

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOL DİRENÇLİ *CANDIDA*
ALBICANS SUŞLARINDA ATIM
POMPALARINI KODLAYAN GENLERİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN GERÇEK
ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

SİNEM GÜLAT

MİKROBİYOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970083

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOL DİRENÇLİ *CANDIDA*
ALBICANS SUŞLARINDA ATIM
POMPALARINI KODLAYAN GENLERİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN GERÇEK
ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

**MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

SİNEM GÜLAT

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2006.KB.SAG.014 sayı ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970083

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora programı öğrencisi Sinem Gülat “Flukonazol Dirençli *Candida albicans* Suşlarında Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Araştırılması” konulu Doktora tezini 17.06.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ
BAŞKAN



Prof. Dr. Zeynep GÜLAY
ÜYE



Prof. Dr. Neşe ATABEY
ÜYE



Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR
ÜYE



Doç. Dr. Cem ERGON
ÜYE

Prof. Dr. Feriha Çilli
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM
YEDEK ÜYE

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ'ye; tez izleme komitesinde yer alan ve tez çalışmamızın gelişimine bilgi ve katkılarıyla yön veren Sayın Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a ve Sayın Prof. Dr. Neşe ATABEY'e; Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR ile eğitimime katkıları bulunan Anabilim Dalımızın tüm değerli hocalarına teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca dostluklarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma, destek ve ilgilerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme sabır ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Tarihçe.....	6
2.2. Genel Özellikler	6
2.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı	8
2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri	9
2.4.1. Aderans	11
2.4.2. Biyofilm Yapımı	12
2.4.3. Enzimler.....	13
2.4.3.1. Proteinazlar.....	13
2.4.3.2. Fosfolipazlar	13
2.4.3.3. Lipazlar.....	14
2.4.4. Morfolojik Değişim	14
2.4.5. Fenotipik Değişim.....	15
2.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi	16
2.4.7. Sideroforları Kullanma Yeteneği	16
2.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar	16
2.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz	16
2.5.1.1. Ağız Kandidozu.....	16
2.5.1.2. Özofagus Kandidozu	17
2.5.1.3. Sindirim Sistemi Kandidozu.....	17
2.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz.....	17
2.5.1.5. Deri Kandidozu	17
2.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz	18
2.5.3. Sistemik Kandidoz.....	18
2.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	19
2.6.1. Direkt Bakı ve Kültür	19
2.6.2. Serolojik Tanı	22
2.6.2.1. Antijen Saptayan Testler	22
2.6.2.2. Antikor Saptayan Testler.....	23
2.6.2.3. Kombine Testler	24
2.6.2.4. Metabolit Saptayan Testler	24
2.6.3. Moleküler Tanı	24
2.6.3.1. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri.....	25
2.6.3.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)	25
2.6.3.1.2. Sekanslama (Dizi Analizi)	26
2.6.3.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri	26
2.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç.....	26

2.7.1. Polyenler	27
2.7.1.1. Amfoterisin B ve Lipid Formülasyonları	27
2.7.1.2. Nistatin	28
2.7.2. Azol Türevleri	28
2.7.3. 5-Flusitozin (Florositozin)	33
2.7.4. Ekinokandinler	34
2.7.5. Allilaminler	35
2.8. Antifungal Duyarlılık Testleri	35
2.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler	36
2.8.1.1. Makrodilüsyon Yöntemi	36
2.8.1.2. Mikrodilüsyon Yöntemi	36
2.8.1.3. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemi	37
2.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler	38
2.8.2.1. Disk difüzyon yöntemi	38
2.8.2.2. E-test yöntemi	38
2.8.3. Diğer Yöntemler	38
2.8.3.1. “Flow” sitometrik yöntem	38
2.8.3.2. Ergosterol kantitasyonu	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Araştırmanın Tipi	40
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	40
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	40
3.4. Çalışma Materyali	40
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	41
3.6. Veri Toplama Araçları	42
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	42
3.6.2. Antifungal Duyarlılık Çalışması	45
3.6.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemi	45
3.6.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması	45
3.6.2.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Konsantrasyonları	46
3.6.2.1.3. Maya İnokulumlarının Hazırlanması	46
3.6.2.1.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	46
3.6.2.2. E-test Yöntemi	47
3.6.3. Gerçek Zamanlı (“Real-time”) (GZ) Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)	47
3.6.3.1. RNA Eldesi	47
3.6.3.2. cDNA Sentezi	48
3.6.3.3. GZ PZT Uygulaması	48
3.6.3.3.1. GZ PZT için Gerekli Malzemelerin Hazırlanması	48
3.6.3.3.2. GZ PZT Çalışmasında Kullanılan Öncül ve “Probe”lar	49
3.6.3.3.3. GZ PZT Karışımı ve Isı Döngüsü	49
3.6.3.3.4. Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi	50
3.6.3.3.5. Standart Eğrilerin Oluşturulması	51
3.6.3.3.6. Gen Ekspresyonunun Kantitasyonu	51
3.7. Araştırma Planı	52
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	52
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	52
3.10. Etik Kurul Onayı	52
4. BULGULAR	53

4.1. Antifungal Duyarlılık Sonuçları.....	53
4.2. GZ PZT Özgüllüğü: Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi Sonuçları	55
4.3. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Kullanımı.....	56
4.4.Gen Ekspresyon Sonuçları	58
4.4.1. <i>CDR</i> Ekspresyon Düzeyleri	59
4.4.2. <i>MDR1</i> Ekspresyon Düzeyleri	63
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR.....	75
8. EKLER	94
8.1. Etik Kurul Onayı	94
8.2. Tez Başlığı Değişikliği.....	96
8.3. Özgeçmiş.....	97

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmaya alınan klinik izolatlardaki <i>ERG11</i> geni amino asit değişimleri.....	41
Tablo 2. FLU'ya R/kısmi inhibisyon gösteren, <i>S. C. albicans</i> suşlarının FLU MİK değerleri	53
Tablo 3. FLU'ya R/kısmi inhibisyon gösteren, <i>S. C. albicans</i> suşlarının diğer antifungal ilaçlara duyarlılıkları	54
Tablo 4. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Etkinlikleri	57
Tablo 5. <i>CDR1</i> ve <i>CDR2</i> mRNA düzeylerinin kantitasyonu ve <i>ACT1</i> ile normalizasyon değerleri	60
Tablo 6. Çalışmaya alınan izolatların <i>C. albicans</i> ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla <i>CDR1</i> ve <i>CDR2</i> ekspresyonları	62
Tablo 7. <i>MDR1</i> mRNA düzeylerinin kantitasyonu ve <i>ACT1</i> ile normalizasyon değerleri.....	64
Tablo 8. Suşların <i>C. albicans</i> ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla <i>MDR1</i> ekspresyonları	65

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Erime eğrisi analizi ile <i>ACT1</i> için elde edilen pikler	55
Şekil 2. GZ PZT ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	56
Şekil 3. Seri dilüsyonların amplifikasyonu ile oluşturulan <i>CDR1</i> standart eğri	58
Şekil 4. H1 ve H2 suşlarının <i>CDR1</i> amplifikasyonuna ilişkin GZ PZT uygulaması	59
Şekil 5. <i>C. albicans</i> suşlarının <i>CDR1</i> normalizasyon grafiği	61
Şekil 6. <i>C. albicans</i> suşlarının <i>CDR2</i> normalizasyon grafiği	61
Şekil 7. <i>C. albicans</i> suşlarının ATCC kontrol suşuna kıyasla <i>CDR1</i> ve <i>CDR2</i> ekspresyonları	63
Şekil 8. <i>C. albicans</i> suşlarının <i>MDR1</i> normalizasyon grafiği	64
Şekil 9. <i>C. albicans</i> suşlarının ATCC kontrol suşuna kıyasla <i>MDR1</i> ekspresyonları	66

KISALTMALAR

ABC	: ATP Bağlayan Kaset
ABCT	: ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcılar
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
Ala 1	: “Agglutinin-Like Adhesin 1”
ALS	: “Agglutinin-Like Sequence”
AmB	: Amfoterisin B
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyon
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BRE	: “Benomyl” Yanıt Elemanı
CDR	: Candida İlaç Direnci
CR3	: Kompleman Reseptör 3
CLR _s	: C-tipi Lektin Reseptörleri
CLSI	: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
C _p	: “Crossing Point”
DBD	: Doza Bağımlı Duyarlı
DRE	: İlaç Yanıt Elemanı
EIA	: Enzim Immun Assay
EUCAST	: “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing”
5-FC:	: 5-Flusitozin
FDA	: “Food Drug Administration”
5FU	: 5 Florourasil
GPI	: “Glycosylphosphatidylinositol”
GZ PZT	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
HRE	: H ₂ O ₂ Yanıt Elemanı
IFN- γ	: İnterferon γ
IL	: İnterlökin
ITS	: “Internal Transcribed Spacer”
KMK	: Kronik Mukokutanöz Kandidoz
KOH	: Potasyum Hidroksit
KOÜ	: Koloni Oluşturan Ünite
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MFs	: Major Kolaylaştırıcılar
MOPS	: Morfolinepropanesulfonik asit
MR	: Mannoz Reseptörü
NASBA	: Nükleik Asit Sekansına Dayalı Çoğaltma
NB	: “Northern Blotting”
NRE	: Negatif Yanıt Elemanı
PAMPs	: Patojen İlişkili Moleküler Paternler
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
Pir 1	: “Protein with Internal Repeat”
PNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
PRRs	: Patern tanıma Reseptörleri
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
rDNA	: Ribozomal DNA
R	: Dirençli
S	: Duyarlı
SABHI	: Sabouraud Beyin Kalp İnfüzyon
SAP	: Salgısal Aspartik Proteinaz
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SRE	: Steroid Yanıt Elemanı
TBE	: Tris Borat EDTA
TLR	: “Toll-Like” Reseptör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
UPC2	: “Uptake Control 2”
YPD	: “Yeast Extract Peptone Dextrose”

Flukonazol Dirençli *Candida albicans* Suşlarında Atım Pompalarını Kodlayan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Araştırılması

Sinem GÜLAT, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir

ÖZET

Flukonazolün profilaksi ve sağaltımda yaygın ve tekrarlayan kullanımı, *Candida albicans* suşlarında direnç gelişimine yol açmıştır. Çalışmamızda, flukonazole dirençli ve duyarlı *C. albicans* izolatlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyonu araştırılarak flukonazol direncinde bu mekanizmanın rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Türkiye’de üç üniversite hastanesinde çeşitli klinik örneklerden soyutlanan beş flukonazol dirençli, altı duyarlı ve dört kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı *C. albicans* suşu çalışmaya dahil edildi. Suşların flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol, mikonazol, klotrimazol, 5-flusitozin ve amfoterisin B MİK değerleri CLSI M27-A3 standartlarına göre uygulanan mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Flukonazole dirençli suşların duyarlılıkları siklosporin A içeren ve içermeyen “yeast extract peptone dextrose” agarda flukonazol E-test ile de incelendi.

CDR1, *CDR2* and *MDR1* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi ile belirlendi. Bu genlerin ekspresyonu “housekeeping” gen (*ACT1*) seviyeleri ile normalize edildi ve duyarlı *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşu ile karşılaştırıldı. Gruplardaki gen ekspresyonu verileri SPSS versiyon 15.0 yazılımı kullanılarak “Mann-Whitney U” testi ile karşılaştırıldı.

Flukonazole dirençli/kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı, dokuz suşun altısı 5-flusitozine dirençli ve duyarlı suşların ise biri hariç tümü 5-flusitozine orta duyarlı olarak bulunmuştur. Tüm suşların amfoterisin B’ye duyarlı ve bir izolat hariç tümünün klotrimazole de duyarlı olduğu görülmüştür. Flukonazole dirençli/kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı dokuz suşun yedisinin itrakonazol ve ketokonazole dirençli, mikonazol için ise $\geq 64\mu\text{g/ml}$ MİK değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Flukonazole duyarlı tüm suşlar ketokonazole

duyarlı, itrakonazole doza bağımlı duyarlı bulunmuştur. Flukonazole dirençli ve duyarlı suşların vorikonazole duyarlı olduğu belirlenmiştir.

C. albicans ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole dirençli beş suşun ikisi yüksek, üçü ılımlı düzeylerde *CDR1/2*; biri yüksek, üçü ise düşük düzeylerde *MDR1*'i fazla eksprese etmiştir. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı suşlardan birinde görülen yüksek *MDR1* ekspresyonu dışında, ılımlı düzeylerde *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* fazla ekspresyonu gözlenirken, duyarlı izolatlar üç suş dışında atım pompalarını düşük düzeylerde eksprese etmiştir. *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeylerinin aynı suş için tüm izolatlarda paralel olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda atım pompa genlerinin ekspresyonlarının flukonazole dirençli, kısmi inhibisyon etkisi gösteren ve duyarlı *C. albicans* suşları arasında farklı olduğu gözlenmesine rağmen, yapılan istatistik analizine göre gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak, çalışmamıza alınan flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında *ERG11* mutasyonları ile birlikte atım pompalarının fazla ekspresyonunun dirençten sorumlu önemli mekanizmalar olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *C. albicans*, flukonazol direnci, atım pompaları

Investigation of the expression levels of efflux pumps encoding genes in fluconazole resistant *Candida albicans* strains by real-time polymerase chain reaction

ABSTRACT

Widespread and repeated use of fluconazole in the prophylaxis and therapy resulted in resistance development in *Candida albicans* strains. In our study, investigation of the expression of efflux pump encoding genes *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* in fluconazole resistant and susceptible *C. albicans* isolates was aimed in order to determine the role of this mechanism in fluconazole resistance.

Five fluconazole resistant, six sensitive and four trailing effect showing sensitive *C. albicans* strains, isolated from various clinical specimens in three hospitals in Turkey were included in our study. MIC values of fluconazole itraconazole, ketoconazole, voriconazole, miconazole, clotrimazole, 5-flucytosine and amphotericin B were determined by microdilution method performed according to CLSI M27-A3 standards. The susceptibilities of fluconazole resistant strains were also studied by fluconazole E-test performed on yeast extract peptone dextrose agar with and without cyclosporin A.

The expression of *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* genes were determined by real-time polymerase chain reaction. The expression of these genes was normalized with their housekeeping gene (*ACT1*) levels and compared with the drug susceptible *C. albicans* ATCC 14053 control strain. Gene expression data of the groups were compared by Mann-Whitney U test via using SPSS version 15.0 software.

Six out of nine fluconazole resistant/trailing effect showing sensitive strains were resistant to 5-flucytosine, and all except one sensitive strains had found as intermediate to 5-flucytosine. It was seen that all strains were susceptible to amphotericin B and all except one strain were also sensitive to clotrimazole. Seven out of nine fluconazole resistant/trailing isolates were determined as resistant to itraconazole and ketoconazole, and had miconazole MIC values of $\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$. All fluconazole sensitive isolates were found as sensitive to ketoconazole and dose dependent sensitive to itraconazole. Fluconazole resistant and sensitive strains were determined as sensitive to voriconazole.

