | β-Östrodiol | Progesteron | Verapamil |
| 533 | 0.500 | 2 | 1 | 0.500 | 1 |
| 565 | 0.500 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| 644 | 0.250 | 4 | 2 | 2 | 0.500 |
| 960 | 8 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| 1221 | 0.125 | 4 | 1 | 0.500 | 1 |
| 1453 | 0.250 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| 2157 | 0.250 | 2 | 4 | 1 | 0.500 |
| 2177 | 0.500 | 2 | 4 | 1 | 0.500 |
| 3-05 | 4 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| 51-05 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 |

*Çalışma iki kez tekrarlanmıştır.

7. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Farklı pompa inhibitörleri ile dirençli suşların flukonazol MİK değerlerindeki azalmalar karşılaştırıldığında, belirlenen korelasyon katsayıları: ibuprofen ile β-östrodiol arasında $r=0.867$, ibuprofen ile progesteron arasında $r=0.867$, ibuprofen ile verapamil arasında $r=0.894$, β-östrodiol ile progesteron arasında $r=0.912$, β-östrodiol ile verapamil arasında $r=0.930$, progesteron ile verapamil arasında $r=0.930$ şeklinde saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda tüm pompa inhibitörlerinin benzer ve paralel bir etki gösterdiği ve de flukonazol MİK değerlerinde korele bir azalmaya yol açtığı söylenebilir.

7. TARTIŞMA

Uzun yıllar fungusların klinik olarak önemsiz olduklarına inanılmış, ancak son yirmi yıl içerisinde invaziv fungal infeksiyonların sıklığındaki artış önemli bir boyuta ulaşmıştır. Fungal infeksiyonlar risk grubundaki bireylerde daha fazla görülmekte olup, yoğun bakım, hematoloji, onkoloji, transplantasyon gibi ünitelerde uygulanan invaziv tanı ve sağaltım teknikleri fungal infeksiyonların görülme sıklığını arttırmaktadır (123). Bu nedenle *Candida* ve *Aspergillus* gibi etkenler ile oluşan fungal infeksiyonlarda artış görülmektedir. *Candida* türleri içerisinde *C. albicans* en sık görülen etken olmakla birlikte, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* gibi non-*albicans* türlerde de artma izlenmektedir (124).

İnvaziv kandidoz terimi; kandidemi, yaygın kandidoz, derin organ tutuluşu, endokardit, menenjit, orofaringeal ve özefageal kandidoza kadar birçok organ tutuluşunu içermektedir (4). Kandidozun tüm formlarının sağaltımında flukonazol ilk seçenek olarak kullanılmaktadır.

Azollerin özellikle flukonazolün kandidoz tablolarının sağaltımında ve profilaksisinde yaygın kullanımı direnç sorununu da beraberinde getirmiştir. Flukonazole dirençli *C. albicans* infeksiyonları nötropenik, maligniteli, hemodiyaliz, mekanik ventilasyon veya operasyon uygulanan, kronik mukokütanöz kandidozlu, HIV(+) olgularda bildirilmiştir (2). Çalışmalarda *Candida* türlerinin flukonazole karşı olan direnci, in vitro duyarlılık testleri ve moleküler yöntemlerin kullanımıyla saptanabilmektedir (124).

Candida türleri ve antifungal duyarlılıklarına ilişkin veriler toplumsal sürveyans programları olan “Centers for Disease Control” (CDC), NEMIS, SENTRY, ARTEMIS çalışmalarında sunulmaktadır (76,107). 1997-2000 yılları arasında SENTRY programı ile A.B.D., Kanada, Latin Amerika, Avrupa’daki merkezlerden kandidemi etkeni olarak soyutlanan 2047 adet *Candida* spp. içerisinde 1144 *C. albicans* suşu saptanmış, bu suşların flukonazole direnç oranı %1 olarak bildirilmiştir (125). SENTRY-2003 programı ile toplam 1397 *Candida* spp.’nin %48.7’si *C. albicans* olarak saptanmış ve *C. albicans* suşlarında flukonazole direnç oranı %0.4 olarak belirlenmiştir (126). 1992-2004 yılları arasında Iowa Üniversitesi referans laboratuvarında 200 kadar farklı merkezden gönderilen 13,338 adet 12 farklı *Candida* türünün CLSI M27-A2 standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol duyarlılığı araştırıldığında tüm *Candida* türlerinin flukonazol direnç oranı %3, *C. albicans* direnç oranı ise % 0.06 olarak bildirilmiştir (107). A.B.D.’de iki ayrı merkezde

1995-1999 yılları arasında kandidemi etkeni olarak soyutlanan toplam 2000 adet *Candida* spp. izolatının 733'ü (%36.6) *C. albicans* olup, bu suşların flukonazole direnç oranı %5, AmB direnç oranı %0.5 flusitozin direnç oranı ise %3 olarak bulunmuştur (127). A.B.D.'de 1998-2000 yılları arasında kandidemi etkeni olarak soyutlanan 1143 *Candida* suşunun 423'ü (%37.0) *C. albicans* olarak saptanmış ve flukonazole direnç oranı ise %1.2 olarak belirtilmiştir (128). Kennedy ve arkadaşlarının (129) onkoloji hastası çocukların orofaringeal sürüntü örnekleri ile kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* spp. izolatlarının flukonazol ve itrakonazol duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmada, orofaringeal 100 *Candida* suşu içinde bir *C. albicans* ve iki *C. glabrata* suşu flukonazole dirençli, iki *C. glabrata* suşu itrakonazole dirençli olarak bulunmuştur. Kan kültürlerinden soyutlanan dokuz *Candida* spp. izolatından flukonazole ve itrakonazole dirençli suş saptanmamıştır.

Gülay ve arkadaşlarının (130) anestezi yoğun bakım servisinde yatan 29 hastanın idrarından soyutlanan 38 *C. albicans* izolatının flukonazol ve AmB duyarlılıklarını mikrodilüsyon yöntemi ile inceledikleri ve RAPD-PZT yöntemi ile epidemiyolojik izlemine yaptıkları çalışmada; flukonazole dirençli suş saptanmamış olup, bir suş flukonazole DBD olarak bulunmuştur. AmB'ye ise dirençli suş saptanmamıştır. Arıkan ve arkadaşlarının (131) kan kültürlerinden soyutlanan 107 maya suşunun flukonazol, AmB, itrakonazol duyarlılıklarını mikrodilüsyon yöntemi ile inceledikleri çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonucunda *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* olarak üç suş flukonazole DBD, itrakonazole orta duyarlı olarak bulunmuştur. Buna göre suşların soyutlandığı hastanede invitro antifungal direncin önemli boyutta olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Çoşkun ve arkadaşları (132), kandidemili hastalardan elde edilen 57 *Candida* suşunun flukonazol ve AmB'ye duyarlılıklarını araştırmışlar, *C. albicans* suşlarının flukonazol direncini %75 (18/24), tüm *Candida* türlerinin flukonazol direncini ise %40.3 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada AmB'ye dirençli *C. albicans* suşu saptanmamıştır. Araştırmacılar söz konusu yüksek flukonazol direnç oranını suşların aynı merkezden soyutlanmış olmaları ve aynı hastanede dirençli mikroorganizmanın kalıcılığına bağlamışlardır. Hastanemizde yapılan ve yoğun bakım hastalarından soyutlanan 86 *Candida* suşunun flukonazol ve AmB duyarlılıklarının incelendiği bir çalışmada tüm suşlar AmB'ye duyarlı bulunurken üç (3/9) *C. glabrata* suşunda flukonazole direnç; dört (4/47) *C. albicans*, iki (2/14) *C. tropicalis* ve üç (3/10) *C. parapsilosis* suşunda flukonazole doza bağımlı duyarlılık saptanmıştır (133).

Çalışmamız kapsamında, duyarlılık çalışmasına alınan Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Mikoloji laboratuvarında Aralık 2003-Ocak 2005 tarihleri arasında soyutlanan 650 adet *C. albicans* suşundan üçünün (%0.46) flukonazole dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu oran yukarıda vurguladığımız genel veriler ile paralellik göstermektedir. Çalışmaya dahil edilen flukonazole R/DBD tüm suşların biri dışında flusitozine de R, tümü AmB'ye D bulunduğu, biri dışında itrakonazol ve ketokonazole R olduğu saptanmıştır. Azollere duyarlılık sonuçlarımız gerek yurt dışı ve gerek yurtiçi (Çoşkun ve arkadaşlarının sonuçları dışında) çalışma bulguları ile uyum göstermektedir (107,127-133).