Out of five fluconazole resistant isolates, two strains overexpressed high levels and three strains overexpressed mild levels of *CDR1/2*; one strain overexpressed high levels and three strains overexpressed low levels of *MDR1* according to *C. albicans* ATCC 14053

control strain. It was observed that *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* gene expression levels were mild in trailing effect showing strains except one which highly expressed *MDR1*, while sensitive isolates except three expressed efflux pump genes at low levels. It was determined that the expression levels of *CDR1* and *CDR2* genes for the same strain were in parallel for all isolates.

In our study, although it was observed that the expressions of efflux pump genes were different between fluconazole resistant, trailing and sensitive *C. albicans* isolates, no statistically significant difference was detected between the groups according to statical analysis ($p>0.05$).

As a result, it can be concluded that overexpression of efflux pumps and *ERG11* mutations are important mechanisms responsible for resistance in our fluconazole resistant *C. albicans* isolates.

Key words: *C. albicans*, fluconazole resistance, efflux pumps

1. GİRİŞ VE AMAC

Candida türleri özellikle immün yetmezlikli hastalarda yüzeysel mukozal infeksiyonlardan yaşamı tehdit edici sistemik infeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olan fırsatçı patojenlerdir. Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarının insidansı dünya çapında giderek artmaktadır. *Candida* türleri, ABD ve Avrupa’da sırasıyla dördüncü ve altıncı en yaygın hastane kökenli kan dolaşımı infeksiyonu etkenidir. (1-4).

Candida albicans kan dolaşımı infeksiyonlarına neden olan en yaygın *Candida* türü olup, dünya çapında %37–70 oranında sıklığa sahiptir (5). *Candida* infeksiyonlarının önlenmesi ve sağaltımı genellikle uzun dönem ilaç kullanımı gerektirmektedir. Flukonazol (FLU) bu amaçla en yaygın kullanılan triazol sınıfı bir antifungaldir (6-8). Gerek uzun ve tekrarlayan FLU sağaltımının gerekse diğer antifungaller ile karşılaşmanın *C. albicans* izolatlarında direnç sorununa neden olduğu bildirilmiştir (8-9).

C. albicans suşlarında azol direncinden sorumlu birçok mekanizma ileri sürülmüş, FLU dirençli suşlarda tek bir mekanizmadan çok, birçok mekanizmanın birlikte rol aldığı belirtilmiştir (9-11). Bu mekanizmalar; ilacın hücre içinde birikiminde azalma, ilacın hedefi olan lanosterol demetilazda (Erg11p) değişiklik ve ergosterol biyosentezinde değişiklik şeklinde özetlenmektedir. Hücre içinde ilaç birikiminde azalma, ilacın hücre içine alımında bozukluk veya aktif pompalar ile atılımının artması sonucu meydana gelmektedir. Lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* genindeki nokta mutasyonlar, *ERG11* geninin fazla ekspresyonu ve ergosterol biyosentez yolağında görev alan diğer genlerdeki olası genetik değişimler de azol duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır (10-12). *C. albicans* suşlarında FLU direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenin çoklu atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (11, 13, 14). Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset ailesinden Cdr1p ve Cdr2p ile majör kolaylaştırıcı süper ailesinden Mdr1p olmak üzere iki gruptur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ilaç atımında rol oynayan hücre membran-ilişkili taşıyıcıları kodlamaktadır. *MDR1* geni *C. albicans*’ın FLU direncinden sorumlu iken, *CDR1* ve *CDR2* genleri FLU, ketokonazol ve itraconazol gibi farklı azollere ve amorolfın, terbinafin gibi diğer bazı antifungallere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır (9, 10, 14, 15). Çalışmamızda hastanemizde ve ülkemizdeki bazı merkezlerde klinik örneklerden soyutlanan FLU’ya flukonazole dirençli (R) ve duyarlı (S) *C. albicans* suşlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin araştırılması ile dirençteki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

M.Ö. dördüncü yüzyılda, Hippocrates ve Gallen oral pamukçuk lezyonları tanımlamış, 1771'de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini bildirmiştir. 1839'da Bernard Langenbeck tifolu bir hastanın oral lezyonlarından soyutladığı organizmayı tifüs cisimcikleri olarak tanımlamış, ardından Gruby bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğunu bildirmiştir. 1842'de Emil Berg sağlıklı bebeklere aftöz membran materyalini inoküle ederek geliştirdiği oral aft modeli ile pamukçuğun fungal etyolojisini araştırmıştır. 1849'da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda da olabileceğini göstermiştir (16-18).

1847'de Charles Robin organizmaya *Oidium albicans* olarak ilk ismini vermiştir. Hansen 1888'de bu mantarı *Monilia* türü olarak sınıflamış, Zoph ise 1890'da *Monilia albicans* adını vermiştir. 1923'de Roth Berkhout pamukçuk etkeni mikrorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirmiş ve *Candida* ismini önermiştir (16-18).

1861'de Albert Zenker tarafından ilk kez kayıtlı bir sistemik kandidoz olgusu tanımlanmıştır. *Candida*'nın etken olduğu ilk endokardit olgusu ise antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940'da bildirilmiştir. O zamandan bugüne *Candida* infeksiyonlarının sıklığı artmış ve konu ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır (16-18).

2.2. Genel Özellikler

Heterojen bir cins olan *Candida* askomiçetler içindeki Saccharomycetales takımında yer almakta ve yaklaşık 200 türden oluşmaktadır. *Candida* türleri yaygın görülen mayalar olup, birçok bitki üzerinde, memelilerin sindirim kanalı, insanın mukoza ve derisinde bulunur. Bu türler mukozal yüzeylere doğum sırasında veya doğumdan hemen sonra kolonize olmaktadır. Normal florada bulunan *Candida* türleri, hastalık veya sağaltım girişimleri nedeniyle bağışıklık savunması bozulmuş hastalarda, dokulara yayılarak yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilir. *C. albicans* çoğu kandidoz formlarından en sık izole edilen tür olup, bunun nedeni normal florada yüksek prevalans göstermesidir. Tıbbi önemi olan diğer *Candida* türleri ise; *C. catenulata*, *C. ciferri*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. wiswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir (19).

Candida türleri; 3–6 µm büyüklüğünde, tek hücreli, kapsülsüz maya mantarlarıdır. Eşeysiz üremeleri multilateral tomurcuklanma yolu ile olmaktadır. Morfolojik olarak ana kök hücrenin bir bölümünün uzaması ile oluşan; yuvarlak, oval veya uzamış şeklindeki yapılar blastokonidya olarak adlandırılır. Tomurcuklanma esnasında hücre duvarının bir noktası lizise uğrar ve bu noktadan dışarıya doğru balonlaşan kısım şişerek genişler. Ana hücrede mitoz yoluyla çoğalan kromozom ve diğer hücre elemanları yeni hücreye taşınır. İki hücre arasında septa gelişerek hücre çoğalması gerçekleşir (19-21).

Candida türleri klinik örneklerde blastokonidya, yalancı hif veya hif formunda bulunabilir. Yalancı hif; blastokonidyaların ana hücreden kopmadan uzayarak oluşturdukları bir hücre zinciridir. Duvarları birbirine paralel olmayıp, hücreler arasında daralmalar nedeniyle boğumlu olarak görülürler. Gerçek hif ise boğumlanma göstermez, duvarları birbirine paraleldir ve septa oluşturur. *Candida* türleri arasında sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in gerçek hif oluşturduğu bildirilmiştir. Yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidaların bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli özelliklerdir (20, 22).

Bu türler Sabouraud dekstroza 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 ya da parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluşturur (21, 23).

C. albicans klinik örneklerden en sık izole edilen maya türü olmakla birlikte son zamanlarda non-*albicans Candida* türlerinden kaynaklanan infeksiyonların prevalansında artış söz konusudur (1, 5). "ARTEMIS DISK" Evrensel Antifungal Sürveyans Programı invaziv *Candida* infeksiyonlarında en sık karşılaşılan etken olan *C. albicans*'ı (63–70%), *C. glabrata* (44%), *Candida tropicalis* (6%), ve *Candida parapsilosis* (5%)'in izlediğini bildirmektedir. Ancak bu dağılımda coğrafik ve kurumsal farklılıkların yaygın olduğu ve ABD dışında *C. glabrata*'nın daha az oranda soyutlandığı işaret edilmektedir (24). *C. albicans* en yüksek oranda Kuzey ve Orta Avrupa ve ABD'de soyutlanmakta olup, non-*albicans Candida* türleri Güney Amerika, Asya ve Güney Avrupa'da daha yaygındır (25).

2.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı

Ökaryot *Candida* hücreleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplâzma, mitokondri, 80S ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve membran ile çevrili nukleustan oluşur (26).

Candida türlerinin patogenezinde hücre duvarının önemli rol oynadığı bilinmektedir. Maya hücresini konağın savunma mekanizmalarından koruduğu gibi konak hücre yüzeylerine tutunmada doğrudan görev alır. Ayrıca önemli antijenler ve mantar lehinde konağın homeostatik dengesini etkileyen bileşikler de içerir (27).

Hücre duvar yapısının yaklaşık olarak %80–90 kadarı karbonhidrat, %6-25'i protein, % 1-7'si lipidlerden oluşmaktadır. Hücre duvarında polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin bulunmakta olup, polisakkaritlerin %40-85'ini mannan, %0,5-9'nu kitin oluşturur. β -glukan dallanmış β -1,3 ve β -1,6 glukoza polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β -1,4 N-asetil glukozamin polimerlerinden oluşur. Hücre duvarının en önemli bileşeni mannoproteinler olup, proteinlerle kovalan bağlar yapan mannoz polimerlerinden oluşur. Mannan, hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturmakta olup, hücre duvarının ana antijenik yapısı olarak serolojik testlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Hidrojen bağları ile bağlanmış uzunlamasına yapıda kitin molekülleri mikrofibriller oluşturur. Maya hücrelerinde kısa zincirler olarak görülen bu mikrofibriller hif duvarlarında uzun karmaşık zincirler olarak yer alır. Glikolipidler hücre duvar sentezi, sinyal ileti yolları ve hücre antijenleri olarak önemli işlevlere sahiptir (28).

Maya ve hif formlarında glukan ve mannan içeriği benzer iken, hif hücrelerinde kitin miktarı maya hücresine göre üç kat fazladır. Bu maddeler mantarın patogenezinde rol oynadığı gibi ayrıca antijenik özellikleri nedeniyle tanıda da yardımcı olmaktadır (23).

C. albicans hücre duvarı 4–8 tabakadan oluşur. Maya-hif dönüşüm sürecinde bu sayı ve kalınlık değişir. Elektron saydam iç iskelet tabaka ise esasen polisakkaritler (β -glukan ve kitin) ve az miktarda proteinden oluşur. Duvar proteinleri lateral β -1,6 glukan veya daha az oranda β -1,3 glukan zincirleri aracılığıyla kitin mikrofibrillerine bağlanır. Hücre duvar proteini Pir 1 (“Protein with Internal Repeat”) ise iç tabaka boyunca dağılır. Pir1, β -1,3-glukan zincirlerine çapraz bağlı çoklu tekrarlara sahip olup, bu yapı iç iskelet duvar tabakasının mekanik dayanıklılığı için gereklidir. Hücre duvarının dış yüzeyi mannoproteinler açısından zengin olup, elektron yoğun dış protein tabaka olarak tanımlanır. İç tabakayı çevreleyen dış tabaka β -1,3-glukan zincirlerinin doğal bağışık sistem dektin–1 reseptörü

tarafından tanınmasını engeller. Hücre duvar proteinlerinin %88'ini oluşturan “glycosylphosphatidylinositol” (GPI) proteinleri ağırlıklı olarak dış tabakada yer alır. GPI proteinleri serin tirozin rezidüleri açısından zengindir ve oldukça O-glikozillenmiştir. Toplam yaklaşık 234 GPI proteininin 50'si adheziv özelliktedir (27, 29).

Hücre zarı iki tabakalı olup fosfolipid, sfingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. Sterol; ergosterol ve zimosterol formunda olup, sterolün %95'ini oluşturan ergosterol antifungal ilaçlar için önemli bir hedeftir. Kitin sentetaz gibi duvar komponentlerinin sentezinde rolü olan enzimler de membranda bulunur. Ayrıca *C. albicans*'ın morfogenezi (maya-hif dönüşümü ve hifin ucundan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alır (23).

C. albicans genetik kodunda bulunan CUG kodonu lösine yerine serin amino asitini kodlar. Bu özelliğini *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* gibi türleri de içine alan bir grup ile paylaşır. *C. albicans* genomunun büyüklüğü 13,3–13,4 Mb olup, 6,100–6,200 geni kodlar. Toplam 21 gen ailesi “CUG clade”i içinde yer almakta olup; lipazlar, adhezinler, oligopeptit taşıyıcılar, hücre duvar mannoproteinleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlar (30).

2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Candida ile konak arasındaki etkileşimler oldukça karmaşıktır. Bu etkileşim mantarın infeksiyon oluşturma yeteneğine, konağın infeksiyona karşı yanıtına ve konakta predispozan faktörlerin varlığına bağlıdır. Mantar ve konak arasındaki hassas denge kommensal veya parazitik ilişkiyi belirler. Normal flora üyesi olan *Candida* türleri konak risk faktörlerine sahip bireylerde dokulara kolonize olarak infeksiyonlara yol açabilir. *Candida* infeksiyonlarına zemin hazırlayan konağa ait predispozan faktörler; immünsüpresif ve sitotoksik sağaltım, geniş spektrumlu antibiyotik sağaltımı, AIDS, diyabet, ciddi yanıklar, intravenöz ilaç kullanımı, üriner kataterler, yoğun cerrahi girişimler ve total parenteral beslenme şeklinde sıralanabilir (12).

Konağın *Candida* türlerine karşı direnç faktörleri arasında deri ve mukoza bütünlüğü, silier hareketler, sekresyonlar, normal mikrobiyolojik florayı içeren mukokutanöz engeller, kompleman sistemi, fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları, sitokinler, B-lenfositleri içeren humoral mekanizmalar, nötrofiller, mononükleer fagositler, doğal öldürücü hücreler, T-lenfositleri içeren hücresel mekanizmalar sayılabilir (31, 23).

Yüzeyel (kutanöz veya mukozal) kandidoz *Candida* türlerinin yerel sayısında bir artış ile ortaya çıkmakta olup, maya ve yalancı hifler aracılığıyla lokal invazyon sonucu epitele zarar verir (21).