Duyarlılık çalışması sonucunda flukonazole R/DBD olarak belirlenen suşlar REA ve dizi analizi için PZT'ne alınmıştır. Mikoloji alanında PZT'nin özgün bir test olarak kullanılabilmesi için DNA eldesinin hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir (134). Bu nedenle fungal DNA eldesi kritik bir basamağı oluşturmakta ve son yıllarda geliştirilmiş birçok protokol bulunmaktadır. Protokoller esas olarak sert hücre duvarının parçalanmasını hedef almakta, basit lizis yöntemlerinden fiziksel parçalanma, enzimatik parçalanma, sıvı nitrojen ile dondurma, sonikasyon gibi yöntemler uygulanmaktadır (135). Bunun yanında fungal hücre duvarının parçalanması "zimolaz", "litikaz", "mureinaz", "β-1,3-glukanaz" gibi enzimler yardımı ile de gerçekleştirilmektedir. Ayrıca etilen diamin tetra asetat (EDTA), sodyum dodesil sülfat (SDS) veya proteinaz K bir veya daha fazla sayıda uygulanmaktadır. DNA ekstraksiyonu için "in house" yöntemlerin yanı sıra ticari kitler de kullanılmaktadır (136).

Löffler ve arkadaşları (134) kendi geliştirdikleri "in house" yöntem ile beş ekstraksiyon kitini duyarlılık, zaman ve maliyet açısından karşılaştırdığında, tüm ticari kitlerin DNA ekstraksiyonu için harcanan süreyi kısalttığını, ancak maliyeti arttırdığını bulmuşlardır. Bu ticari kitler arasında "QIAmp Tissue" kitin (Qiagen, Los Angeles, A.B.D.) "in house" yöntem ile aynı duyarlılık (1-10 hücre/ ml) ve saflıkta fungal DNA açığa çıkardığı ve kitlerin PZT sonuçlarının %99 uyumlu olduğu bildirilmiştir.

Lugert ve arkadaşları (137) *C. albicans*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*'dan DNA ekstraksiyonu için ticari kitlerle birlikte, mekanik, enzimatik, termik-enzimatik olmak üzere uyguladıkları farklı yöntemleri, süre ve duyarlılık açısından karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda duyarlılığı *C. albicans* için 9×10^1 , *A. fumigatus* için 9×10^2 , *S. cerevisiae* için 9×10^1 hücre olarak belirlemişlerdir. Yazarlar kit ile beraber termik-enzimatik yöntem kullanılarak

yapılan ekstraksiyonun en duyarlı yöntem olduğunu, ancak uzun süre gerektirdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda uyguladığımız ekstraksiyon yöntemi ise EDTA, litikaz, sorbitol tampon, kullanılarak Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya) ile kit prosedürü doğrultusunda DNA eldesi şeklinde gerçekleştirilmiş olup, ekstraksiyon aşamasında bir sorun yaşanmamıştır (115).

White ve arkadaşları (138) *ERG11* mRNA ile *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* mRNA ekspresyonunu “nothern blotting” (NB) analizi ile hücre büyüme fazları boyunca araştırmıştır. Bunun için R/DBD ve D *C. albicans* suşlarını 24 saat YPD agar ve onu takiben bir gecelik YPD buyyon inkübasyonuna almışlar ve sonuçta R/DBD ve D *C. albicans* suşlarında *ERG11* mRNA ekspresyonunun logaritmik faz boyunca sürdüğünü saptamışlardır. Çalışmamız kapsamında DNA ekstraksiyonu öncesinde 48 saat YPD agar ve onu takiben 48 saat YPD buyyonda inkübasyon uygulaması ile *ERG11* geni ekspresyonu için uygun logaritmik faz sağlanmıştır.

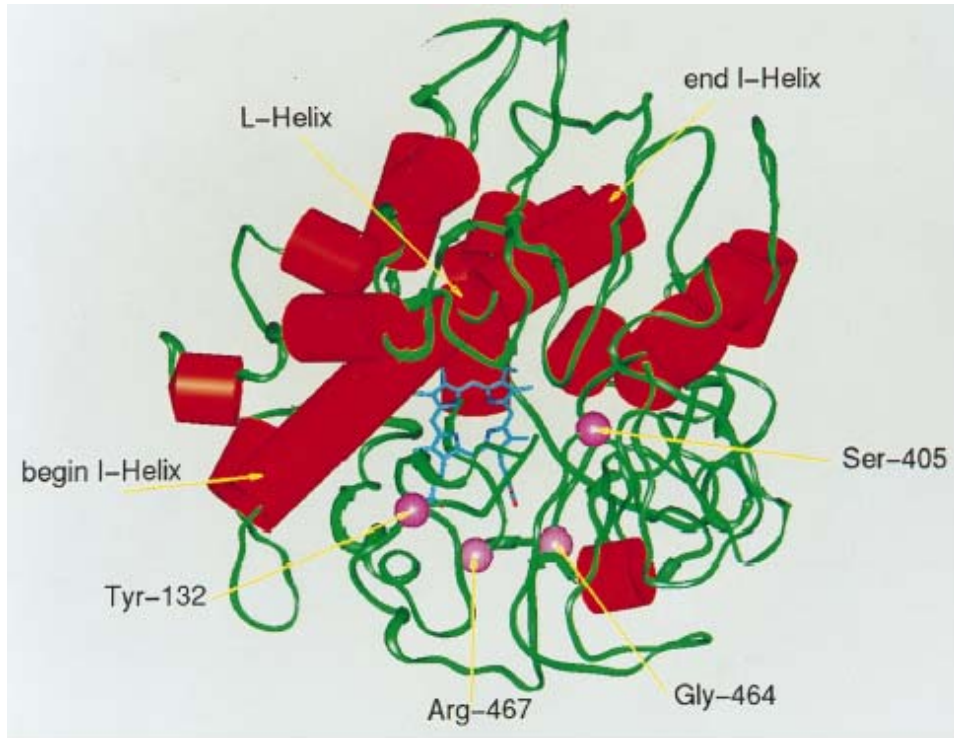
Çalışmamızda dizi analizi için PZT uygulaması sırasında kullandığımız AmpliTaqGold DNA polimeraz enzimi ultra saflıkta, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip, düşük kopya sayılı patojenlerin ve degrade örneklerin çoğaltılmasını sağlayan bir enzim olup, özellikle dizi analizi ve klonlama çalışmalarında kullanılmaktadır (139,140).

Flukonazolün etki gösterdiği sitokrom P450 14 alfa demetilaz enzimi, CYP51 süper ailesinin bir üyesi olup, insan genomu dışında hayvanlar, yüksek bitkiler, ökaryotlar ve bazı prokaryotlarda bulunmaktadır. İnsan genomunda bulunan sitokrom P450 proteinlerinin bilinen fonksiyonlarından bir tanesi ilaçların metabolizması olup, yağ asitleri ve yağda eriyen vitaminlerle safra asitleri, steroidler ve kolesterolün metabolizmasında da rol oynamaktadır. Bu nedenle CYP51 süper ailesi özellikle ilaç araştırmalarında, gen terapilerinde, kanser ile ilgili birçok alanda gelecek açısından dikkat ve ilgi çekici olmaktadır (141).

Mayalarda Erg11p olarak bilinen lanosterol 14 alfa demetilaz enzimi fungal canlılık için gereklidir. Bu enzim lanosterolün ergosterole dönüşümünde lanosterol ve diğer sterol prekürsörlerinden monooksidasyon tepkimesi ile 14 alfa metil grubunun uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Enzimin flukonazol ile inhibisyonu, 14 alfa metil grubunun hidrosilasyonu için gereken oksijen aktivasyonunu engellemektedir. Bunun sonucunda lanosterol ve 14 alfa

metil steroidlerin birikimi ve ergosterol tüketimi ile hücre ölümü gerçekleşir (142,143). Ayrıca hedef enzimin alfa helix veya beta zincir gibi yapılarında oluşan mutasyonlar nedeniyle meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu bağlanmalar etkilenecek afinite azalması ile direnç gelişmektedir.

Son araştırmalar ile bu enzimin üç boyutlu yapısına ilişkin bilgiler oluşturularak; enzimin yapı ve fonksiyonu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Dizi benzerliği göstermediği halde topolojileri oldukça benzer olan dört prokaryot'un sitokrom P450 enzimlerinin kristal yapıları göz önüne alınarak *C. albicans* için yeni bir model oluşturulmuştur. Oluşturulan bu model ile enzimin fonksiyonu ve substratlarla ilişkisi açıklanmaya çalışılmaktadır (143). Bu çalışmalar sonucunda, enzimin transmembran kısmından başlayarak alfa heliks yapıları ifade eden A, B, B', C, D, E, F, G, H, I, J, J', J'', K, L gibi kısımlardan oluştuğu varsayılmaktadır. Bu bölgeler içinde en uzun olan I heliks bölgesi olup, hem bölümü I heliks distali ile L heliks proksimali arasında yer almaktadır (117). Bu bölgenin *C. albicans*'daki üç boyutlu görünümü Şekil 8'de izlenmektedir.



Şekil- 8. *C. albicans* sitokrom P450 lanosterol 14 alfa demetilaz enziminin üç boyutlu görünümü (146 no'lu kaynaktan alınmıştır)

Hem'in demir atomu için gereken tiyolat bağını, tüm ökaryotlarda bulunan C470 sağlamakta ve C470 sistein paketi içerisinde yer almaktadır. Hem demiri için gereken redoks potansiyeli de sistein paketi tarafından sağlanmakta ve sistein paketi bu potansiyeli redüktazları aracılığıyla tanıdığı elektron alımı ile gerçekleştirmektedir (143). Alfa heliks yapılarından E, L, I, hidrofobik, A, C, D, E, F, G heliks gibiler ise hidrofilik olup; bu bölgelerle birlikte hem bağlanma bölgesi, oksijen bağlanma bölgesi, substrat bağlanma bölgeleri oldukça korunmuş bölgeler olarak kabul edilmektedir (143). Substrat bağlanma bölgeleri enzimin iç kısmında gömülü durumda bulunmaktadır ve substrat giriş kanalına ulaştıktan sonra aktif bağlanma bölgesine doğru yönlendirilmektedir. SRS-0-1-2-3-4-5-6 olarak toplam yedi adet substrat bağlanma bölgesi mevcut olup, korunmuş bölgelerle üst üste çakıştığı varsayılmaktadır (144).

Marichal ve arkadaşları (117) yabancı tip *C. albicans* 'larda üç adet "hot spot" bölge tanımlayarak enzimin nokta mutasyonlarının bu üç bölgede kümelenmiş olduğunu bildirmektedirler. Bu bölgeler 105-165, 266-287, 405-488 amino asitlerini kapsamaktadır. Proteinin membrana gömülü kısmı olarak düşünölen başlangıç kısımlarındaki mutasyonlar ise direnç ile ilişkili bulunmamıştır.

Söz konusu bölgelerden üçüncüsünde bulunan G464S, G465S, R467K mutasyonları hem bölgesinin arkasında yer almakta olup, G464S ve G465S mutasyonları oldukça korunmuş bir bölgede bulunmaktadır. Özellikle hemin tam arkasında izlenen G464S mutasyonunun hemin redoks potansiyelini etkileyerek azoller ile ilişkisini değiştirdiği bildirilmiştir (117). Bu bölgede yer alan diğer mutasyonlar ise V437I, G448E, F449L, G450E, V452A gibi mutasyonlardır.

İkinci bölge G ve H heliks arasında bulunmakta olup, E266D, D278E, S279F mutasyonları bu bölgede yer almaktadır.

Birinci bölgede ise; D116E, F126L, K128T, G129A, Y132H, K143R, F145L, K147R, D153E mutasyonları bulunmaktadır. Bu bölge, substrat veya inhibitör giriş kanalına yakın olduğundan azollerin bağlanma afinitelerini etkilemektedir. Azollerin afinitesinde oluşan etkilenme; ya ilacın girişini doğrudan etkileyerek ya da mutasyonlara bağlı helikal yapıda oluşan değişiklikler nedeniyle oluşmaktadır (117).

Asai ve arkadaşları (116) flukonazole R iki adet *C. albicans* izolatında oluşan mutasyonları, dizi anlizi ve REA, klonlama, lanosterol 14 alfa demetilaz aktivitesi ölçümü

yöntemleri ile araştırarak, SRS-1 bölgesinde yer alan Y132H mutasyonunun azollere direnç gelişimindeki etkisine dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmada dizi analizi ile flukonazole R suşlarda, amino asit değişimine yol açmayan sessiz mutasyonlar ile birlikte D116E, K128T, Y132H, F145L gibi amino asit değişimine yol açan mutasyonlar da saptanmıştır. Flukonazole R suşlarda bulunan Y132H mutasyonu, REA ile 673 bp'lik PZT ürününün 315, 93, 265 bp'lik üç adet bant oluşturacak şekilde gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda varlığını araştırdığımız Y132H mutasyonu, flukonazole R/DBD ve flukonazole D *C. albicans* suşları için REA ve de dizi analizi ile saptanmamış olup, uygulanan REA ile 673 bp'lik PZT ürünüde 315 ve 358 bp'lik iki adet bant varlığı izlenmiştir. Bu sonuca göre incelediğimiz flukonazol R *C. albicans* suşlarındaki dirençte Y132H mutasyonunun rolü olmadığı söylenebilir.

İki ayrı çalışmada (116,145) azollere karşı direnç gelişimi çeşitli biyokimyasal yöntemler ile araştırılmıştır. Bu araştırmalar mutasyonlu ve dirençli suşlarda C14 ile işaretli metillenmiş sterollerin miktarındaki artışı ya da enzimin miktar ve aktivitesindeki azalmayı göstermeye yönelik olup, birlikte oluşan amino asit değişimleri gösterilemediğinden elde edilen sonuçlar mutasyonların afinite üzerinde oluşturduğu etki ile ilişkilendirilememiştir. Bu nedenle mutasyonların flukonazol direnci üzerindeki rolünün biyokimyasal çalışmalarla gösterilmesi sınırlı kalmıştır.

Sanglard ve arkadaşları (146) mutasyonların direnç gelişimindeki rolünü gösterebilmek için yönlendirilmiş mutagenез ("site directed" mutagenesis) ve klonlamaya dayalı yeni bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde azollere duyarlı izolatlarla, dirençli ve mutasyonları bulunan *C. albicans* izolatlarının *ERG11* genleri YEp51 plazmidi üzerine klonlandıktan sonra *S. cerevisiae* YKBB-13 üzerinde eksprese ettirilerek disk diffüzyon yöntemi ile duyarlılık ölçümü yapılmıştır. Araştırmacılar duyarlı kontrol suşuna göre, dirençli suşlarda azalan zon çaplarını, oluşan mutasyonlar sonucu afinite azalmasına bağlı direnç gelişimi ile ilişkilendirmişlerdir.

Azollere karşı hedef enzim afinitesindeki değişimin, mutasyonun tipine, kullanılanazole, birlikte bulunan mutasyonun varlığına bağlı olduğu vurgulanmaktadır. Örneğin; G129A mutasyonunun varlığı tek başına etkili olmaz iken, G464S ile birlikte var olduğunda MİK değerlerinde artış meydana gelmiştir (146).

Y132H mutasyonunun B-B' heliksi içinde yer alması ve bu bölgenin substrat bağlanma bölgesine girişte rol oynaması nedeniyle söz konusu mutasyonun azol halkasının hem

demirine bağlanmasını etkileyebileceği bildirilmektedir (146). Bağlanmada olan bu değişiklik ketokonazol ve itrakonazol ile oluşmamaktadır. Bu çalışmada dizi analizi ile G129A, Y132H, S405F mutasyonları flukonazole R *C. albicans* izolatlarında; D116E, K128T, E266Q, V437I mutasyonları ise R ve D izolatlarda saptanmıştır. Ayrıca, *C. albicans* suşlarında bulunan mutasyonlardan G129A, Y132H, S405F, R467K REA analizi ile de gösterilmiştir (146). Sanglard ve arkadaşları (146) uyguladıkları yönlendirilmiş mutagenез ile *ERG11* geninde oluşturdukları Y132H, G464S, R467K mutasyonların direnç gelişimindeki rollerini vurgularken, dirençli izolatlarda atım pompalarının etkileri üzerinde de durmaktadır.

Kelly ve arkadaşları (147) Y132H mutasyonunun flukonazol direnci ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, yönlendirilmiş mutagenез ile Y132H mutasyonu oluşturdukları *C. albicans* *ERG11* geni ile yabancı tip *C. albicans* *ERG11* genini flukonazol ile titre ettikten sonra spektrofotometrik olarak değerlendirmişlerdir. Spektrofotometrik incelemede yabancı tip izolatın 409 nm ve 424 nm da iki adet dalga boyu gösterdiği, mutasyonlu tip izolatın ise 368 ile 388 nm da maksimum, 418 nm da minimum olmak üzere üç adet dalga boyu gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu durum oluşan Y132H mutasyonu nedeni ile enzimin yapısında meydana gelen değişikliğe bağlı olarak bağlanmadaki değişimi açıklayabilir.