Epitel hücreleri doğal bir bariyer oluşturarak, mikrobiyal flora ise patojenlerin üremesi üzerinde antagonistik etkiler sağlayarak *Candida*'ların aşırı çoğalmasını ve dokulara invazyonunu engeller. Ayrıca Th17 yanıtı nötrofil göçü sağlayan IL-17 ve defensinleri uyaran IL-22 üretimini destekleyerek mukozada mayanın kontrol edilmesinde önemli rol oynar (32).

Sistemik kandidoz ise *Candida*'nın kan dolaşımına girdiği ve fagositik konak savunmasının mayanın çoğalması ve yayılmasını önlemede yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkar (21).

Makrofajlar ve nötrofil gibi fagositler savunmanın ilk hattında önemli rol oynar ve etkenin sistemik olarak yayılmasını engeller. Bu önemli fagositlerin işlevsizliğine yol açan koşullar (kemoterapi sonucu ortaya çıkan nötropeni gibi) invaziv kandidoz gelişimi ile ilişkilidir (32).

Kandaki monositler ve dokulardaki makrofajlar, ilk proinflatuvar sitokinlerin üretiminden sorumlu ana hücrelerdir. TNF- α , IL-1 ve IL-6, monosit ve/veya makrofajlarca salınır ve yaygın kandidoza karşı konak savunmasında kritik rol oynar. TNF- α nötrofillerin infeksiyon bölgesine göçü ve etkili fagositozdan sorumludur. 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. (32-33).

Fagositler, monosit-kökenli proinflatuvar sitokinler ve Th1 yanıtları *Candida*'ları kan dolaşımı ve dokulardan elimine etmede görevli ana efektör mekanizmalardır. Th1 yanıtı yaygın kandidoz süresince kritik bir rol oynar. Th1 yanıtları kaspaz-1 bağımlı sitokin IL-18 ve monosit/makrofaj aktivasyonu sonucu aktive olan IL-12 kombinasyonunca uyarılır. Th1 yanıtının prototip sitokini IFN- γ olup, makrofajların sidal etkili nitrik oksit ve süper oksit üretimini teşvik eder. IFN- γ endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi konak savunmasında önemli non-immün hücreler üzerinde de aktiviteye sahiptir (32).

Fagositik hücreler patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMPs) tanıyan patern tanıma reseptörleri (PRRs) aracılığıyla *Candida* hücrelerini tanırlar. Bunlardan "Toll-like" reseptör (TLR)-2 ve TLR4 *Candida*'yı tanıyan ana reseptörlerdir. TLR4 mannanı; TLR2 ise fosfolipomannanı tanır. *C. albicans*'ın maya formu TLR2 ve TLR4 üzerinden; hif formu ise

TLR2 üzerinden inflamatuvar yanıtları aktive eder. TLR2 ve TLR 4 dışında TLR1, TLR6 ve TLR9 da *Candida*'ların PAMP'lerinin tanınmasında görev alır. C-tipi lektin reseptörleri (CLRs) *Candida* hücre duvar proteinlerini tanıyan PRR'lerdir. Bunlardan dektin-1 β -1,3-glukanı tanıyan bir CLR olup, mantarlarda solunumsal patlamayı uyarır. Dektin-2 *C. albicans*'ın hifal formuna yanıtta spesifik olarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır. Makrofaj mannoz reseptörü (MR) hücre duvarındaki mannanı tanır, nötrofil ve eozinofillerde bulunan kompleman reseptör 3 (CR3) ise *Candida*'lar için önemli diğer fagositik reseptörlerdendir (32).

Candida virulans faktörleri, adezyon, biyofilm yapımı, enzimler (proteinazlar, fosfolipazlar ve lipazlar), toksinler, morfolojik değişim, fenotipik değişim, hücre yüzey hidrofobisitesi ve çeşitli sideroforları kullanma yeteneği şeklinde sıralanabilir (23, 31, 34).

2.4.1. Aderans

Candida'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyon ve enfeksiyonunun ilk aşaması olup, patogeneizde önemli rol oynamaktadır. *C. albicans*'ı bu cins içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir. (35).

Candida türlerinin konak hücreye bağlanmasında esas rolü oynayan, hücre yüzeyinde bulunan adezinlerle konak hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin birbiriyle etkileşimidir. Oluşan enfeksiyonun patogenezi ile *Candida*'nın aderans yeteneği arasında korelasyon izlenmiştir (36). *C. albicans* hücrelerinin konağın epitel ve endotel hücrelerine tutunmasında iC_3b , C_3d , fibronektin ve östrojen reseptörleri, mannoprotein, salgısal aspartik proteinaz, faktör 6 (antijen 6), laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinler gibi moleküllerin rolü bulunmaktadır (23).

Çoğu *C. albicans* adezini glikoprotein yapıda olup "Agglutinin-Like Sequence" (ALS) gen ailesini de içeren bir dizi gen ailesi tarafından kodlanır. ALS, ALA 1 ("agglutinin-like adhesin"), INT1 ve HWPI'i içermekte ve 8 gen ile kodlanmaktadır. Hwp1, yanak epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar. Bu genin inaktivasyonu büyük ölçüde virulansı azaltır. INT 1 ise adezyonun yanında filamentöz şeklin çoğalmasını da sağlayan gen bölgesidir ve önemli ölçüde virulanstan sorumludur (37-38).

2.4.2. Biyofilm Yapımı

Candida türleri kateter, yapay eklem, protez kalp kapağı gibi tıbbi cihazların yüzeylerine yapışıp biyofilm üreterek kolonizasyon ve enfeksiyon oluşturabilirler. Oluşan biyofilmde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörler rol oynamaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın “slime” faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin karşılıklı etkileşiminin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin planktonik hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellikler gösterdikleri, klinikte kullanılan antifungallere daha dirençli oldukları ve enfeksiyon için bir kaynak oluşturdukları belirtilmektedir. Biofilm oluşturabilme yeteneği ile virülans derecesi arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (34, 39-42).

Biyofilm, ince bazal bir maya tabakası, üzerinde kalın bir hif tabakası ve bu yapıyı çevreleyen hücre dışı matriksden oluşmaktadır. Serbest maya hücreleri önce katı bir yüzeye yapışır, daha sonra morfogeneze uğrar ve salgısal hücre duvar polimeri 1,3 β glukana zengin ekstrasellüler bir matriks içerisine gömülü karışık morfolojide hücrelerden oluşan yoğun bir tabaka ortaya çıkar. Matriks karbonhidrat, protein, fosfor ve hekzoaminazlardan meydana gelir. Besin, pH, oksijen gibi çevre koşullarının yanı sıra etkenin türü de matriks kompozisyonunu etkiler (42-44).

Biyofilm oluşumunda rol alan çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları hif oluşumu için gerekli transkripsiyon faktörü Efg1 ve kinaz Yak1'dir. Ayrıca, transkripsiyon faktörü Zap1'in matriksin polisakkarit bileşenlerinin üretimini, diğer bir transkripsiyon faktörü Bcr1'in ise hücrelerin yüzeylere yapışmasını sağlayan adhezinlerin oluşumunu düzenlediği bildirilmektedir. Bir grup alkol dehidrogenaz ise hücreler arası haberleşme (“quorum sensing”) moleküllerinin seviyesini düzenlemektedir (30).

C. albicans, haberleşme molekülleri yardımı ile morfogenezi kontrol altında tutabilmektedir. Bunlardan hif gelişimini baskılayan farnesol molekülünün aksine tirozol molekülü hif oluşumunu arttırmaktadır. Farnesolün konsantrasyonu biyofilm içinde kritik yoğunluğa ulaştığında biyofilmin dağılmasında görev alır (45).

Candida türleri arasında biyofilm üretimi en sık olarak *C. albicans*'ta görülmektedir. Kateter kaynaklı enfeksiyonlarda yüksek oranda rol oynayan *C. parapsilosis* için biyofilm üretiminin önemli bir virülans faktörü olduğu; ayrıca *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. kefyr*'in de biyofilm ürettiği saptanmıştır (43, 46).

2.4.3. Enzimler

İnfeksiyon süresince hidrolitik enzimlerin salgılanması dokulara penetrasyon, konak immün faktörlerinin yıkımı ve besin kazanımı sağlayarak virulansta önemli rol oynar. *Candida* türleri tarafından üretilen hidrolitik enzimler salgısal aspartik proteinaz, fosfolipaz ve lipaz ailelerini içermektedir (39, 47).

2.4.3.1. Proteinazlar

Candida türleri tarafından en sık üretilen hidrolitik enzim salgısal aspartik proteinazlardır (Sap). Sap proteinleri *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. İnfeksiyon süresince patojen *Candida* türlerince salgılanan proteinazlar ile virulans arasında korelasyon varlığı bildirilmiştir. Sap'lar kollajen, laminin, fibronektin, müsin, salgısal laktoferrin, α 2-makroglobulin, immünglobulinler, interlökin-1 β , laktoperoksidaz, katepsin D, kompleman ve çeşitli kan koagülasyon öncüllerini hidroliz eder. (12, 47).

Ekstrasellüler proteinazları en sık *C. albicans* salgılarken, bu enzimler *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* tarafından da üretilmektedir. Yapılan bir çalışmada *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatları arasında proteinaz aktivitesi açısından önemli fark olmadığı ve bu enzimin her iki grup için de önemli olduğu vurgulanmaktadır (48).

Sap'ları kodlayan *SAP* gen ailesinde birbirinden farklı 10 kadar gen mevcuttur. *SAP1-3* genleri yalnızca maya hücrelerinde; *SAP4-6* ise hif yapılarında bulunmaktadır. Hem maya hem hif yapılarında bulunan *SAP9*, *SAP10* ise fungal hücre membranına bağlıdır. *SAP* gen ekspresyonu özellikle *C. albicans* için doku penetrasyonu yanında hif oluşumu, adezyon ve fenotip değişimi gibi diğer virülans faktörleri ile de yakın ilişki göstermektedir. *SAP1-3*'ün yüzeyel, mukozal ve kutanöz infeksiyonlarda; *SAP4-6*'nın ise sistemik infeksiyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (47, 49-51).

2.4.3.2. Fosfolipazlar

Fosfolipazlar membran gliserofosfolipidlerinin ester bağlarını hidrolize ederek konak hücre membranında hasara yol açar, aderans ve penetrasyonda rol alır (49). Yapılan çalışmalarda *C. albicans*'ın fosfolipaz aktivitesinin non-*albicans Candida*'lara oranla daha fazla olduğu ve fosfolipaz aktivitesi ile virulans arasında ciddi bir korelasyon saptandığı

bildirilmektedir (48, 52). *C. albicans*'ta enzimin fosfolipaz A, B1, B2, C, D, lizofosfolipaz ve lizofosfolipaztransaçilaz formları tanımlanmıştır (53-55). Özellikle fosfolipaz B ve lizofosfolipaztransaçilaz, hidrolaz aktiviteleri nedeni ile *C. albicans*'ın fosfolipaz aktivitesinde önemli bir yer almaktadır (47).

2.4.3.3. Lipazlar

Hidrolitik enzimlerin bir diğer grubu olan lipazlar mono-di-triaçilgliserol ve diğer fosfolipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalize eder ve bu enzimler on üyeli bir gen ailesi (*LIP 1–10*) tarafından kodlanır. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarının lipaz aktivitesi gösterdiği saptanmış ancak *C. glabrata*'da bu özellik izlenmemiştir (49).

Lipazların besin kazanımı için lipidlerin sindirimi, konak hücrelere adezyon, bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyerek inflamatuvar sürecin başlatılması ve sitotoksitenin uyarılması gibi pek çok işlevi vardır (56-57). Enfeksiyon modellerinde lipaz-negatif *C. parapsilosis* mutantlarının virulansının azaldığı gösterilmiştir (56).

2.4.4. Morfolojik Değişim

Candida türleri çeşitli koşullara bağlı olarak maya ve hif formları arasında geri dönüşümlü bir geçiş yeteneğine sahiptir. Bu morfolojik değişim *Candida*'ların yaşaması için değil, farklı ortam koşullarına uyum sağlayabilmesi ve üreyebilmesi için geliştirdiği bir mekanizmadır (23, 58).

C. albicans'ın ayırt edici bir özelliği üç farklı morfolojide (maya, yalancı hif ve gerçek hif) üreme yeteneğidir. 37°C sıcaklık, nötral pH, yüksek CO₂ konsantrasyonu ve serumun ortamda bulunması hif formunun gelişimini indüklerken, 30°C sıcaklık, asit pH ve serumun olmadığı bir ortam maya şeklinde üremeyi indüklemektedir. (23, 30, 58).

Maya-hif dönüşümü sırasında maya hücre membranındaki reseptörler tarafından algılanan sinyaller (ısı, pH, aminoasitler gibi) hücre içine iletilmekte ve hücre içinde cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Oluşan iyon akımı sonucunda hif şeklinde uzama gerçekleşmekte olup, bu forma dönüşümün ilk basamağını çimlenme borusu (“germ tube”) oluşturmaktadır. Sinyal zayıf, ısı ve pH düşük ise septum yapımı gecikir, iyon akımı olmaz ve buradan dışarı doğru balonlaşma sonucu tomurcuk şekillenir (23, 59). Ana maya hücrelerinden hifin gelişimi hücreler arası haberleşme

mekanizması ile düzenlenmekte olup, maya hücreleri alkol farnesol gibi küçük moleküller üreterek hif oluşumunu inhibe etmektedir. Yalancı hif morfolojisi ve oluşumunu yönlendiren koşullar maya ile hif arasında yer alır ki bu da yalancı hiflerin bir geçiş evresi olduğunu desteklemektedir. Transkripsiyon faktörü *UME6*'nın düşük seviyede ekspresyonu yalancı hif, yüksek seviyede ekspresyonu hif üremesi ile sonuçlanır. Ancak gerçek hif ile yalancı hif arasında kalitatif farklılıklar bulunmaktadır. Kutupsal üreme mekanizması, hücre döngüsünün organizasyonu, sitokinez sonrası primer septumun hidrolizi gibi bazı faktörler yalancı hifin hiften çok mayaya yakın olduğunu göstermektedir (30).

İnfeksiyon sırasında maya hücreleri hife göre kan ve vücut sıvılarına daha kolay yayılırken, hif formlarının aderanslarının maya formuna göre daha fazla olduğu ve doku invazyonunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir.(58, 60).