Löffler ve arkadaşları (148) 19 adet flukonazole D ve 19 adet flukonazole R *C. albicans* suşunu PZT ve dizi analizi yöntemleri ile inceledikleri çalışmalarında; amino asit değişimine yol açmayan sessiz mutasyonların yanı sıra D suşlarda K128T, K147R mutasyonlarını, R suşlarda ise duyarlı suşlarda bulunmayan F105L, E266D, K287R, G448G, G450E, G464S ve V488I nokta mutasyonlarını saptamışlardır. Mutasyonları enzimin üç boyutlu yapısı ile değerlendirdiklerinde; F105L mutasyonunun substrat giriş kanalında yer aldığını, G464S mutasyonunun hem kısmında bulunduğunu ve hemin yerleşiminde küçük bir değişim ile ilaç-apoprotein arasında ciddi bir değişime yol açabileceğini bulmuşlardır. E266D mutasyonunun aktif kısmı kısmen çevreleyen G heliks bölgesinde yer aldığı, V488I mutasyonunun ise L heliks'de yer aldığı ve flukonazol bağlanması ile ilgili olmadığı ifade edilmektedir.

Manavathu ve arkadaşları (149) ise, oral kandidozlu AIDS hastalarından soyutlanan altı adet R, bir adet D *C. albicans* izolatı ile çalışmış, klonlama ve dizi analizi sonucunda D suşun dizisinin, Lai ve Kirsh'in yabancı tip suşu ile %98.2 oranında benzer olduğunu bulmuştur. D suşta bulunan D116E, K128T, R287K mutasyonları direnç ile ilişkilendirilmemiş ancak R suşlarda bulunan K143R, E266D, R267H, D278E, S405F, G450E, G464S mutasyonlarının

direnç gelişiminde etkili olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmada Sanglard ve arkadaşlarının (146) bildirdiği S405F, G464S mutasyonları da saptanmış, ancak flukonazol direnci üzerindeki rollerinin yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile gösterilmesine gerek olduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar mutasyonlarla birlikte, hücre içinde ilaç birikiminde azalma veya enzimin artmış salınımı gibi mekanizmaların da flukonazole direnç gelişiminde etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Kelly ve arkadaşları (150) yönlendirilmiş mutagenез ve klonlama sonucu G464S mutasyonu oluşturdukları bir adet *C. albicans* suşu ile mutasyonsuz *C. albicans* suşunu spektrofotometrik ve biyokimyasal olarak inceledikleri çalışmalarında; enzimin katalitik aktivitesinde ve flukonazole olan afinitesinde oluşan azalmayı göstermişler ve bu değişimin hem molekülünde ortaya çıkan aşağı-yukarı yer değişiklikleri veya açılanmalar ile hem'in lokalizasyonunu etkileyerek oluşabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamız kapsamında toplam yedi adet flukonazole R/DBD ve de on adet D *C. albicans* izolatının dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde, flukonazole R/DBD suşlarda D116E, K143R, D153E, E266D, S412T, G464S, G465S, R469K, V488I mutasyonları, D suşlarda ise D116E, K128T, E266D, L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H, V437I mutasyonları gözlemlendi. Belirlenen mutasyonların tümünün daha önce değindiğimiz üç "hot spot" bölgede yer aldığı saptandı. Özellikle R/DBD izolatlarda bulunan nokta mutasyonların R469K ve S412T mutasyonları dışında literatür bilgilerinde rastladığımız mutasyonlar olduğu, duyarlı suşlarda ise daha önce bildirilmemiş L280F, L280Y, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H yeni mutasyonlarının bulunduğu belirlendi. Gerek R/DBD gerek D suşlarda, dizi analizi ve REA yöntemleri ile Y132H mutasyonu saptanmadı. R/DBD suşlarımızdan H3 suşunda bulunan G464S, G465S mutasyonları dikkat çekici olup, korunmuş bir bölge olan hem bölgesinde yer alan mutasyonlardır. Çalışmada saptanan G464S mutasyonunun literatür verilerinde belirtildiği gibi hem'in azoller ile bağlanma yeteneğini etkileyerek veya enzimin katalitik aktivitesini azaltarak etkili olduğu düşünülebilir. G465S mutasyonu ise hem bölgesinin arka planında yer alması nedeni ile hem üzerinde aynı etkileri oluşturmayıp ancak G464S mutasyonu ile birlikte oluşu nedeniyle direnç gelişimine katkıda bulunmuş olabilir.

R/DBD olarak belirlediğimiz H1, H2 suşlarımız aynı hastanın tırnak ve ağız izolatları olup, bu suşlarda saptadığımız K143R mutasyonunun literatürde belirlendiği gibi substrat giriş

bölgesinde yer alması nedeni ile flukonazolün bağlanma afinitesini etkileyerek direnç gelişiminde rol oynadığı düşünülebilir.

Çalışmamızda gerek flukonazole R/DBD, gerekse D *C. albicans* suşlarında saptadığımız D116E ve E266D mutasyonları, literatür bilgilerinde de sık rastlanan mutasyonlar olarak göze çarpmaktadır. Marichal ve arkadaşları (117) ile Asai ve arkadaşları (116) çalışmalarında R/DBD ve D *C. albicans* suşlarında saptadıkları söz konusu bu mutasyonların direnç gelişimine doğrudan katkıda bulunmadığını belirtmektedirler.

White ve arkadaşları (121) farklı hastanelerden soyutladıkları iki tanesi kontrol olmak üzere toplam 38 adet *C. albicans* izolatının direnç mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında; D116E ve E266D mutasyonlarını flukonazole R ve D suşlarda saptamışlardır. Aynı çalışmada, dirençli suşlarda K128T, K143R, V437I mutasyonları ile yeni bir mutasyon olarak G448R mutasyonu belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan K143R mutasyonunun R suşlarda (148,149) V437I mutasyonunun ise R/DBD ve D suşlarda bulunduğu bildirilmektedir (117). Bizim çalışmamızda ise K143R mutasyonu flukonazole R suşlarda, K128T ve V437I mutasyonları D suşlarda yer almaktadır. White ve arkadaşlarının (121) bu çalışmasında bildirilen D116E mutasyonu substrat/inhibitör giriş bölgesinde yer almasına karşın direnç ile ilişkilendirilememiştir. E266D mutasyonu ise G-H heliks yapıları arasında bulunmakta ve substrat geçiş kanalının genişlemesine yardımcı olduğu var sayılmaktadır. Çalışmada saptanan D116E, E266D mutasyonlarının varlığı *HindIII* ve *MaeII* enzimleri kullanılarak REA ile de gösterilmiştir.

Araştırmamızda, R/DBD suşlardan olan H1, H2, B suşlarında saptadığımız V488I mutasyonunun Marichal ve arkadaşları (117) tarafından R ve D suşlarda da yer aldığı bildirilmiştir. Maebashi ve arkadaşları (151) iki AIDS hastasından soyutladıkları üç adet *C. albicans* suşunda, *ERG11* geninde direnç gelişimine yol açan mekanizmaları dizi analizi ve elektron mikroskopik yapısal değişimlerin varlığı ile araştırarak, K143R, E266D, V404L, V488I mutasyonlarını direnç ile ilişkili olarak yorumlamıştır.

Söz konusu literatür bilgilerinin ışığında, çalışmamızda saptanan D116E, D153E, K128T, E266D, V437I mutasyonlarının flukonazole direnç gelişiminde doğrudan etkili olmayan nokta mutasyonlar olduğu, K143R, G464S, G465S, V488I mutasyonlarının ise direnç gelişimine katkıda bulunan mutasyonlar olduğu düşünülmektedir. Daha önce literatürde flukonazole dirençli suşlarda bildirilmemiş ve bizim flukonazole R/DBD iki

suşumuzda bulunan R469K ile S412T mutasyonlarının direçte rolü olabileceği; direç gelişimindeki rolünü belirleyebilmek için ise ileri çalışmalara gerek olduğu ancak söz konusu mutasyonların ‘‘hot spot’’ bölgede yer aldığı söylenebilir.