2.4.5. Fenotipik Değişim

Kültürde üreyen *Candida*'ların çoğu düzgün yüzeyli, beyaz, krema kıvamında ve kabarık koloniler oluşturur. *C. albicans* ve diğer türler fenotipik değişime uğrayabilirler. Bu durumda tek bir *Candida* türü geri dönüşümlü olarak birkaç farklı morfotip arasında değişim sergileyebilir. Bu morfotipler baskın biçimde tomurcuklanan maya benzeri hücrelerin oluşturduğu düzgün yüzeyli tipik beyaz koloniler olabileceği gibi, esas olarak yalancı hif ve hiflerden oluşan havlı veya tüylü koloniler de olabilir. Fenotipik değişimin pek çok farklı çeşidi vardır; bunlardan en iyi tanımlanmış olanı beyaz-opak dönüşümdür. *C. albicans* en sık düz, beyaz ve kubbe şeklinde koloniler oluşturur, bu koloni morfolojisindeki oval şekilli hücreler beyaz ("white") olarak adlandırılır. Yaklaşık 1000 beyaz koloniden 1'i yassılaştırmış, gri renkli koloni şeklinde farklı bir görünüm alır. Yüzeyleri pürüklü bu uzun, büyük hücreler opak ("opaque") olarak tanımlanır. Opak hücreler aynı sıklıkta tekrar beyaz hücrelere dönebilir ("W-O" değişimi). Böylece beyaz veya opak faz bir nesilden diğerine değişmez, fakat hücreler fazlar arasında gen mutasyonlarından kaynaklanamayacak kadar çok sıklıkta değişim gösterirler ki bu sürecin epigenetik kontrol altında geliştiğine inanılmaktadır. Fenotipik değişimin *C. albicans*'ın insandaki farklı çevresel mikroortamlarda yaşamını sürdürebilme yeteneğini açıkladığı varsayılmaktadır (30, 61).

C. albicans dışında *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* suşlarında da bu dönüşüm izlenmekte olup fenotipik değişimine uğramış suşların antifungallere daha yüksek düzeyde direnç gösterdiği belirlenmiştir (62-63).

2.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Candida hücrelerinin hidrofobik özellikleri hücre duvarının dış tarafında yerleşmiş polisakkaritlerden kaynaklanmaktadır. Hücre yüzeyinin hidrofobik özellikte olması mayaların biyofilm oluşturma yetenekleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (28).

2.4.7. Sideroforları Kullanma Yeteneği

Sideroforlar, demiri depolandığı dokudan veya transferrinden alan, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve salınan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. *C. albicans*'ın bu molekülleri sentez etme yeteneği olmadığından üreme fonksiyonları için gerekli olan demiri diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedir (64).

2.5. Candida Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar çeşitli enfeksiyonlara yol açabilirler. Enfeksiyonlar klinik olarak kutanöz ve mukozal, kronik mukokutanöz ve sistemik kandidoz olmak üzere başlıca üç tipte incelenmektedir (23).

Mukokutanöz *Candida* enfeksiyonları çoğunlukla hücresel immün defektlere; sistemik enfeksiyonlar ise genellikle nötropeniye bağlıdır. Bu nedenle, AIDS hastalarında sıklıkla ağız veya özofagus kandidozu görülmesine karşılık, *Candida* türlerinin sistemik yayılımına pek rastlanmaz. Sistemik yayılım nötrofil sayısındaki düşüş ile ilişkilidir (19).

2.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Yüzeyel (kutanöz veya mukozal) kandidoz *Candida*'nın lokal sayısında bir artış ile ortaya çıkar, maya ve yalancı hifler aracılığıyla invazyon sonucu deri veya epitele zarar verir. Kutanöz *Candida* enfeksiyonları travma, diyabet, AIDS, gebelik, genç veya ilerlemiş yaş, doğum kontrol hapları, kortikosteroidler veya antibiyotiklerle sağaltım, kan glukoz düzeyinin yüksekliği, hücresel immün yetmezlik, endokrin dengesizlik ve derinin uzun süre nemli kalması gibi bazı koşullar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (21).

2.5.1.1. Ağız Kandidozu

Bu tablo dil, dudaklar, diş etleri, damak gibi mukozal yüzeyler üzerinde kremsi, beyaz renkte, yama tarzında yerleşmiş ağırlı psödomembranöz lezyonlar şeklindedir. Membranlar

yerlerinden kaldırıldığında eritemli, kanamalı yüzeyler gözlenir. Lezyon materyali epitel hücreleri, maya ve yalancı hiflerden oluşmaktadır. (21). AIDS’li hastaların hemen hemen tamamında oral kandidoz görülmekte olup, AIDS’i tanımlayıcı bir durum olarak kabul edilmektedir. En sık karşılaşılan etkenler *C. albicans* ve *C. dubliniensis* olup, genellikle AIDS’in geç evrelerinde (CD4 T hücre sayısı <400 hücre / μ l) ortaya çıkmaktadır (19, 65).

2.5.1.2. Özofagus Kandidozu

En sık disfaji, yutma sırasında tıkanma hissi ve göğüs ağrısı gibi semptomlara yol açar. Sıklıkla oral kandidozun yayılımı ile ilişkili olup AIDS hastaları ve immün sistemi zayıflamış kişilerde görülür. Lösemi ve lenfoma olgularında kendisine çoğunlukla mide ve ince bağırsak tutulumu da eşlik eder. AIDS hastaları ve immün sistemi zayıflamış kişilerde görülür. Kesin tanı endoskopik görünüm ve alınan biopsi materyali ile konur (66-68).

2.5.1.3. Sindirim Sistemi Kandidozu

Gastrointestinal sistemde mide tutulumu, özofagustan sonra ikinci sıklıktadır. *Candida* türleri, özellikle gastrik ülser gibi önceden varolan gastrik lezyonların bulunduğu bölgelere yerleşir ve infeksiyon yalancı membranlar şeklinde seyreder (66).

2.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz

Vajinal mukoza sık karşılaşılan bir infeksiyon bölgesi olup, kadınların %75’i yaşamları boyunca en az bir kez bu infeksiyonu geçirirler. İritasyon, kaşıntı ve akıntının eşlik ettiği vulvovajinit mikrobiyal flora ve lokal pH’nın değişmesine neden olan gebelik, diabet, antibiyotik sağaltımı ve oral kontraseptif kullanımı ile ilişkilidir. Bu infeksiyonlar mukoza yüzeyinde genellikle “süt kesiği” benzeri lekeler şeklinde ortaya çıkar. Vulvovajinal kandidozların %80’inden *C. albicans*’ın sorumlu olduğu, onu *C. glabrata* ve *C. tropicalis*’in izlediği bildirilmiştir (21, 30, 61, 67).

2.5.1.5. Deri Kandidozu

Candida türleri deri yüzeyinin sıcak ve nemli olduğu koltuk altı, kasık, meme altı, el ve ayak parmak araları, perineal bölge gibi vücut bölgelerinde yerel deri infeksiyonu oluşturabilirler. Eritematöz vezikülopüstüller lezyonların bulunduğu kaşıntılı bir döküntü

şeklinde ortaya çıkan bu infeksiyon genellikle obez, diabetik ve suyla sık temas eden kişilerde yaygındır (21, 61).

Candida türleri, tırnak ve tırnakla birlikte çevresindeki yumuşak dokuyu da infekte ederek onikomikoz ve paroniki'ye neden olurlar. Bu tabloya en sık yol açan türler *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'dir. Tırnak çevresinde ağrılı, kırmızı kabarcıklarla karakterize lezyonlar mevcut olup, tırnak sertleşir, kalınlaşır ve oluklu bir görüntü alır (21, 61).

2.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK); lökosit fonksiyonu veya endokrin sistemle ilgili çok sayıda genetik kusur ile ilişkili deri ve mukoz membranlarda *Candida* türlerinin oluşturduğu kronik, dirençli ve fırsatçı bir enfeksiyondur. Nadir görülen bu enfeksiyon erken çocuklukta başlar ve T-lenfositlerin *Candida* antijenlerine yeterli immün yanıt oluşturmamasından kaynaklanmaktadır. Hastalarda şiddetli seyreden ve sürekli bulunan mukokutanöz *Candida* lezyonları vardır ve buna yaygın tırnak tutulumu ve vajinit de eşlik eder. Lezyonlar şekilsiz bir granülomatöz görünüm olacak kadar irileşebilir (21, 61, 65).

2.5.3. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz, *Candida* türlerinin hematojen yayılımından kaynaklanmakta olup kandidemiye izleyen bir tablodur. Kandidemi, kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın, enfeksiyon belirtisi ve bulguları olan bir hastada en az bir ya da daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi anlamına gelmektedir. Sistemik kandidoz *Candida*'nın kan dolaşımına girdiği, fagositik konak savunmalarının mayanın çoğalması ve yayılmasını önlemede yetersiz olduğu durumlarda ortaya çıkar ve etkenin kalp (perikardit, miyokardit, endokardit), meninksler (menenjit), idrar yolu (ürettrit, sistit), deri, göz, karaciğer ve dalak gibi derin dokulara yerleşmesi ile sonuçlanır (21, 23, 69).

Sistemik kandidoz kortikosteroid veya diğer immün sistemi baskılayıcı ilaçlar ile uzun süreli sağaltım, lösemi, lenfoma, aplastik anemi gibi hematolojik hastalıklar veya kronik granülomatöz hastalık ile yakından ilişkilidir (21).

Sistemik kandidoz, olguların çoğunda gastrointestinal veya genitoüriner kanaldan kaynaklanan endojen bir enfeksiyon olmakla birlikte, kalıcı bir kateterin kontaminasyonu

sonucu da oluşabilir. Kateterin bağlama yerine veya lümenine ulaşan organizmalar kateter lümeninde biyofilm oluşturabilir ve ardından da dolaşıma geçer (61).

2.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkeralveolar lavaj, bronş lavaj, aspirat, doku biyopsileri, idrar, yüzeysel lezyonlardan kazıntı ve sürüntüler ve intravenöz kateter materyali sayılabilir (21). Bu klinik örnekler için uygulanabilecek saptama ve identifikasyon yöntemleri arasında direkt mikroskopik inceleme, kültür, antijen saptama, mantara özgül metabolitlerin, hücre duvarı komponentlerinin ve mantara özgül nükleik asitlerin saptanması ve de serolojik tanı yer almaktadır. Mantarların saptanması ve identifikasyonunda direkt mikroskopik inceleme ve kültür gibi klasik yöntemler halen esas tanı yöntemleri olup, diğer tüm yöntemler tanıya yardımcı olarak kullanılmaktadır (70-71).

2.6.1. *Direkt Bakı ve Kültür*

Klinik örneklerle uygulanacak ilk işlem direk bakıdır. Direk bakı için yaş preparat hazırlanabildiği gibi %10'luk potasyum hidroksit (KOH), kalkoflor beyazı, Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar da kullanılabilir. Doku örneklerindeki *Candida*'ların araştırılmasında ise hematoksilen eozin, periyodik asit-schiff (PAS) ve methanamin gümüş boyaları kullanılmaktadır. Bu boyalar mantarın dokuya yayılım gösterip, göstermediğinin saptanmasına olanak tanır. (72-73).

Deri ve tırnak örnekleri için %10'luk KOH veya kalkoflor beyazı preparatı hazırlanırken, sistemik ve mukozal örnekler için diğer boyama yöntemleri kullanılır. KOH, kalın mukoid veya keratinize örneklerden *Candida* türlerinin ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Kalkoflor beyazı ise hücre duvarındaki β -1,3 ve β -1,4 polisakkaritlerine özellikle de selüloz ve kitine bağlanarak, mantarın kolay ve hızlı saptanmasını sağlayacak floresans oluşumuna neden olur (72-73). Gram boyama en çok kullanılan boyama yöntemi olup, maya hücreleri ve yalancı hifler genellikle gram pozitif, hifler ise gram negatif olarak boyanırlar (70).

Klinik örneklerin direkt incelenmesinin, mantar infeksiyonlarının tanısındaki en hızlı ve en ekonomik yöntemlerden birisi olduğu kabul edilmektedir. Kültür sonuçları günler içinde elde edilirken, dokudaki mayaların ve hif yapılarının mikroskopik olarak saptanması bir saatten az bir sürede tamamlanabilir. Ancak mikroskobinin duyarlılığı kültürden daha azdır ve

negatif bulunan bir direkt inceleme mantar infeksiyonunu dışlamaz. Genel olarak mantar infeksiyonunun tanısındaki en duyarlı ve altın standart yöntemin mantarın kültürde izolasyonu olduğu kabul edilir. Kültür aynı zamanda etyolojik ajanın identifikasyonu ve antifungal duyarlılık için de gereklidir (73).

Candida türlerinin soyutlanması için önerilen primer izolasyon besiyeri SDA olup, besiyerine ekilen örnekler 30°C’de inkübe edilmektedir. İzolasyon amacıyla SDA dışında; koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, inhibitör mold agar gibi besiyerleri de kullanılabilir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi antimikotik, kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilerek sırasıyla kontaminant saprofit mantarların ve bakterilerin üremesi engellenmektedir (65). Besiyerlerinde üreme 24 saat gibi erken bir sürede saptanabilmekle birlikte koloniler genellikle 48–72 saatte görünür hale gelmektedir. *Candida* türlerinin çoğu aerop koşullarda 25–30°C’de iyi üreme gösterirken, birçoğu da 37°C ve üzerindeki ısılarda üreyebilir (19).

Candida türleri genellikle düzgün yüzeyli, hafif kubbeli, kirli beyaz veya krem renkli, 1–2 mm çapında, tereyağ kıvamında maya kokulu koloniler oluşturur. *C. albicans* koyun kanlı agarda yıldız şeklinde kenarlarında kısa uzantıları olan “ayaklı koloniler” oluştururken, diğer mayaların çoğu bu tip koloni yapmaz. Ancak *C. tropicalis* ve *C. krusei* kökenlerinin %25 kadarının da ayaklı koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (19, 65).

Kültürde üremiş olan maya kolonilerinin tanımlanması için en hızlı, basit ve değerli testlerden biri çimlenme borusu testidir. Klinik örneklerden soyutlanan *C. albicans* ve *C. dubliniensis*’in çimlenme borusu testi pozitifdir. Çimlenme borusu maya hücresinden çıkan, ana hücrenin genişliğinin yarısı, boyunun ise 3–4 katı kadar uzunlukta paralel uzantılar olarak gözlenir ve hücreden çıkış noktasında boğumlanma oluşturmaz. *C. tropicalis* çimlenme borusu ile karışabilecek hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde belirgin bir boğumlanma mevcuttur ve blastokonidyaları *C. albicans*’inkilerden daha geniştir Testin uygulanmasında uzun inkübasyon süresi, yoğun maya inokulumu kullanılması, ortamda bakterilerin bulunması yalancı negatif sonuçlara yol açabilir. Ayrıca, hasta immünsüpresif ise veya antifungal sağaltım alıyorsa test %5 oranında negatif çıkabilmektedir (19, 65).

Daha ileri tanımlama için mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlar kullanılarak lam kültürü yöntemi ile *Candida* türlerinin morfolojik özellikleri değerlendirilir. Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı

hifler, blastokonidyalar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlamaya gidilir (65).

Mısır unu-tween 80 agarda hiflerin uçlarından geniş, kalın duvarlı, genellikle tekli terminal klamidosporlar, gerçek ve yalancı hifler, yalancı hiflerin çevresinde kümeler oluşturmuş blastokonidyalar görülmesi *C. albicans* olarak tanımlanır (65, 74).