Flukonazol ve azol grubu antifungal ilaçlara karşı direç gelişiminde etkili mekanizmalar arasında *ERG11* geni nokta mutasyonlarının yanı sıra *ERG11* geninin aşırı ekspresyonu, ilacın hücre içine alımında veya atımında yetersizlik ya da *ERG3* geni gibi diğer genlerde oluşan mutasyon ve değişiklikler sayılabilir (80). Hücre içinde ilaç birikiminde azalma; ilacın hücre içine alımında bozukluk veya ilacın aktif pompalar yardımı ile atımının artması sonucu meydana gelmektedir (74). Bu mekanizmalar içerisinde özellikle ilaç atım pompaları ile ilişkili olanlar önemini ve güncelliğini korumaktadır. Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset (‘‘ATP binding cassette’’ (ABC)) süper ailesi ve major kolaylaştırıcı (‘‘major facilitators’’) süper ailesi (MFs) olmak üzere iki gruptur. ABC taşıyıcıları plazma membranı boyunca küçük moleküllerin geçişini sağlamak ve altı alt gruptan oluşmaktadır. PDR alt grubu özellikle ilaçların taşınmasında önemli olup, bu grupta yer alan *CDR1* ve *CDR2* genleri *C. albicans*’ın flukonazol, ketokonazol ve itrakonazol gibi diğer azollere karşı direç gelişiminde rol oynamaktadır (74,89). MFs ailesi birçok molekülün hücresel transportunda görev yapmakta ve bu grupta bulunan *MDR1* geni *C. albicans*’ın flukonazol direncinden sorumlu tutulmaktadır (74,89). Bu genlerin artmış ekspresyonu veya artmış düzenlenimleri sonucu azollere karşı direç gelişmektedir.

Fungal atım pompaları antifungaller dışında bazı maddeleri substrat olarak kullanabilme özelliği göstermektedir. Bu maddeler arasında Cdr1p, Cdr2p substratları olarak rodamin6G, serulenin, Mdr1p substratları olarak ise 4NQO, fenantrolin, benomil sayılabilir (74). Diğer yandan antifungallere karşı oluşan direnci geri çevirmeye yönelik yeni stratejilerin geliştirilebilmesi için pompa inhibitörü maddeler ile araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar kombine ilaç sağaltımlarının uygulanmasına bağlı olarak özellikle kanser ilaçlarına karşı oluşan direnci azaltmaya yönelik umut vaad etmektedir (86).

Çalışmamız kapsamında R/DBD suşlarımızda direç gelişiminde atım pompalarının rolünü araştırmak amacı ile bu pompaların substrat ve inhibitörü olan maddeler ile CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak duyarlılık çalışması uygulandı. Bu çalışmada kontrol suşu olarak flukonazole dirençli DSY 289 *C. albicans* suşu

ile DSY 292 *C. albicans* suşunun kullanılması sonuçlarımızın değerlendirilmesi açısından yol gösterici olmuştur (146).

Araştırmamızda fungal atım pompalarının substratları olarak, rodamin6G, 4-NQO, fenantrolin kullanılarak duyarlılık çalışması uygulandı. Kontrol suşlarının MİK değerleri göz önüne alınarak tüm suşların MİK sonuçları değerlendirildiğinde; H1, H2, H3, B suşlarında *CDR* genlerinin, 1978, 348, 93-05 suşlarında ise *MDR* genlerinin artmış ekspresyonundan söz edilebilir.

Atım pompa inhibitörü olan ibuprofen, β -östrodiol, progesteron, verapamilin varlığında flukonazolün MİK değerlerinde oluşan değişiklikleri belirlediğimiz duyarlılık çalışması sonucunda ise; 1978, 348, 93-05 no'lu flukonazole R suşların tümünün duyarlı hale geldiği, H1, H2, H3, B suşları ile kontrol suşlarının MİK değerlerinde değişiklik olmadığı ve direnç durumunun sürdüğü saptandı. Buna göre, 1978, 348, 93-05 suşlarındaki atım pompalarının artmış ekspresyonunun direnç gelişimine katkıda bulunduğu, flukonazole R diğer suşlarda ise dirençte atım pompalarının fazla ekspresyonunun rolünün "revers transcriptase" PZT, "real-time" PZT gibi yöntemlerle araştırılması gerektiği sonucuna varılabilir.

Duyarlı suşlarımızda ise, kontrol suşlarının sonuçları göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, substrat grubu maddeler ile MİK değerlerinde önemli bir değişme gözlenmezken, inhibitör grubu maddelerin varlığında flukonazol MİK değerlerinde 960 ve 3-05 suşları dışındaki tüm suşlarda düşme saptanmıştır. 960 ile 3-05 suşlarının flukonazol değerlerinde gözlenen artış ise söz konusu suşlarda inhibitör maddelerin varlığında flukonazolün indüklenme olasılığını düşündürülebilir.

Substrat ve inhibitör etkili maddeler ile uyguladığımız duyarlılık çalışmalarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda; özellikle 1978, 348, 93-05 suşlarında gerek *CDR* gerek *MDR* grubu atım pompalarının artmış ekspresyonundan söz edilebilir. Aynı suşlarda direnç üzerine doğrudan etkili mutasyonların bulunmaması bize, direnç gelişiminde atım pompalarının daha etkin bir mekanizma olduğunu düşündürülebilir. H1, H2, H3, B suşları ise kullanılan dört pompa inhibitörü ile dirençli olmayı sürdürmekte ancak *CDR* substratlarını da kullanabilmektedir. Bu bilgiler ışığında suşlarda bulunan K143R, G464S, G465S, V488I mutasyonlarının direnç gelişiminde dominant rolü bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Candida suşlarında atım pompalarının ekspresyonlarının değerlendirilmesinde semikantitatif "revers transcriptase" PZT (RT-PZT) ve kantitatif "real-time" PZT (gerçek

zamanlı PZT) uygulanması daha iyi bir gösterge olacaktır. Bu amaçla suşlarımızda atım pompalarının bu yöntemler ile araştırılacağı bir çalışma başlatılmıştır.

Maebashi ve arkadaşları (119) *C. albicans* izolatlarında direnç mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında, substrat grubu maddeler ile duyarlılık çalışması sonucunda Cdr1p substratları ile dirençli izolatlarda daha yüksek MİK sonuçları saptamışlardır. Aynı suşlarda RT-PZT ile *CDR1* ve *CDR2* mRNA düzeylerini de yüksek saptadıklarından, Cdrp pompalarının direnç gelişiminde etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

White ve arkadaşları (121) flukonazole R suşlarda NB yöntemi ile *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11* mRNA düzeylerini araştırmışlardır. Ancak çalışma sonucunda oldukça çarpıcı bir bulgu ile karşılaşmış ve bu genlerin ekspresyon düzeyleri ile direnç gelişimi arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Pina-Vaz ve arkadaşları (120) 25'i *C. albicans* olmak üzere 38 adet flukonazole R/DBD *Candida* suşunu, ibuprofen, β -östrodiol progesteron, verapamil gibi inhibitör etkili maddeleri subinhibitör konsantrasyonlarında kullanarak duyarlılık çalışmasına almışlardır. *C. krusei* ve birkaç *C. glabrata* suşu dışında tüm R/DBD suşlar flukonazole D hale gelmiştir. Araştırmacılar *C. krusei*'nin intrinsek dirençli olması nedeniyle, diğer suşlarda ise pompalar dışındaki direnç mekanizmalarının rolü nedeniyle inhibitörlere yanıt alınmadığı yorumunu yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda, ibuprofenin flukonazol direncini tersine çevirebilmesi nedeni ile özellikle kandidoz sağaltımında düşük dozda kullanımı yeni bir sağaltım seçeneği olarak önerilmektedir. Biz de, çalışmamız sonuçları doğrultusunda verapamil, progesteron ve β -östrodiolün yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlı olacağından özellikle ibuprofenin kandidoz sağaltımında özellikle flukonazol R'li *C. albicans* suşlarının etken olduğu ya da uzun süre flukonazol sağaltım veya profilaksisi almış olgularda in vivo araştırmalar ile desteklenmesi durumunda antifungal ilaçlar ile birlikte kullanımının yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Maesaki ve arkadaşları (152) atım pompa inhibitörleri olarak verapamil ve takrolimus'u farklı konsantrasyonlarda kullanarak, iki adet *C. albicans* suşunun flukonazol, ketokonazol ve itrakonazol MİK değerlerinde ve hücre içinde ilaç birikiminde oluşan değişiklikleri incelemiştir. *CDR1* ekspresyonu fazla olan ve ketokonazol ile itrakonazol'e çapraz direnç gösterdiği saptanan flukonazol R suşun antifungal direnci takrolimus ile geri çevrilebilmiş ve hücre içinde ilaç birikiminde azalma oluşmuştur. *MDR1* ekspresyonu fazla olan flukonazol R suşun ketokonazole R, itrakonazole D olduğu ve takrolimus ile duyarlı hale dönüştüğü

belirlenmiştir. *MDR1* ekspresyonu fazla olan bu suşun ketokonazole R olması *ERG11* mutasyonları veya *ERG11*'in artmış ekspresyonu gibi nedenlere bağlanmıştır. Araştırmacılar, *MDR1* ekspresyonun flukonazol, *CDR1* ekspresyonun ise flukonazol, ketokonazol ve itrakonazol direncinde rol oynadığını ve takrolimus'un pompa inhibitörü olarak rolünü vurgulamışlardır.

Park ve arkadaşlarının (153) 14 flukonazole D, 13 DBD, 32 R olmak üzere toplam 59 *C. albicans* izolatı ile moleküler direnç mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında; *ERG11* geni dizi analizi ve *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *FLU1* ile *ERG11* mRNA düzeyleri için "real-time" PZT uygulamışlardır. Çalışma sonucunda; flukonazole direnç gelişiminde *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* mRNA artmış ekspresyonu ile *ERG11* geninde saptanan mutasyonlardan Y132F, T229A, S405F, G464S mutasyonlarının direnç ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ancak *ERG11* ve *FLU1* genlerinin artmış ekspresyonu ile direnç gelişimi arasında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır. Bu çalışmada dizi analizi sonucunda belirlenen E266D ve V488I mutasyonları R ve D suşlarda görüldüğünden flukonazole direnç gelişimi ile ilişkilendirilmemiştir. D116E, K128T, V437I, G450E, D446N, F449S mutasyonları ise D suşlarda saptanmıştır. Aynı çalışmada üç adet suşun uygulanan yöntemler ile direnç mekanizmaları saptanamamış ve "probe" teknolojileri ile yeni amplifikasyon yöntemlerine dayalı araştırmaların gereği üzerinde durulmuştur.

Çalışmamızda 1978 ile 348 numaralı suşlar *MDR* gen salınımının daha belirgin olduğunu düşündüğümüz suşlar olup, sadece flukonazole R olmaları beklenirken ketokonazol ve itrakonazole de R oldukları görülmektedir. Ancak benzeri bir durum kontrol suşlarımızdan DSY 292 suşunda da bulunmakta olup, Sanglard ve arkadaşlarının (87) çalışmasında bu suş *MDR1* aşırı ekspresyonu göstermesine rağmen sadece flukonazole değil ketokonazole ve itrakonazole de direnç göstermekte ve bu durum substrat özgünlüğü veya hücre duvar geçirgenliği gibi diğer mekanizmaların rolü ile ilişkilendirilmektedir.

Flukonazole R 22 adet *C. albicans* vagina izolatında direnç mekanizmalarının araştırıldığı bir başka çalışmada (154) izolatların tümünde NB analizi ile *MDR1* genlerinde aşırı ekspresyon saptanırken, izolatların bir kısmında *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* aşırı ekspresyonu belirlenmiş ve dizi analizi ile R tüm suşlarda D116E, V488I mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir. K128T, E266D, V437I mutasyonları ise direnç ile ilişkili bulunmamıştır. Çalışmada üç adet flukonazol R *C. albicans* suşu, itrakonazole R bulunduğu halde

CDR1/CDR2 genlerinin düzeylerinin düşük olduğu; bir suşun ise itrakonazole D bulunmasına karşın *CDR1/CDR2* genlerinin ekspresyonunun fazla olduğu bildirilmektedir. Bu çalışma sonucunda azollere direnç gelişimi ile ilaç atım pompa genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bağlantı sağlanamamış ve araştırmacılar henüz bilinmeyen bir çok mekanizmanın etkili olabileceğini vurgulamışlardır.

Pera ve arkadaşları (92) HIV ile infekte orofaringeal kandidozlu hastaların oral sürüntüleri ile prospektif bir çalışma gerçekleştirmiş ve bu çalışma sonucunda; flukonazole direnç gelişiminde 12 hastadan soyutlanan 20 adet flukonazole R/DBD *C. albicans* suşu'nun %85'inde atım pompalarının fazla salınımını, %65'inde *erg11p* enziminde amino asit değişimlerini, %35'inde *ERG11* geni aşırı salınımını direnç mekanizmaları olarak belirlemişlerdir. Favre ve arkadaşları (155) ise çalışmalarında, flukonazole R gelişiminde etkili olan *ERG11* mutasyonlarının oranını %20 olarak bildirmektedir. *C. albicans* direnç mekanizmalarının atım pompaları için "real-time" PZT, mutasyonlar için dizi analizi uygulanarak araştırıldığı çalışmalarda (156,157) direnç gelişiminde birçok mekanizmanın birlikte etkili olduğu vurgulanmaktadır.

Bizim araştırmamıza aldığımız yedi flukonazole R/DBD *C. albicans* suşunun dördünde (%57) direnç ile ilgili mutasyonların varlığı belirlenmiş, üçünde (%42) ise atım pompalarının fazla ekspresyonunun dirençte rolü olduğu saptanmıştır.

Pina-Vaz ve arkadaşları (120) pompa genlerinin sayılarının her geçen gün artması, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* genlerinin birbirleri ile olan etkileşimleri, ergosterol sentez yolunda bulunan diğer genlerin salınımları ve oluşturdukları etkiler, hücre duvar yapısı ve geçirgenliğinde oluşan değişiklikler, moleküllerin birbirleriyle etkileşimleri ve bugün için bilmediğimiz başka mekanizmaların rolü gibi nedenlerle; direnç gelişim mekanizmaları ile ilişkili olarak kesin bir değerlendirme yapılamıyabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, flukonazole R/DBD suşlarımızda direnç gelişiminde etkili mekanizmalar olarak, lanosterol 14 alfa demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* genindeki nokta mutasyonlar ile atım pompalarının artmış ekspresyonundan söz edilebileceği, ancak bu suşlarda flukonazole direnç gelişiminde etkili diğer mekanizmalarında araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamıza alınan flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı yedi *C. albicans* suşunun biri dışında tümü flusitazine dirençli, tümü AmB'ye duyarlı, biri dışında tümü itrakonazol ve ketokonazole dirençli, bir tanesi dışında tümü klotrimazole duyarlı olarak bulunmuştur. Flukonazole duyarlı on adet *C. albicans* suşunun altısının flusitazine orta duyarlı, dördünün flusitazine dirençli olduğu, tümünün AmB, ketokonazol ve klotrimazole duyarlı, itrakonazole doza bağımlı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Yedi adet flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı, on adet flukonazole duyarlı *C. albicans* suşu Y132H mutasyonunun araştırılması amacıyla restriksiyon enzim analizine alınmıştır. Çalışmaya alınan flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı ve duyarlı tüm suşlarda 315 ile 358 bp'lik iki adet bant varlığı saptanmış, bu nedenle tüm suşlarda Y132H mutasyonunun bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Tüm suşlara lanosterol 14 α -demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* gen bölgesinin çoğaltıldığı polimeraz zincir tepkimesini takiben dizi analizi uygulanmış ve Bio-edit version 7.0 programı ile değerlendirilerek Y132H mutasyonunun bulunmadığı saptanmıştır. Dizi analizi sonuçları incelendiğinde, flukonazole duyarlı suşlarda D116E, K128T, E266D, L280Y, L280F, L281M, L281Y, I282D, S284I, T285H, V437I mutasyonları, flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı suşlarda D116E, K143R, D153E, E266D, S412T, G464S, G465S, R469K, V488I mutasyonları saptanmıştır. Flukonazole dirençli, doza bağımlı duyarlı suşlardan üç tanesinde direnç gelişiminde rolü olduğu düşünülen K143R, G464S, G465S ve V488I mutasyonları belirlenmiştir. Dizi analizi sonunda sadece flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı suşlarda saptanan ancak literatürde dirençli suşlarda rolü bildirilmemiş olan S412T, R469K mutasyonlarının da dirençte rolü olabileceği düşünülmüş ancak bu mutasyonların ileri çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiği kararına varılmıştır.

Atım pompalarının substrat ve inhibitör etkili maddeler kullanılarak araştırıldığı duyarlılık çalışması sonucunda, üç adet flukonazole dirençli *C. albicans* suşunda atım pompa ekspresyonundaki artışın direnç gelişiminde etkili olduğu, diğer suşlardaki atım pompalarının direnç gelişimindeki rolünün "reverse transcriptase" PZT, "real time" PZT gibi yöntemler ile araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; çalışmamıza alınan dirençli/doza bağımlı duyarlı *C. albicans* suşlarında flukonazole direnç gelişiminde etkili mekanizmalar olarak lanosterol 14 alfa demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* genindeki K143R, G464S, G465S, V488I gibi mutasyonlar ile atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu; ancak bu suşlarda flukonazole direnç gelişiminde etkili *ERG11*'in fazla ekspresyonu, *ERG3* genindeki mutasyonlar gibi diğer mekanizmaların da araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

Bunların yanında flukonazole karşı direnç gelişiminde etkili olan tüm mekanizmaların yeni ve ileri yöntemlerle araştırılmasının sürdürülmesi gerektiği görüşüne varıldı.