C. tropicalis uzun yalancı hifler boyunca, boğumlanma noktalarında tekli veya küçük düzensiz kümeler halinde az sayıda blastokonidya üretimi ve nadiren yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, gözyaşı damlası şeklinde hücreler oluşturur (65, 74).

C. parapsilosis eğri görünümdeki kısa yalancı hifler boyunca tekli veya küçük kümeler halinde dizilmiş blastokonidyalar ve nadiren dev hücreler olarak isimlendirilen büyük hifler üretir (74).

C. krusei çapraz konulmuş odun kütükleri veya ağaç benzeri bir görünüm veren uzun blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturur (74).

C. glabrata ise terminal tomurcuklanma ile küçük oval maya hücreleri üretir, yalancı hif oluşturmaz (74).

C. guilliermondii az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri oluşturur, gerçek hif üretmez (74).

C. kefyr tipik olarak dereye yüzen kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturur (65, 74).

Koloni özelliklerine dayanarak *Candida* türlerinin ön identifikasyonu kromojenik agar besiyerleri ile de yapılabilmekte olup, bu amaçla piyasaya sürülmüş çok sayıda besiyeri bulunmaktadır. Tanımlama, ekzoenzim aktivitesi ile parçalanmış çeşitli substratlardan farklı kromojenik yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu temeline dayanmaktadır (19). Kromojenik besiyerleri %67 ile %100 arasında duyarlılık ve %56 ile %100 arasında özgüllüğe sahiptir (75-81). Bu besiyerleri tür identifikasyonunda tek başına değil, hızlı identifikasyona destek olarak diğer yöntemlerle birlikte kullanılmalıdır.

Candida türlerinin tanımlanması için kullanılan metabolik testler arasında karbonhidrat asimilasyon, karbonhidrat fermentasyon testleri, üreaz testi ve hızlı trehaloz gibi testler bulunmaktadır. Mayaların tür düzeyine kadar soyutlanmasında esas dayanak noktası karbonhidrat asimilasyon testidir. Bu test mayanın oksijen varlığında belirli bir karbohidratı

tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer. Karbonhidrat asimilasyon yöntemini temel alan otomatize ve yarı otomatize sistemler geliştirilmiştir (19). Bu sistemler genel olarak maya izolatlarının %59.6 ile %97.1'sini doğru olarak tanımlamaktadır (82-88). Karbonhidrat fermentasyon testleri mayaların CO₂ ve alkol üretimini araştıran testler olup, rutin identifikasyon amacıyla nadiren kullanılmaktadır. Üreaz testi, üreaz enzimi üretimini saptayan bir yöntem olup, uygun substratların varlığında üreaz enzimi üreyi parçalayarak amonyak açığa çıkartır, bu da besiyeri pH' sını arttırarak fenol kırmızısı indikatörünün rengini değiştirir. Çoğu *Candida* türü üreaz negatif olup, *C. lipolitica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları pozitifdir. Hızlı trehaloz testi flukonazole karşı azalmış duyarlılığı nedeniyle hızlı tanımlanmasının önem kazandığı *C. glabrata*'nın üç saat içinde olası identifikasyonuna olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu test için kanlı agar, *C. albicans* ve *C. tropicalis* için yüksek oranda yalancı pozitif sonuç verdiği için kullanılmamalıdır (19).

2.6.2. Serolojik Tanı

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında tanıya yardımcı olmak amacıyla serumda ve diğer vücut sıvılarında *Candida* türlerine özgü antijen, antikor veya metabolitlerin saptanması temeline dayanan çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir. Genel olarak mevcut serolojik testler sınırlı bir duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.

2.6.2.1. Antijen Saptayan Testler

Sistemik kandidoz tanısı için dolaşımda bulunan *Candida*'ya ait hücre duvar antijenleri ve sitoplazmik antijenler kullanılmaktadır (73). Günümüzde en yaygın kullanılan *Candida* antijeni hücre duvar mannopteini olan mannan'dır. Antimannan antikorları tarafından serumdan hızla temizlendiğinden düşük konsantrasyonlarda saptanabilmekte olup, testin sık uygulanması gerekmektedir (89). Lateks aglütinasyon testi veya enzim immün assay (EIA) kullanılarak dolaşımdaki hücre duvarı mannani spesifik bir şekilde saptanmaktadır. Ancak hastalar geçici olarak pozitif olduğundan ya da hastalığın geç evrelerine kadar saptanabilir bir antijen titresine sahip olmadığından bu testlerin duyarlılıkları düşüktür (21). Mannanemi altta yatan hastalığa, örnekleme sıklığına, immün yetmezliğin derecesine, ilgili *Candida* türlerine, sistemik kandidozun tanımlanmasına, bağlayıcı antikorların titresine, özgüllüğüne ve kullanılan test yöntemine göre sistemik kandidozlu hastaların yaklaşık %31 ile %90'ında görülmektedir (90). Mannan antijeninin saptanması amacıyla geliştirilen Platelia

Candida AG testi (Bio-Rad) %58 duyarlılık, %93 özgüllüğe sahiptir (91). Sendid ve ark. (92) testin özgüllüğünü arttırmak için mannan yanında ikinci bir antijen olarak β -1,2-oligomannanın da çalışılmasını önermekte, ancak β -1,2-oligomannan yalnızca *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis*’de bulunmaktadır.

Kandidoz tanısında aranan bir diğer mantar spesifik hücre duvar antijeni 1,3- β -D-glukan’dır. 1,3- β -D-glukan Zygomycetes hariç birçok mantarda bulunan polisakarit yapıdaki hücre duvar elemanıdır. *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida* gibi funguslarda bulunup, türe özgül olmaması nedeniyle glukanın kan ve diğer steril vücut sıvılarında saptanması hastada genel olarak sistemik bir mantar enfeksiyonunun varlığını duyarlı ve özgül olarak gösterir. Bu nedenle 1,3- β -D-glukan testleri invaziv kandidoz tanısı için kısmen yararlıdır (70, 90). Kontamine kan toplama tüpleri, gazlı bezler, kan ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan filtreler, selülöz membran kullanan hemodiyaliz ve çeşitli antibiyotikler (bazı sefalosporinler, karbapenemler ve ampicilin-sulbaktam) yalancı pozitif sonuçlara yol açabilir (93). Ancak yalancı pozitif sonuçlar genellikle serum 1,3- β -D-glukan seviyelerinin ani yükseliş ve düşüşü şeklinde gözlenirken, gerçek pozitif sonuçlar sabit yükselen değerler sergilemektedir (70).

C. albicans ve diğer bazı *Candida* türleri tarafından üretilen indüklenebilir bir enzim olan salgısal aspartik proteinaz (Sap) kandidoz tanısında kullanılabilen diğer bir antijendir. Sap’ın aktif doku invazyonu süresince üretildiği ve invaziv hastalık ile korele olduğu bildirilmiştir (90). Bir çalışmada Sap’ın EIA ile incelenmesinin sistemik kandidozu kolonizasyondan ayırdığı saptanmıştır (94).

Tanı amacıyla sitoplazmik antijenler de aranabilmektedir. Bunlardan en fazla kullanılanı 48 kDa’luk sitoplazmik bir protein olan enolazdır. Enolaz *Candida* türlerine oldukça özgül olup, yüzeysel kandidozlarda serumda saptanmaması bir avantaj olarak bildirilmiştir (95).

2.6.2.2. Antikor Saptayan Testler

Sistemik kandidozların serolojik tanısında antikor arama testleri yüz güldürücü sonuçlar vermemiştir. Antikor saptayan testlerin immun yetmezlikli hastalarda antikor seviyesinin düşük veya saptanamayacak kadar az olması nedeniyle yalancı negatif, yüzeysel kolonizasyonlu hastalarda antikor titrelerinin yüksekliği nedeni ile yalancı pozitif sonuçlara yol açabildiğinden tanı değeri sınırlıdır (90). Sadece kolonizasyon olması durumunda antikorların saptanması testlerin özgüllüğünü düşürmektedir. Kandidozun klinik bulgularının

varlığında, ardışık alınan serumlarda antikor titresinin artmaya devam etmesi infeksiyon lehine değerlendirilebilir.

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tanısında mannan, 54 kDa, 52 kDa'luk sitoplazmik protein antijenleri, Sap gibi çeşitli *Candida* antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar araştırılmaktadır (90).

2.6.2.3. Kombine Testler

Yapılan çalışmalarda antikor ve antijen testlerinin kombine değerlendirilmesinin tanıya daha fazla yardımcı olabileceği bildirilmiştir (90, 95-98). Mannan ile antimannan testlerinin kombine kullanımının duyarlılığı ve özgüllüğü, farklı hasta grupları, klinik tanı kriterleri ve örnek alma sayısı ile değişmekle birlikte sırasıyla %73-100, %80-93 arasında değişmektedir (99).

2.6.2.4. Metabolit Saptayan Testler

D-arabinitol *C. krusei* ve *C. glabrata* dışında birçok *Candida* tarafından oluşturulan metabolit bir üründür. D-arabinitol'un idrar ve serumda saptanması ile invaziv kandidoz tanımlanabilir. İnsan serumu veya idrarında, D-arabinitol varlığının veya D-arabinitol/L-arabinitol oranının belirlenmesinde gaz-likit kromatografisi, gaz kromatografisi-kitle spektrometrisi ve enzimatik yöntemler gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (70). Ticari bir testin bulunmamasına ek olarak yöntemle bağlı duyarlılık ve özgüllükte ortaya çıkan değişiklikler nedeniyle metabolit saptamanın tanıdaki yeri belirsizdir (73).

2.6.3. Moleküler Tanı

Geleneksel tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında, artmış duyarlılığa ve kısalmış uygulama süresine sahip olan moleküler yöntemler patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce veya kültür yapılırken saptanması, kantitasyonu ve hızlı identifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Şu ana dek geliştirilmiş moleküler yöntemlerde tam bir standardizasyon sağlamadığından, tek başına kullanımları önerilmemektedir (100).

Moleküler yöntemler epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde de kullanılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri hibridizasyon "probe"lerinin

kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki gruptur (100).

2.6.3.1. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri

Moleküler çoğaltma yöntemleri klasik boyama ve kültür yöntemlerine göre daha yüksek duyarlılık sergilemekle birlikte, kolonizasyon veya subklinik infeksiyon nedeniyle asemptomatik bireylerde de pozitif sonuçlar verebilmektedir (70).

Nükleik asitleri saptama işlemi üç temel basamakta gerçekleşir. İlk olarak, örnekten nükleik asitler açığa çıkarılmalıdır. İkinci olarak, çoğaltılacak bir hedef seçilmelidir. Genel olarak, geniş kapsamlı (universal) öncüller başlangıçtaki hedefi çoğaltmak, daha sonra da türe özgül öncüller organizmayı identifiye etmek için kullanılır. Üçüncü olarak çoğaltılan hedef bölgenin varlığını tanımlayan bir yöntem belirlenmelidir. Bunun için DNA “probe”ları, “microarray”ler, floresans in situ hibridizasyon, polimeraz zincir tepkimesi (PZT), “reverse-hybridization line probe assay”, nükleik asit sekansına dayalı çoğaltma (NASBA) ve “pyrosequencing” gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır (70).

2.6.3.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde patojen mantarı saptamak veya tanımlamak için kullanılır. *Candida* türlerinin tanısında kullanılan hedef bölgeler genellikle genom içerisinde kopya sayılarının çok olması nedeniyle tercih edilen ribozomal DNA (rDNA) genleridir. Bu amaçla; tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri kullanılır. Korunmuş olan bu bölgeler türler arasında yeterince farklılık göstermemeleri nedeniyle identifikasyon için uygun değildir. Bu sebeple *Candida*’ların tür düzeyinde tanımlanmasında; ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan “internal transcribed spacer” (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P450 lanosterol alfa-demetilaz (*LIA1*), salgısal aspartik proteinaz (*SAP*), aktin, kitin sentaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef bölge olarak kullanılmaktadır (100-102). Seçilen hedef bölgeye, saptama yöntemine ve incelenen hasta popülasyonuna göre değişmekle birlikte PZT yönteminin duyarlılığı %63-100, özgüllüğü %54-100 olarak bildirilmiştir (99).

“Taqman” ve “LightCycler” teknikleri gibi GZ PZT yöntemleri tek bir reaksiyonda hızlı bir şekilde çoğaltma, hibridizasyon ve ampikon saptanmasını gerçekleştirebilir. GZ PZT

teknolojisi reaksiyonun log/linear faza girdiği noktayı saptayabilmesi ve bu noktanın da orjinal örnekteki hedef DNA miktarını yansıtmaması nedeniyle kantitatif sonuçlar vermektedir. Bu teknolojiler ile bir saatten kısa sürede sonuç alınabilmekte ve kontaminasyon önlenmektedir (70, 100). GZ PZT yönteminin hedef bölge, problemler, sistem ve araştırılan hasta gruplarına göre değişmekle birlikte duyarlılık oranı %80-100, özgüllük oranı %89-100 arasında bildirilmiştir (99).

2.6.3.1.2. Sekanslama (Dizi Analizi)

Mantarları tanımlamada kullanılan alternatif bir yöntem de nükleik asit dizi analizidir. Çok kopyalı gen bölgelerini hedefleyen PZT sonrası yapılan dizi analizi sonucu elde edilen nükleik asit dizisi, veri tabanından bilinen diziyle karşılaştırılır ve tanımlama iki dizi arasındaki benzerliğe dayanarak yapılır. Yöntem teknik olarak karmaşık ve gelişmiş laboratuvar olanakları gerektirmekte olup, bu yöntem ile mayaların identifikasyonu için geçen süre 24–36 saattir (100-101).

2.6.3.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri

Etkene ait hedef nükleik asitlerin belirli bölgelerine komplementer nükleik asit hibridizasyon “probe”lerinin kullanıldığı yöntemlerdir. Bu yöntemler sıklıkla kültür doğrulaması için kullanılmaktadır. *Candida* identifikasyonu için “Southern blot”, “Northern blot”, “dot blot” ve “in situ” hibridizasyon gibi teknikler çalışılmıştır. Ancak DNA üzerindeki hedef bölgelerin sınırlı sayıda olması nedeni ile direkt etkene özgün “probe” hibridizasyon testlerinin duyarlılığı düşüktür (102).

Nükleik asit temelli yöntemler ile *Candida*’nın saptanmasında, çok kopyalı gen bölgelerini hedefleyen PZT ile birlikte türe özgü problemlerin kullanıldığı yöntemlerin en yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına sahip olduğu; rDNA gen kümesinin popüler bir hedef olduğu ancak *Candida LIA1* geninin hedef alındığı PZT-REA ile *SAP* geninin hedef alındığı PZT yöntemlerinin ve de GZ PZT teknolojisinin de umut verici olduğu vurgulanmıştır (99).

2.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç

Fungal infeksiyonlardaki artışın bir sonucu olarak, antifungal ajanların yaygın kullanımları bu bileşiklere dirençli mantar türlerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Günümüzde sıklıkla kullanılan antifungal ilaç sınıflarında, polyenler, azoller, allilaminler, 5-

flusitozin (5FC) ve ekinokandinler yer alır. FLU gibi azoller ve terbinafin gibi alilaminler ergosterol biyosentezini hedef alırken, amfoterisin B (amB) gibi polyenler plazma membranındaki ergosterole bağlanarak porlar oluşturur ve membran geçirgenliğini bozar. 5FC, primidin metabolizmasını ve DNA sentezini inhibe eder. Ekinokandinler ise β -1,3 glukan sentezini inhibe ederek, hücre duvar yapısını bozar (103).

Mantarların direnç kazanma amacıyla antifungal ilacı bozma veya ilaçta değişiklik oluşturma yeteneklerine dair kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca antifugal direnç genleri hücreden hücreye aktarılamaz. Bununla birlikte dışarı atım pompaları, hedef değişiklikleri ve ilacın hedef bölgeye girişinin azaltılması gibi antifungal ilaçlara direnç oluşturan önemli mekanizmalar belirlenmiştir (104).

2.7.1. Polyenler

2.7.1.1. Amfoterisin B ve Lipid Formülasyonları

Bu grup, polyen grubu antifungaller olup, oral yoldan iyi emilmez, bu nedenle parenteral uygulama gerektirir. Akciğer, dalak, kemik iliği ve böbrekler de dahil olmak üzere birçok doku ve organda dağılım gösterir, ancak BOS'a geçişi zayıftır (104-105).

AmB'nin parenteral formülasyonu amfoterisin B deoksikolattır. AmB'nin nefrotoksik bir bileşik olması nedeniyle, lipid formülasyonları geliştirilmiştir. Lipid amB bileşiklerinin daha iyi tolere edilmesi ve enfeksiyon bölgesine konvansiyonel formülasyona göre daha yüksek düzeylerde ulaşması sebebiyle etki spektrumu aynı olmasına karşın *invivo* aktivitesi konvansiyonel amB'ye göre daha iyidir (104-105).

AmB fungisidal etkisini mantar hücre membranındaki esas sterol olan ergosterole bağlanarak osmotik bütünlüğü bozarak gösterir. Bu bağlanma hücre içi potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin kaybı ve sonunda hücre ölümüne yol açar. AmB memeli hücresinin temel membran sterolu kolesterole az bir afinite ile de olsa bağlanabilir ve toksik etkiler gösterir. AmB'nin ek bir etki mekanizmasının da kendi oksidasyonu ile tetiklenen oksidatif hasara bağlı direkt membran hasarı olabileceği öne sürülmüş ancak oksidan etkinin antifungal aktiviteye katkısı netleşmemiştir (104-105).

AmB'nin etki spektrumu geniştir ve *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, *Mucor* türleri, *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides imitis*, *Histoplasma capsulatum* ve *Paracoccidioides brasiliensis*'i kapsar (104-105).

Yapılan çalışmalarda genel amB direnci %0 ile 3.8 arasında bulunmuştur (106-112). *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Aspergillus terreus* amB'ye intrinsek dirençli iken, tüm *Candida* türlerinde düşük oranda da olsa sekonder direnç bildirilmiştir (104-105). AmB direnci membran sterollerindeki değişiklikler ile ilişkilendirilmiş olup, genellikle ergosterol düzeyindeki düşüş nedeniyle amB'nin bağlanması bir azalma sonucu meydana gelmektedir (105, 103, 113).

Bu ilacın başlıca yan etkisi nefrotoksisitedir. Bunun dışında, sağaltım sırasında akut yan etkiler (ateş, titreme, myalji, hipotansiyon, bronkospazm) ve tromboflebit gelişebilir (105).

2.7.1.2. Nistatin

Nistatin topikal bir polyen olup, etkisi AmB'ye benzerdir. Sistemik kullanım için lipozomal formu da geliştirilmiştir (105, 114).

2.7.2. Azol Türevleri

Azol sınıfı antifungaller azol halkasında iki yada üç nitrojen bulunmasına göre imidazoller (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol) ve triazoller (flukonazol, itrakonazol) olarak sınıflandırılmaktadır. Yeni geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan yeni kuşak azoller (vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol ve isavukonazol) triazol grubundadır (104-105).

Azol bileşikleri, ergosterol sentezinde rol alan bir enzim olan sitokrom P-450 bağımlı lanosterol 14 α -demetilazı inhibe ederek antifungal etki gösterir. Ergosterol biyosentez yolağındaki bu anahtar enzim lanosterolden 14 α -metil grubunun oksidatif olarak kaldırılmasını katalizler. Azollerin nitrojen atomu ile enzimin aktif bölgesinde yer alan hem molekülü içersindeki demir atomunun bağlanması sonucu, lanosterolün demetilasyonu için gereken oksijenin aktivasyonu engellendiğinden enzim inhibe olur ve ergosterol yapımı bozulur. 14 α -demetilazın inhibisyonu sonucu biriken 14 α -metil steroller mantarın plazma membranının akışkanlığı ve fonksiyonunu değiştirir ve bunun sonucunda ortaya çıkan hücreler konağın oksijene bağımlı mikrop öldürücü sistemlerine daha duyarlı hale gelir. Azoller genel anlamda fungistatik etki gösteren ve kısmi üreme inhibisyonu ("trailing effect") yapan bileşiklerdir (103-105).

Ketokonazol, oral olarak kullanılan ilk imidazol olup sistemik mikoz, dermatofitoz ve kutanöz kandidoz sağıaltımında kullanılan lipofilik bir antifungaldir. *Candida* türlerine karşı etkili olmasına rağmen, etkinliği triazol grubu antifungallere göre sınırlıdır. Diğer azollere dirençli *Candida* suşlarının bazılarında ketokonazole çapraz direnç görülebilir. Ketokonazolün mide ve karaciğer toksisitesi, mide bulantısı, kusma ve döküntü gibi ciddi yan etkileri izlenebilmekte olup, bu ilacın kullanmını kısıtlamıştır (104-105).

İtrakonazol oral ya da intravenöz olarak uygulanabilen lipofilik bir triazol olup, geniş bir mantar topluluğına etkilidir. Yapılan çalışmalarda *Candida* türleri arasında itrakonazol direnci %1 ile %13.3 arasında değişmekte olup, özellikle *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarında saptanmıştır (110, 111, 115, 116). FLU ile karşılaştırıldığında en önemli avantajı *Aspergillus*'a karşı antifungal aktivite göstermesidir. Pürülan eksüdalarda, yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşırken, BOS'a geçişi zayıftır. Yan etki olarak özellikle yüksek dozlarda, hipokalemi, ödem ve hipertansiyon gözlenebilir (104-105).

Vorikonazol, yapısal olarak FLU'ya benzeyen bir triazoldür. Oral ve intravenöz formları mevcuttur. Santral sinir sistemi de dahil olmak üzere birçok dokuya dağılım gösterir. Ergosterol biyosentezini doza bağımlı bir şekilde inhibe etmektedir. FLU'ya dirençli bazı *C. albicans* suşları da dahil olmak üzere geniş bir antifungal spektruma sahiptir. Vorikonazol maya benzeri mantarlara karşı fungistatik, *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal etkinlik gösterir. İnvaziv aspergilloz, nötropenik olmayan hastalardaki *Candida* infeksiyonları ve invaziv kandidozda kullanılmak üzere 2002 yılında "Food Drug Administration" (FDA) onayı almıştır. "ARTEMIS DISK" evrensel antifungal sürveyans programı verilerine göre *Candida* türlerinin vorikonazol direnç oranı %3 olarak bildirilmiştir. Vorikonazolün en önemli yan etkileri geçici görme bozukluğu ve karaciğer enzimlerindeki yükselmedir (104, 105, 117, 118).

Posakonazol, *Candida* türleri başta olmak üzere pek çok mantar türüne etkili olup, oral formu mevcuttur (104). Bu azol 2006 yılında, invaziv *Aspergillus* ve *Candida* infeksiyonlarına karşı profilaksi amacıyla kullanılmak üzere FDA onayı almıştır (119).

Ravukonazol, geliştirilmekte olan yeni antifungal ilaçlardan olup, oral ve parenteral formları bulunmaktadır (104). Bu ilaç FDA tarafından henüz onay almamış olup, hayvan ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar bu ajanın sıklıkla fungisidal olduğunu göstermiştir (120)

FLU, oral ya da intravenöz yoldan kullanılabilen, suda çözünür, birinci kuşak bir triazoldür. Toksisitesinin az olması, uygulama kolaylığı ve maya benzeri mantarların çoğına

karşı gösterdiği fungistatik etkinlikten dolayı özellikle kandidoz sağaltımında yaygın olarak kullanılan bir antifungaldir. Hepatik, gastrik ve endokrinolojik yan etkilere düşük oranda yol açması ve BOS’a iyi geçmesi başlıca avantajlarıdır (104-105).

Candida türleri arasında, *C. krusei*, FLU’ya doğal dirençlidir. *C. glabrata* ise FLU’ya düşük düzey doğal direnç sergilemekte olup, ilaçla karşılaşma sonucu kolaylıkla ve yüksek seviyede direnç geliştirmektedir (35). *C. glabrata* izolatlarının FLU duyarlılıkları farklılık göstermekte olup, bazıları doza bağımlı duyarlı iken, %15 kadarı gerçek direnç göstermektedir. *C. tropicalis*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis* ve *C. inconspicua* suşarında genellikle yüksek FLU minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmaktadır. FLU’ya kazanılmış direnç çeşitli *Candida* türlerinde gözlenmiştir (104-105).

Başta *C. albicans* olmak üzere *Candida* türlerinde azol direncinden sorumlu birçok mekanizma bildirilmiştir. Bu mekanizmalar:

- (i) İlacın hedefi olan lanosterol 14 α -demetilazda değişiklik
- (ii) İlacın hücre içinde birikiminde azalma
- (iii) Ergosterol biyosentezinde değişiklik şeklinde özetlenebilir (11, 103).

(i) İlacın hedefi olan lanosterol 14 α -demetilazda değişiklikler

Hedef 14 α -demetilazı kodlayan *ERG11* geninin fazla ekspresyonu hücre içi enzim seviyesinde artışa ve dolayısıyla da FLU direncine neden olmaktadır (11, 103). *ERG11* geni, *ERG* yolağındaki diğer genlerle birlikte *UPC2* (“uptake control 2”) tarafından kodlanan ve Zn₂Cys₆ bağlayan bir motif içeren transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir. *UPC2*’nin delesyonu ergosterol yolağında görevli genlerin düzenlenmesini etkilemektedir (103). Ayrıca *UPC2*’deki bazı mutasyonların sıklıkla *ERG11*’in fazla ekspresyonuna neden olarak azol direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (121).

ERG11 geninde fazla ekspresyon saptanan dirençli klinik izolatlar genellikle gendeki nokta mutasyonlara da sahip olduğundan, *ERG11* fazla ekspresyonunun tek başına etkisi tam belirlenememiştir (103).

ERG11’i kodlayan bölgedeki nokta mutasyonlar nedeniyle enzimde ortaya çıkan yapısal değişiklikler enzimin azollere afinitesinde azalma ile sonuçlanır (11, 103). Mutasyonların azollere olan afiniteyi etkilemesi iki şekilde ortaya çıkmaktadır: (a) mutasyondan etkilenen aminoasit, azol molekülünün bir kısmı ile direkt temasta olduğundan, azol mutasyona uğramış proteine daha az etkili bağlanır; (b) aminoasit değişimi azol molekülü ile optimal bağlanma

için önemli olan α -heliks zincirlerinin üç boyutlu yapısını değiştirdiğinden, mutasyona uğramış proteinin azollere afinitesinde azalma meydana gelir. Yabani tip *C. albicans*’larda üç adet “hot spot” bölge tanımlanarak, şimdiye dek bildirilen 140’dan fazla mutasyonun bu bölgelerde kümelenmiş olduğunu rapor edilmektedir. Bu bölgeler 105-165, 266-287, 405-488 amino asitlerini kapsar. Proteinin membrana gömülü kısmı olarak düşünülen başlangıç kısımlarındaki mutasyonlar ise direnç ile ilişkili bulunmamıştır. Birinci bölge, substrat veya inhibitör giriş kanalına yakın olduğundan azollerin bağlanma afinitelerini etkilemektedir. İkinci bölge G ve H heliks arasında bulunmakta olup, üçüncü bölge hem bölgesinin arkasında yer almaktadır. Ortaya çıkan amino asit değişimlerinden deneysel olarak direnç ile ilişkilendirilmiş olanlar F72L, F105L, F126L, Y132H, D278E, K143R, T315A, S405F, F449L, G450E, G464S, G465S, R467K, V488I, A107T, G448V, V509M, Y257H, I471T, E116E, N136Y, Y221H, L276S, Y447H, G307S, F72S, F145I, G227D, A61V, A114S, Y132F, K143Q, G448E, F449S ve L321F olup, ayrıca dirençte etkisi olduğu düşünülen birçok mutasyon bildirilmiştir (122-127).

(ii) İlacın hücre içinde birikiminde azalma

Bir mantar hücresinde ilaç birikimi; ilacın alımı, ilacın atılımı ve ilacın metabolizması arasında oluşan bir denge sonucunda meydana gelir. Hücre içi ilaç birikiminde azalma, ilacın hücre içine alımında bozukluk veya ilacın aktif pompalar ile atılımının artması sonucu meydana gelmektedir. Membran sterollerindeki değişimler nedeniyle membranın geçirgenliği bozulur ve bu da azol birikimini azaltır (103).

Mantarlarda küçük moleküllerin, hücrelerin plazma membranının her iki yönüne doğru hareketinde, atım pompaları işlev görmektedir. Bunlar ATP bağlayan kaset taşıyıcılar (“ATP binding cassette transporters”; ABCT) ve majör kolaylaştırıcılar (“major facilitators”; MFs) olmak üzere iki sınıfta toplanmaktadır (103).

ABCT pompaları plazma membranında bir kanal oluşturacak şekilde bir araya gelip membran boyunca uzanan iki adet domain’den ve pompanın enerji kaynağı olarak ATP’ye bağlanan ve onu kullanan iki adet nükleotit bağlayan “domain”den meydana gelir. *C. albicans* suşlarındaki azol direnci ABCT pompalarını kodlayan Candida ilaç direnci (CDR) gen ailesi ile ilişkilendirilmiş olup, dirençli suşlarda *CDR1* ve *CDR2*’nin fazla ekspresyonu gösterilmiştir. *CDR1* ve *CDR2* yakın ilişkili olmakla birlikte, azol direncinde Cdr1p’nin Cdr2p’den daha önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle azollere karşı daha iyi bir taşıyıcı

olduğu bildirilmiştir. Bu pompaların fazla ekspresyonu sadece FLU, itrakonazol, ketokonazol gibi azoller ile birlikte terbinafin, amorolfın ve birçok metabolite de dirence neden olmaktadır. (11, 103, 128).