9. KAYNAKLAR

1. Segal E. *Candida*, still number one-what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 2005;48(Suppl.1):3-11.
2. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499-511.
3. Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995;20:1531-1534.
4. Zeichner LO, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2006;34:857-863.
5. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
6. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.3-13.
7. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone; 2000 p.2656-2674.
8. Sullivan DJ, Coleman DC. Taxonomy and Biology of *Candida*. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.15-27.
9. Fromtling RA, Rhodes JC, Dixon DM. Taxonomy, Classification, and Morphology of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1653-1658.

10. Tümbay E. *Candida* Türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Öncü Basımevi-Güneş Kitabevi; 1999 p.1081-1086.
11. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. Medical Microbiology. Twenty third edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 2004 p.623-659.
12. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition. Philadelphia. Lippincott Co; 2006 p.1151-1237.
13. Baron EJ, Finegold SM. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh edition. USA, Mosby Inc.; 2002 p.711-797.
14. Larone DH. Yeast and Yeast Like Organisms. Medically Important Fungi A Guide to Identification. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2002 p.109-143.
15. İnci R. Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflaması. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Öncü Basımevi-Güneş Kitabevi; 1999 p.1015-1024.
16. Chauahan N, Li D, Singh P, Calderone RA, Kruppa M. The Cell Wall of *Candida* spp. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.159-175.
17. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* Türleri. In:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Matbaacılık; 2002 p.1797-1808.
18. Yücesoy M. *Candida* türlerinin virulans faktörleri ve konağa ait faktörler. Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg 1999;13:377-388.
19. Pabuççuoğlu HU. Mikozlar-Patogenez ve Patoloji. İzmir, Güven&Nobel Tıp Kitabevi; 1999 p.63-75.

20. Tuğrul M. Mantar Hastalıklarının Patogenezi 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (27-30 Mayıs 2003) Kitabı:87-91.
21. Romani L. Immunology of Invasive *Candidiasis*. In: Calderone RA ed. *Candida* and *Candidiasis*.1th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: p.223-241.
22. Pendrak ML, Klotz SA. Adherence of *Candida albicans* to host cells. *Fems Microbiol Lett* 1995;129:103-114.
23. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 2005;6:863-874.
24. Calderone RA, Gow NA. Host Recognition by *Candida* Species. In: Calderone RA ed. *Candida* and *Candidiasis*.1th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002 p.67-86.
25. Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* 2005;59:113-133.
26. Douglas JL. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003;11:30-36.
27. Hube B, Naglik J. Extracellular Hydrolases. In: Calderone RA ed. *Candida* and *Candidiasis*.1th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002; p.107-122.
28. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:122-143.
29. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans*. *Infect Immun* 1995;63:1993-1998.
30. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ Y. Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2000;14:405-408.

- 31.** Fu Y, İbrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF, Ghannoum MA. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 1997;143:331-340.
- 32.** Brown AJP. Expression of Growth Form-Specific Factors During Morphogenesis in *Candida albicans*. In: Calderone RA ed. *Candida and Candidiasis*. 1th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: p.87-93.
- 33.** Arıkan S. Mantarlarda Pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (27-30 Mayıs 2003) Kitabı:77-86.
- 34.** Soll DR. Phenotypic Switching. In: Calderone RA, ed. *Candida and candidiasis*. First edition. Washington DC, ASM Pres; 2002:123-142.
- 35.** Vargas K, Messer SA, Pfaller M . Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 2000;38:3595-3607.
- 36.** Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *C. albicans* in vivo. *Infect Immun* 1995;63:1373-1379.
- 37.** Dexter HH. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:394-404.
- 38.** Ruhnke M. Skin and Mucous Membrane Infections. In: Calderone RA ed. *Candida and Candidiasis*. 1th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: p.307-326.
- 39.** Yıldırım ŞT. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Güneş Kitabevi. 1999; p.1129-1144.
- 40.** Richardson MD, Carlson P. Culture and Non-culture Based Diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.387-394.

41. Merz WG, Roberts GD. Algorithms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1668-1685.
42. LaRocco MT. Reagents, Stains, and Media: Mycology. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1686-1692.
43. Hazen KC, Howell Susan A. Fungi-*Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeast of Medical Importance. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1693-1711.
44. Ellepola NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005;43:65-84.
45. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath L, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C.krusei*, and *C.tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006 Jan 3;5:1.
46. Yucesoy M, Oztek AO, Marol S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. Clin Microbiol Infect 2005;11: 245–247.
47. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. J Clin Microbiol 2001;39:3793–3795.
48. Pontón J, Moragues MD, Quindós G. Non-Culture-Based Diagnostics. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002 p.395-425.
49. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:864-870.

- 50.** Reiss E, Morrison C. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 10:444-465.
- 51.** Saeki F, Ridge RJ, Finkelman MA, Ketchum PA, Rex JH. Application of a glucan-specific limulus amoebocyte lysate serum assay for diagnosis of invasive fungal infections. *Abstr. J-84*, p.386. *Abstr. 41st ICAAC*.
- 52.** Ibáñez N, Torres-Rodríguez JM, Nolla M, Leon MA, Mendez R, Soria G, Diaz M, Marrugat J. The utility of serology in diagnosing candidosis in non-neutropenic critically ill patients. *Mycoses* 2001; 44(1-2):47-53.
- 53.** Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resistance Updates* 2002;5:3-10.
- 54.** Deventer van AJM, Goessens WHF, Zeijl van JH, Mouton WJ, Michel MF, Verbrugh HA. Kinetics of anti-mannan antibodies useful in confirming invasive candidiasis in immunocompromised patients. *Microbiol Immunol* 1996;40:125-131.
- 55.** Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999;37:1510-1517.
- 56.** García-Ruiz JC, Arilla MC, Regúlez P, Quindos G, Alveraz A, Ponton J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997;35:3284-3287.
- 57.** Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S. Isolation of immunodominant antigens from the sera of patients with systemic candidosis and characterization of the serological response to *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1987;25:230-237
- 58.** Na BK, Song CY. Use of monoclonal antibody in diagnosis of candidiasis caused by *C. albicans*: detection of circulating aspartyl proteinases antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:924-929.

59. Hoppe JE, Friess D, Niethammer D. Orointestinal yeast colonization of paediatric oncologic patients during antifungal prophylaxis: results of quantitative culture and *Candida* serology and comparison of three polyenes. *Mycoses* 1995;38:41-49.
60. Çerikçioğlu N. Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Öncü Basımevi; 1999 p.1145-1153.
61. Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: current perspectives and future directions. *Clin Infect Dis* 1995;33:1925.
62. Singh J. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001;20:1692-1696.
63. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499-511.
64. Sullivan DJ, Coleman DC. Molecular Approaches to Identification and Typing of *Candida* Species In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002:p. 427-441.
65. Chemaly RF, Procop GW, Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. editörler. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık;2006 p. 551-559.
66. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Muller CA, Bowden RA, Burik van J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1353-1360.
67. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3016-3021.
68. Özer S. Kan Örneklerinde Polimeraz Zincir Tepkimesi Yöntemi ile *Candida* DNA'sının Saptanması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi; 2006.

- 69 Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000;13:332-370.
70. McGinnis MR, Nunn GB, Sarıbaş Z, Arıkan S. Mantarların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. editörler. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık; 2006 p. 551-559.
71. Perea S, Patterson FT. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis 2002;35:1073-1080.
72. İnci R. Antifungal İlaçlar. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi. 1999;p.1155-1158.
73. Balkis MM, Leidich DS, Pranab K, Ghannoum M and MA. Mechanisms of fungal resistance. Drugs 2002;62(7):1025-1040.
74. Sanglard D, Bile J. Current Understanding of the Modes of Action of and Resistance Mechanisms to Conventional and Emerging Antifungal Agents for Treatment of *Candida* Infections. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology press; 2002: p.349-383.
75. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 2002;359:1135-1144.
76. Sanglard D, Odds F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002;2:73-85.
77. Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2003:p.1859-1868.
78. Odds F, Alistair JP, Gow NAR and B. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 2003;11(6): 272-278.