MF pompaları da, plazma membranında bir kanal oluşturacak şekilde bir araya gelip membran boyunca uzanan iki adet “domain”den oluşur. Bu pompalar enerji kaynağı olarak membranın proton potansiyelini kullanır. MF pompaları molekülleri antiport yolu ile taşır; protonlar hücreye girer ve küçük moleküller hücreden uzaklaştırılır. *C. albicans*’da iki MF pompa geni tanımlanmıştır. Bunlar *MDR1* veya *Ben-R* geni ve *FLU-1* genidir. Klinik *C. albicans* izolatlarında *MDR1*’in mRNA düzeylerindeki artışın, azol direnci ile paralellik gösterdiği ve bunun FLU için özgün olduğu saptanmıştır. Ancak *FLU-1* geninin fazla ekspresyonu hiçbir dirençli klinik izolatta ortaya konamamıştır (11, 103).

Klinik *C. albicans* izolatlarında azol direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenin çoklu atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu bildirilmektedir (11). Yapılan çalışmalarda atım pompa genlerinin transkripsiyonunda regülatör bölge olan ve özgün DNA sekansları ile yanıt elemanlarını içeren “promoter” bölgeleri ile bu bölgeleri tanıyarak bağlanan transkripsiyon faktörlerinin önemli rol oynadığı belirlenmiştir (129-130).

Bu “promoter” bölgelerindeki veya transkripsiyon faktörlerindeki değişimlerin atım pompalarının fazla ekspresyonuna ve sonuç olarak azol direncine neden olduğu saptanmıştır. *CDR1* ve *CDR2* genlerinin transkripsiyon yoluyla düzenlenmesinde önem taşıyan “promoter” bölgeleri içinde ilaç yanıt elemanı (DRE), steroid yanıt elemanları (SRE) ve negatif yanıt elemanı (NRE) tanımlanmıştır. Bu “cis-acting” elemanları arasında sadece DRE’nin azol dirençli suşlarda *CDR1* ve *CDR2* fazla ekspresyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Azol dirençli *C. albicans* izolatlarında *CDR1* geninin “promoter” bölgesindeki nokta mutasyonlarının dirençli suşlardaki fazla ekspresyonundan sorumlu olabileceği belirtilmiştir. *CDR1* ve *CDR2*’nin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerinden *TAC1*, Zn_2Cys_6 transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olup, DRE’i tanır (103). *TAC1* allellerindeki heterozigotluğun kaybı ve kazanılmış fonksiyon mutasyonlarının *CDR1* ve *CDR2*’nin fazla ekspresyonuna neden olduğu bildirilmektedir (130). *MDR1* “promoter” bölgesi içinde iki “cis-acting” regülatör eleman saptanmıştır. Bunlardan biri “benomyl” yanıt elemanı (BRE), diğeri ise H_2O_2 yanıt elemanı (HRE) olup, her ikisinin de *MDR* regülasyonu ve fazla ekspresyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, FLU’ya dirençli izolatlarda *MDR1*’in fazla ekspresyonundan BRE bölgesinin sorumlu olduğu saptanmıştır. *MDR1* fazla

ekspresyonunun, düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörünü kodlayan *MRR1*'deki kazanılmış fonksiyon mutasyonlarından kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu mutasyonları içeren FLU dirençli *C. albicans* suşlarında *MRR1* allellerindeki heterozigotluk kaybı, *MRR1*'in yerleştiği iki kromozom 3 alleli arasında gerçekleşen mitotik rekombinasyondan veya mutant *MRR1* allelini içeren kromozomun duplikasyonundan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte bazı ek transkripsiyon faktörlerinin de *MDR1* ekspresyonunun kontrolünde rolü olduğu bildirilmiştir. *CAP1* ve *MCMI*, *MDR1*'in “promoter”inde bağlanma bölgesine sahip olduğundan FLU dirençli *C. albicans* izolatlarında *MDR1* fazla ekspresyonunun *MRR1* dışındaki diğer transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlardan da kaynaklanabileceği olası görünmektedir (131-136).

(iii) Ergosterol biyosentezinde değişiklik

Ergosterol biyosentez yolağında 14 α -demetilazdan daha erken bir basamakta rol alan, $\Delta^{5,6}$ desatüraz enziminin inaktivasyonu ile biyosentez yolunun değişmesi veya enzimi kodlayan *ERG3* genindeki mutasyonlara bağlı olarak membran sterolünün yapısında meydana gelen değişiklikler ve 14 α -metil fekosterol birikimi azol direncine neden olmaktadır (11, 103, 137).

Sonuç olarak klinik *C. albicans* izolatlarının azol direncinde birden fazla mekanizmanın rol aldığı ve bunların basamak tarzı bir direnç gelişimine neden olduğu belirtilmektedir (11). Direncin genelde tek bir değişiklik sonucu ortaya çıkmadığı, aksine dirençli bir hücre ortaya çıkarken, buna birkaç değişikliğin katkıda bulunduğu görülmektedir. Her bir değişiklik, izolatin topluluktaki diğer hücelere göre daha fazla üremesine olanak sağlarken, onun temel köken olarak varlığını sürdürmesine neden olur. Ardı ardına meydana gelen değişiklikler, kökenin giderek oldukça dirençli bir fenotip haline gelmesine olanak sağlar. Bu olay, her birisi, hücre direncini hafifçe arttıran birkaç değişikliğin sonucunda ortaya çıkar (103).

2.7.3. 5-Flusitozin (Florositozin)

5-FC florlanmış bir pirimidin analogu olup, antimetabolit olarak etki gösteren tek antifungaldir. Bu ilaç, pirimidin metabolizmasını bozarak ve böylece mantar hücresindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir. 5-FC, sitozin permeaz aracılığıyla mantar hücresine girer ve stoplazmada sitozin deaminaz ile 5 florourasile (5FU)

dönüşür. 5FU'nun fosforlanması sonucu 5-floroürütilik asit oluşur ve sonrasında RNA sentezi sırasında urasille yarışa girerek RNA'nın yanlış kodlanmasına, DNA ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açar. 5 Flusitozin, sitozin deaminaz enzimi memelilerde bulunmadığı için seçici olarak funguslara toksik etki gösterir (104, 105, 113).

5-FC'nin etki spektrumu *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* türleri ve bazı esmer küflerle sınırlıdır. Flusitozine primer direnç ya da azalmış duyarlılık *Candida* kökenleri ve *C. neoformans* dahil birçok mantar türünde gözlenmektedir. Oral yoldan uygulandığında biyoyararlanımı iyi olup, serum, BOS ve diğer vücut sıvılarına da kolayca geçer (104-105).

Klinik *C. albicans* izolatlarının %10 kadarı 5-FC'ye doğal olarak dirençlidir, duyarlı izolatların %30 kadarı ise direnci tedavi sırasında kazanır. 5-FC monoterapisi nedeni ile sekonder dirence neden olan mutasyonlar kolaylıkla gelişir. Direnç sitozin deaminaz, urasil fosforiboziltransferaz veya pürin-sitozin permeazdaki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (103, 113).

Bu ilaç hem primer direnç olasılığı, hem de sekonder direnç eğilimi yüzünden tedavide tek başına kullanılmamalı, mutlaka kombine sağaltım uygulanmalıdır. AmB ya da FLU ile kombinasyonu kriptokokkoz ve kandidoz tedavisinde etkili bulunmuştur (104-105).

5-FC'nin başlıca yan etkileri kemik iliği baskılanması, hepatotoksisite ve gastrointestinal intoleranstır (104-105).

2.7.4. Ekinokandinler

Ekinokandinler geniş bir etki spektrumuna sahip lipopeptit yapıdaki bileşiklerdir. β -1,3-glukan sentazı inhibe ederek, glukan sentezini bozar ve mantar hücre duvarı sentezini durdurur. Memeli hücreleri β -1,3-glukan içermediğinden bu grup ilaçlar seçici toksik etki göstermektedir (104, 105, 113).

Ekinokandinler *Candida* türlerine karşı fungisidal, *Aspergillus* türlerine karşı ise fungistatik etki gösterir. FLU'ya dirençli *Candida* türlerine karşı ekinokandinlerin etkinliği mükemmeldir. Ancak *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *Trichosporon* türlerine karşı etkisinin, diğer mayalara etkisine oranla daha sınırlı olduğu gözlenmiştir (104, 105).

İn vitro olarak, direnç genellikle hedef enzim olan glukan sentazı kodlayan *FKS1*, *FKS2*, *FKS3* genlerinde ve hedef ile etkileşimde bulunan proteinlerdeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır (103, 113).

Ekinokandinlerin oral biyoyararlanımlarının sınırlı olması nedeniyle sadece intravenöz formları mevcut olup, genel olarak minimal düzeyde toksisiteye yol açar (105).

Ekinokandinlerden kaspofungin kandidemi dahil invaziv kandidozlu ve diğer antifungallerle sağaltıma yanıt vermeyen invaziv aspergillozlu hastalarda kullanım için, anidulafungin ve mikafungin ise özafagus kandidozu ve kandidemi sağaltımı için onay almıştır (104).

2.7.5. Alilaminler

Alilamin sınıfı antifungal ilaçlar sistemik etkili terbinafin ve topikal etkili naftifinden oluşur. Terbinafin geniş etki spektrumlu lipofilik bir antifungal olup, oral ve topikal formları mevcuttur. Deri, saç tırnak ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşması nedeniyle bu bölge infeksiyonlarında kullanılmaktadır (104-105).

Alilaminler, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini engeller. Ergosterol eksikliği ve skualenin yüksek konsantrasyonlarda birikmesine bağlı olarak membran yapı ve fonksiyonunun değişimi sonucu mantar hücresinin ölümü gerçekleşir. *Candida* türlerinin çoğuna, dermatofitler ve filamentöz funguslara etkilidir. Terbinafin, azollerle birlikte kullanıldığında, azollere azalmış duyarlılık gösteren bazı *Candida* kökenlerine karşı sinerjik etki gösterebileceği gözlemlenmiştir (104-105).

2.8. Antifungal Duyarlılık Testleri

Antifungal direncin izlenmesi ve sağaltımın yönlendirilmesi amacıyla antifungal duyarlılık testlerinin kullanımı ve önemi arttırmıştır. İn vitro antifungal duyarlılık testleri; i) iki ya da daha fazla antifungal ilacın göreceli etkinliklerinin güvenilir bir ölçümünü sağlar, ii) in vivo etkinlik ile paralellik gösterir ve sağaltımın muhtemel sonucunu öngörür, iii) normalde duyarlı olan bir organizma popülasyonu içindeki direnç gelişimini izlemeye kullanılan bir araçtır ve iv) yeni bulunmuş deneysel ilaçların sağaltıcı potansiyelini öngörür. Antifungal duyarlılık testleri dilüsyon, agar difüzyon ve diğer yöntemler olmak üzere üç grupta toplanmaktadır. En sık kullanılan antifungal duyarlılık testleri makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E test yöntemleridir. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi mayalar için makrodilüsyon ve mikrodilüsyon (M27-A3), disk difüzyon (M44-A2); küfler için makrodilüsyon ve mikrodilüsyon (M38-A2) ile disk difüzyon (M51-A) duyarlılık testleri için

referans yöntemler geliştirmiştir. Ayrıca EUCAST Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi tarafından mayalar ve küfler için benzer mikrodilüsyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu referans yöntemler, elde edilen in vitro antifungal duyarlılık verilerinin tekrarlanabilirliğinde ilerleme ve kullanımda olan antifungaller için direnç sınır değęlerinin belirlenmesi ile mantarlar için standardizasyon sağlamıştır.

In vitro antifungal duyarlılık testleri; inokulum miktarı ve hazırlama şekli, besiyeri içeriği ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile MİK değęrinin saptanmasında kullanılan kriterler de dâhil olmak üzere birçok teknik değışkenden etkilenmektedir (138).

2.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler

2.8.1.1. Makrodilüsyon Yöntemi

Sıvı makrodilüsyon testleri, tüm antifungal ilaçların çalışılması için yeterli olup, bu testlerin az sayıda uygulandığı küçük laboratuvarlar için uygundur. CLSI tarafından kullanılması önerilen besiyeri, L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 sıvı besiyeridir. Besiyeri, son konsantrasyonu 0,165M olacak şekilde morfolinepropanesulfonikası (MOPS) ile 25°C'de pH'sı 7,0'e tamponlanmış olmalıdır. Test için yuvarlak tabanlı, kapaklı ve steril polistiren tüpler kullanılmaktadır. 35°C'de 48 saat çalkalamadan yapılan inkübasyon sonrasında, tüpte oluşan bulanıklık ya da üreme görsel olarak derecelendirilir. AmB için, görülebilir herhangi bir üreme oluşumunu engelleyen en düşük konsantrasyon, MİK değęri olarak kabul edilir. Azoller ve 5-FC için, üreme kontrolüne göre, üremeyi %80 oranında azaltan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değęri olarak tanımlanır (138-139).

2.8.1.2. Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antifungal duyarlılık testleri içinde kolaylığı nedeniyle en yaygın kullanılan ve CLSI alt komitesi tarafından önerilen ilk yöntemdir. Mikrodilüsyon yöntemiyle tutarlı MİK sonuçları elde edilebilmektedir ve bazı ilaçlar için elde edilen MİK değęlerinin laboratuvarlar arası uyumu, makrodilüsyon ile elde edilenlere göre daha yüksektir. Mikrodilüsyon testi, steril, 96 kuyucuklu U tabanlı mikrodilüsyon plaklarında uygulanır. RPMI 1640 besiyeri, iki kat yoğunlukta hazırlanmış ilaç çözeltisi ve maya süspansiyonları kullanılır. 35°C'de inkübe edilen mikrodilüsyon plakları AmB ve FLU için

24. ve 48. saatlerde, ekinokandinler için 24. saatte, 5-FC ve diğer azoller için ise 48. saatte değerlendirilir. Değerlendirme gözle ve azoller için spektrofotometrik olarak yapılır. AmB için; üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon, azoller, ekinokandinler ve 5-FC 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 (138-139).

5-FC ve azollerde görülen kısmi inhibisyon (“trailing”) etkisi, MİK değerinin belirlenmesinde güçlük yaratır ve test sonuçlarının farklı yorumlanmasına neden olur. Bu nedenle bu ilaçlarda MİK değeri üremede belirgin azalmanın görüldüğü en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Sonuçlar okunmadan önce mikropiplakların mutlaka çalkalanması önerilmektedir, bu basamak belirgin üreme inhibisyonunun görsel olarak belirlenmesini kolaylaştırır. Testin *Candida* türleri ile yapıldığı çoğu durumda, azol MİK değerleri, 24 saatlik inkübasyonun ardından okunabilir. İnkübasyon süresinin az olması kısmi inhibisyonun neden olduğu zorluğu ve kliniğe paralellliği arttırabilir (138).

AmB MİK’leri klinik maya izolatlarının %94’nde 0.25 µg/ml ile 1µg/ml arasında bulunmakta olup, ≥ 2 µg/ml MİK değeri olası klinik direnci göstermektedir. S ve R izolatlar için AmB MİK’leri arasındaki farkın oldukça az olması nedeniyle, sonuçların yorumlanması zorlaşmaktadır. Dirençli suşların güvenilir şekilde saptanması için “antibiotic medium 3” önerilmesine rağmen, bu besiyeri için lotlar arasında değişkenlik de bildirilmiştir (138).

EUCAST’ın geliştirdiği mikrodilüsyon yönteminde CLSI’den farklı olarak daha fazla inokulum ve %2 dekstrozu eklenmiş RPMI besiyeri kullanılmakta olup, 24 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. Bu yöntemin laboratuvar içi tekrarlanabilirliği iyi olup, CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile %95 uyumlu bulunmuştur (138, 140).

2.8.1.3. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemi

Kolorimetrik indikatörlerin veya floresan boyaların kullanıldığı bu yöntem MİK değerlerinin daha kolay okunması ve daha objektif sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Kolorimetrik yöntemlerle elde edilen MİK sonuçlarının, referans mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen değerlerle oldukça uyumlu ($>90\%$) olduğu görülmüştür (138).

Alamar mavisini, oksidasyon-redüksiyon kolorimetrik indikatörü (mantar üremesi indidkatörün rengini maviden pembeye dönüştürür) olarak kullanan ticari bir test (Sensititre YeastOne; TREK Diagnostic Systems) FLU, itrakonazol ve 5-FC için FDA onayı almıştır (138).

2.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler

2.8.2.1. Disk difüzyon yöntemi

CLSI'nın, *Candida* türlerinin FLU, vorikonazol ve posakonazol duyarlılığının araştırılması için geliştirdiği M44-A disk difüzyon yöntemi, %2 dekstroz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agarda 25 µg'lık FLU, 5 µg'lık posakonazol ve 1 µg'lık vorikonazol diskleri kullanılarak uygulanmaktadır. Disk difüzyon yönteminin önemli bir avantajı sonuçların inkübasyondan 20-24 saat sonra elde edilebilmesidir. Bu test ile kantitatif bir sonuç ve kalitatif bir değerlendirme yapılabilir. Yöntemin dilüsyon testlerine göre uygulaması daha kolay ve maliyeti düşüktür (138).

2.8.2.2. E-test yöntemi

E test (AB BioDisk), antifungal bir ilacın, dengeli bir şekilde giderek artan konsantrasyonda yerleştirildiği plastik bir şeritten, agar bazlı besiyerine difüzyonu temeline dayanan bir yöntemdir. Maliyetli olmasına rağmen uygulanması kolay bir yöntemdir. %2 glukoz eklenmiş ve katılaştırılmış RPMI 1640 besiyeri E test uygulanmasında iyi sonuç vermiştir. FLU, itrakonazol ve 5-FC E-testleri FDA onayı almıştır (138).

2.8.3. Diğer Yöntemler

2.8.3.1. "Flow" sitometrik yöntem

Akım sitometri yöntemlerinin antifungal duyarlılık testlerine uyarlanmasıyla elde edilen bu yöntemde, antifungal bir ilaçla karşılaştırıldıktan sonra, mantar hücresinde oluşan hasarı saptamak için, kültüre DNA'ya bağlanan canlı boyalar konulur. Yöntemin dört-altı saat gibi kısa sürede sonuç vermesine rağmen, akım sitometri cihazına gereksinim nedeniyle kullanımı yaygın değildir. Bu yöntemin CLSI mikrodilüsyon yöntemiyle %96 ile %99 oranında uyumlu olduğu bildirilmiştir (138, 141, 142).

2.8.3.2. Ergosterol kantitasyonu

Üreme inhibisyonu yerine ergosterol miktarının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Azol grubu ilaçların etkinliğini ölçmek için kullanılan bu yöntem, özellikle azol MİK sonuçlarının zor okunduğu, kısmi inhibisyon gösteren *Candida* suşları için ümit vericidir (143).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2007-2012 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına gönderilmiş ve klinik örneklerden soyutlanmış biri FLU'ya R, dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren, altısı S toplam on bir adet; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan gönderilen FLU'ya R üç adet ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan gönderilen R bir adet *C. albicans* suşu *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi için çalışmaya alındı. Daha önce aynı *C. albicans* suşları ile yapılan bir çalışmada (127) *ERG11* geni mutasyonları araştırılmış olup, literatürde daha önce FLU'ya direnç gelişiminde rolü olduğu bildirilmiş ve dirençte rolü kesin olmayan mutasyonları saptanmıştır (Tablo 1).

Araştırmamızda Prof. Dr. Dominique Sanglard tarafından gönderilen ve *CDR* ile *MDR1* genlerini sırasıyla fazla eksprese eden DSY289 ve DSY292 no'lu FLU'ya R iki *C. albicans* suşu (144) ile FLU'ya S *C. albicans* ATCC 14053 suşu kontrol olarak kullanıldı. Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) (Fluka 53286) stoklanarak, -80°C'de saklandı.

Tablo 1. Çalışmaya alınan klinik izolatlardaki *ERG11* geni amino asit değişimleri

Suş No.	Amino Asit Değişimi
H1	K143R* E266D S412T R469K V488I*
H2	K143R* E266D S412T R469K V488I*
H3	D116E E266D G464S* G465S*
B	K143R* E266D V488I*
960	D116E L280F L281M S284I
1978	D116E E266D
348	D153E
93-05	-
533	E266D
565	E266D L281Y I282D T285H
644	E266D
1221	-
1453	D116E
2157	V437I

* Literatürde azol direncinden sorumlu olduğu bildirilen mutasyonlar (127).

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Candida suşlarının flukonazol duyarlılığı bağımlı değişken, atım pompa genlerinin ekspresyonları bağımsızdeğişken olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Sıra No.	Malzeme Adı	Marka	Model, Katalog No	Kullanıldığı Analiz
1.	Sabouraud Dekstroz Agar	Oxoid	CM0041	<i>C. albicans</i> suşlarının pasajlanması
2	Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon	Fluka	53286	Suşlarının stoklanması
3	Gliserol	Riedel-de Haën	15524	Suşlarının stoklanması
4	RPMI 1640 Besiyeri	Sigma	R6504	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
5	MOPS	Sigma	M5162	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
6	Sodyum hidroksit	AppliChem	A6829,0500	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
7	Pepton	AppliChem	A2208,0500	Sabouraud dekstroz buyyonun hazırlanması
8	Dekstroz	AppliChem	A3666,0500	Sabouraud dekstroz buyyonun hazırlanması
9	Flukonazol	Sigma	F8929	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
10	İtrakonazol	Sigma	16657	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
11	Ketokonazol	Sigma	2857	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
12	Vorikonazol	AppliChem	A6351,0100	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
13	Klotrimazol	Sigma	C6019	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
14	Mikonazol	Sigma	M3512	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
15	5-flusitozin	Fluka	46850	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
16	Amfoterisin B	AppliChem	A1907,0050	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
17	FLU E test	BioMérieux		Flukonazol E test duyarlılık testi

18	Siklosporin A	Sigma	C3662	Flukonazol E test duyarlılık testi
19	YPD agar	Sigma	Y1500	Flukonazol E test duyarlılık testi
20	Trizma “base”	Sigma	T6066	TBE tamponunun hazırlanması
21	Borik asit	Sigma	B6768	TBE tamponunun hazırlanması
22	Na ₂ EDTA-	Sigma	E5134	TBE tamponunun hazırlanması
23	MgCl ₂	Fermentas	EPO 402	DNaz tamponunun hazırlanması
24	NaCl	AppliChem	A2942,0500	DNaz tamponunun hazırlanması
25	Tris-Cl	AppliChem	A3452,0250	DNaz tamponunun hazırlanması
26	Öncüller	Tıbmolbiol		Gerçek Zamanlı PZT
27	Problar	Tıbmolbiol		Gerçek Zamanlı PZT
28	YeaStar RNA Kit	Zymo Research	R1002	<i>C. albicans</i> suşlarından RNA eldesi
29	“Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit”	Roche	04 897 030 001	cDNA sentezi
30	“LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit”	Roche	12 239 272 001	Gerçek Zamanlı PZT
31	“Pure Link Purification Kit”	Invitrogen	K3100-01	PZT ürünlerinin saflaştırılması
32	DNaz	AppliChem	A3864,0005	RNA Eldesi
33	Agaroz	Sigma	A5093	PZT ürünlerinin jel elektroforezi
34	50 bp DNA Ladder	Fermentas	SM0371	PZT ürünlerinin jel elektroforezi
35	DNA yükleme boyası	Fermentas	R0631	PZT ürünlerinin jel elektroforezi
36	Etidyum bromür	Applichem	A1152,0100	PZT ürünlerinin jel elektroforezi
37	PCR tüpü, 0.2 ml	Greiner		cDNA sentezi

		Bio-one		
38	Ependorf tüp, 1.5 ml	Greiner bio-One	616201	Suşılarının stoklanması RNA eldesi cDNA sentezi
49	Petri kutusu	FıratMed		Suşılarının pasajlanması Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
40	96 kuyucuklu, U tabanlı mikropalak	Greiner bio-one/Cellstar	650180	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
41	Filtre, 0.45µm çaplı			Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
42	Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000µl)	Greiner bio-one		Tüm analizler
43	Pudrasız Eldiven	Beybi	011119031130	RNA eldesi cDNA sentezi PZT reaksiyonu
44	LightCycler Kapiller, 20µl	Roche	04929292001	Gerçek Zamanlı PZT
45	Pipetör seti (10, 100, 1000µl)	Thermo Scientific-FinnPipette	4700410	Tüm analizler
46	Çok kanallı pipetör	Eppendorf	3 114 000.158	Sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testi
47	Spektrofotometre	Thermo MultiScan		Maya kültürlerinin yoğunluk ölçümü RNA Eldesi DNA ölçümü
48	Light Cyler 2.0	Roche		Gerçek Zamanlı PZT analizi
49	Jel Elektroforez Sistemi	Thermo	EC320	PZT ürünlerinin jel elektroforezi

50	Bilgisayarlı jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat		PZT ürünlerinin jel elektroforezi
51	Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017P-A	Agaroz jelin hazırlanması
52	-80°C derin dondurucu	Thermo	705 REL#2 805797-117	Suşlarının saklanması Antifungal ilaçların saklanması
53	-20°C derin dondurucu	Beko		Malzemelerin ve DNA örneklerinin saklanması
54	Etüv	Memmert INE 500	E509.04 76	Suşların üretilmesi
55	Tartı	Adam Equipment Co. Ltd.	AE 326611770	Besiyeri ve kimyasalların hazırlanması
56	Otoklav	HICLAVE Hirayama	HV-85 000685748	Tüm analizler
57	Isı bloğu	Major Science	MC-01N 6214001	cDNA sentezi
58	Santrifüj	Hettich Zentrifugen	1204-001003- 01-00	RNA eldesi

3.6.2. Antifungal Duyarlılık Çalışması

Suşlarımızın FLU, 5-FC, amB, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol, vorikonazol ve klotrimazol duyarlılıkları CLSI tarafından önerilen M27-A3 standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı (139).

3.6.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemi

3.6.2.1.1. Besiyeri Hazırlanması

CLSI önerisi olan L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız, renk indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyeri (Sigma R6504) son konsantrasyonu 0.165 mol/L olacak şekilde MOPS (Sigma M5162) 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.

3.6.2.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Konsantrasyonları

Duyarlılık çalışması için FLU (Sigma F8929), 5-FC (Fluka 46850), itraconazol (Sigma 16657), ketokonazol (Sigma 2857), mikonazol (Sigma M3512), klotrimazol (Sigma C6019), amB (AppliChem A1907,0050) ve vorikonazol (AppliChem A6351,0100) kullanıldı. Antifungallerin DMSO ile sulandırılarak hazırlanan stok solüsyonları RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek istenen son konsantrasyonları elde edildi. Antifungal ilaçlar alikotlanarak -80°C’de saklandı. Kuyucuklardaki son antifungal konsantrasyonları CLSI’nın önerisi doğrultusunda FLU, 5-FC ve mikonazol için 64-0.125 µg/ml, amB, ketokonazol, itraconazol, vorikonazol ve klotrimazol için 16-0.03 µg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca FLU MİK değerleri >64 µg/ml olarak saptanan suşlar aynı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak 1024–2 µg/ml FLU konsantrasyonu aralığında da çalışıldı.

3.6.2.1.3. Maya İnokulumlarının Hazırlanması

SDA’ya iki kez pasaj yapılarak saf kültürleri elde edilen ~1mm çaplı kolonilerden 5 koloni, 5ml %0.9’luk serum fizyolojik içinde, bulanıklık derecesi Mc Farland 0.5 olacak şekilde süspanse edildi ve süspansiyon tüpleri vorteks ile karıştırıldı. Bu süspansiyonda $1-5 \times 10^6$ KOÜ/ml maya bulunmakta olup, RPMI 1640 ile 1000 kat dilüe edilerek $1-5 \times 10^3$ KOÜ/ml içeren maya süspansiyonu elde edildi. Testin uygulanması sırasında maya süspansiyonu besiyeri ile 1:1 oranında dilüe olduğundan istenen son konsantrasyon olan $0.5-2.5 \times 10^3$ KOÜ/ml’ ye ulaşılmış oldu.

3.6.2.1.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

35°C’de 48 saat inkübe edilen plaklar bu süre sonunda farklı iki kişinin gözüyle ve azoller için ek olarak spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Gözle okumada CLSI önerisi doğrultusunda amB için üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi. 5-FC, FLU ve diğer azoller için ise 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 antifungal konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. CLSI önerisi doğrultusunda FLU için MİK değeri ≥ 8 µg/ml R, 4 µg/ml DBD ve ≤ 2 µg/ml S; amB için >1 µg/ml R, ≤ 1 µg/ml S; 5-FC için ≥ 32 µg/ml R, 8-16 µg/ml orta duyarlı,

≤ 4 µg/ml S; itrakonazol ve ketokonazol için ≥ 1 µg/ml R, 0.25-0.5 µg/ml DBD, ≤ 0.125 µg/ml S; vorikonazol için ≥ 4 µg/ml R, 2 µg/ml DBD, ≤ 1 µg/ml S ve klotrimazol için > 1 µg/ml R olarak kabul edildi (139, 140, 145, 146, 147).

3.6.2.2. E-test Yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi ile FLU R olarak belirlenen suşlar için