- 79.** Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-517.
- 80.** White TC. Mechanisms of Resistance to Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2003:p.1869-1879.
- 81.** Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:40-79.
- 82.** Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003;36:31-41.
- 83.** Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect Dis* 2004;10(Suppl):1-10.
- 84.** Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Dromer F, Dennig DW, Lortholary O. Flukonazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J Antimicrobial Chemother* 2006;57:384-410.
- 85.** Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587(2-3):240-248.
- 86.** Sipos G, Kuchler K. Fungal ATP-Binding Cassette(ABC) Transporters in drug resistance & detoxification. *Current Drug Targets* 2006;7:471-481.
- 87.** Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;42:2378-2386.
- 88.** White TC. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR* and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1482-1487.
- 89.** Prasad R, Panwar S. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Curr Sci* 2004;86:62-73.

90. Akins R. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 2005;43:285-318.
91. López-Ribot JL, McATEE RK, Lee LN, Kirkpatrick WR, White TC, Sanglard D, Patterson TF. Distinct patterns of gene expression associated with development of flukonazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2932-2937.
92. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McATEE RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. Prevalance of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level flukonazole resistance isolated from Human Immunodeficiency Virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001;45:2676-2684.
93. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2693-2700.
94. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Einsele H. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 1996;348:1523-1524.
95. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of flukonazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3065-3072.
96. Douglas CM. Fungal β -(1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* 2001;39(Suppl.):55-66.
97. Georgopapadakou NH. Antifungals. Mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1998;1(5):547-557.
98. Hospenthal DR, Murray KC, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:153-160.

- 99.** Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi:current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 1996;34:489-495.
- 100.** Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:367-381.
- 101.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition. CLSI document M27-A2 (Vol 22 No:15), NCCLS Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2002.
- 102.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; proposed guideline. CLSI document M44-P (Vol 23 No:6), CLSI Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2002.
- 103.** Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chyrssanthou E. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST discussion document E.Dis 7.1 2002.
- 104.** Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2003: p.1880-1894.
- 105.** Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff AV, Ghannoum MA, Gosey L, Odds F, Rinaldi M, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:643-658.
- 106.** Kuştimur S. Antifungal Duyarlılık Testleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: p.1159-1166.
- 107.** Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for flukonazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;19:435-447.

- 108.** Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Esterella M, Fothergill A, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriquez-Tudela JL, Verweij PE. Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI reference microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for *Candida* spp.: a collaborative study. *J Clin Microbiol* 2005;43:4535-4540.
- 109.** Esen N, Yucesoy M, Yuluğ N. Evaluation of semisolid agar screening tests for determining fluconazole and amphotericin B susceptibilities of *Candida* strains by using three different media. *J Chemother* 2003;15:37-42.
- 110.** Provine H, Hadley S. Preliminary evolution of a semi-solid agar antifungal susceptibility test for yeast and molds. *J Clin Microbiol* 2000;38(2):537-541.
- 111.** Yucesoy M, Şenturker G, Yuluğ N. Disk diffusion method for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* strains. *J Chemother* 2001;13:161-166.
- 112.** Kirkpatrick WR, Turner TM, Fothergill AW, McCarthy DI. Fluconazole disk diffusion susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1998;36:3429-3432.
- 113.** Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, Zedtwitz K, Georgopoulos A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *J Clin Microbiol* 1997;35:5-10.
- 114.** Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3332-3337.
- 115.** Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı I, Güven GS, Sahin GO, Uzun Ö. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses* 2005;48:197-201.
- 116.** Asai K, Tsuchimori N, Okanogi K, Perfect RJ, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14 α -demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1163-1169.
- 117.** Marichal P, Koymans S, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC and Vanden Bossche H. Contribution of mutations in the

cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg 11p, Cyp 51p) to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiology 1999;145: 2701-2713.

118. Lai MH, Kirsch DR. Nucleotid sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 α -demethylase) from *Candida albicans*. Nucleic Acids Res 1989;17:804.

119. Maebaski K, Niimi M, Kudoh M, Fischer FJ, Makimura K, Niimi K, Piper RJ, Uchida K, Arisawa M, Cannon RD, Yamaguchi H. Mechanisms of flukonazole resistance in ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida* isolates from Japanese AIDS patients. J Antimicrob Chemother 2001;47:527-536.

120. Pina-Vaz C, Rodrigues GA, Costa-de-Oliveira S, RicardoE, Mardh P-A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blokade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. J Antimicrob Chemother 2005;56:678-685.

121. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1704-1713.

122. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical corelations. J Clin Microbiol 2000;38:1563-1568.

123. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrobial Chemother 2005;56:5-11.

124. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. Current Drug Targets 2006;7:495-504.

125. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ, and the SENTRY Participants Group. J Clin Microbiol 2002;40:852-856.

126. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.:report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). J Clin Microbiol 2006;44:1782-1787.

- 127.** Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamil RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Clearly J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3149-3154.
- 128.** Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza TL, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004;42:1519-1527.
- 129.** Kennedy HF, Shankland GS, Bagg J, Chalmers AE, Gibson BES, Williams CL. Fluconazole and itraconazole susceptibilities of *Candida* spp. isolated from oropharyngeal specimens and blood cultures of paediatric haematology/oncology patients. *Mycoses* 2006;49:457-462.
- 130.** Gülay Z, Ergon C, Özkütük A, Yücesoy M, Biçmen M. Anestezi yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojik izlemi. *Mikrobiyol Bul* 2002;36:309-316.
- 131.** Arıkan S, Arslan Ş, Haşçelik G, Günalp A. Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen mayaların antifungal ajanlara in-vitro duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2001;35:433-441.
- 132.** Çoşkun Ö, Beşirbellioğlu AB, Yıldırım ŞT, Gönüm A, Pahsa A. Kandidemili hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin amfoterisin B ve flukonazole in-vitro duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2001;35:565-571.
- 133.** Yücesoy M, Marol S, Bilirgen B, Acarer V. Yoğun bakım hastalarından soyutlanan maya türleri ve amfoterisin B ve flukonazole duyarlılıkları. *DEU Tıp Fak Derg* 2003;17:1-6
- 134.** Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997;35:3311-3312.

- 135** Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:5122-5128.
- 136.** Chen S CA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002;40:333-357.
- 137.** Lugert R, Schettler C, Gross U. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens *in vitro*. *Mycoses* 2006;49:298-304.
- 138.** Lyons CN, White TC. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2296-2303.
- 139.** Kebelman-Betzing C, Seeger K, Dragon S, Schmitt G, Möricke A, Scild TA, Henze G, Bayermann B. Advantages of a new *Taq* DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *BioTechniques* 1998;24:154-158.
- 140.** Moretti T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *BioTechniques* 1998;25:716-722.
- 141.** Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol Interv* 2003;3:194-204.
- 142.** Probst LM, Poulos TL, Waterman MR. Crystal structure of cytochrome P450 14 α sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Pnas* 2001;98:3068-3073.
- 143.** Haitao Ji, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y, Lü J. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and Its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* 2000;43:2493-2505.
- 144.** Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, Imaoka S, Funae Y, Kurosawa N, Horiuchi T, Yoshida Y. Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J Biochem* 1996;119:926-933.

- 145.** Lamb DC, Kelly DE, Schunck W-H, Shyadehi AZ, Akhtar M, Lowe DJ, Baldwin BC, Kelly SL. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem.* 1997;272:5682-5688.
- 146.** Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bile J. Amino acid substitutions in the cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:241-253.
- 147.** Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett* 1999;180:171-175.
- 148.** Löffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of cyp 51 from fluconazole resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997;151: 263-268.
- 149.** Manavathu EK, Kallakuri S, Arganoza MT, Vazquez JA. Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 1999;16: 198-203.
- 150.** Kelly SL, Lamb DC, Löffler J, Einsele H, Kelly DE. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinical through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:174-179.
- 151.** Maebashi, K, Kudah M, Nishiyama Y, Makimura K, Kamai Y, Uchida K, Yamaguchi H. Proliferation of intracellular structure corresponding to reduced affinity of fluconazole for cytochrome P-450 in two low-susceptibility strains of *Candida albicans* isolated from a Japanese AIDS patient. *Microbiol Immunol* 2003;47:117-124.
- 152.** Maesaki S, Marichal P, Hossain MA, Sanglard D, Bossche HV, Kohno S. Synergic effects of tacrolimus and azole antifungal agents against azole-resistant *Candida albicans* strains. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:747-753.

- 153.** Park S, Perlin D. Establishing surrogate markers for flukonazole resistance in *Candida albicans*. *Micobial Drug Resistance* 2005;3:232-237.
- 154.** Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:403-408.
- 155.** Favre B, Didmon M, Ryder NS. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiolgy*;1999:2715-2725.
- 156.** Goldman GH, Ferreira ME, Marques ER, Savoldi N, Perlin D, Park S, Martinez PCG, Goldman MH, Colimbo A. Evaluation of flukonazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50:25-32.
- 157.** Chau AS, Mendrick CA, Sabetelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of Real-Time Quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: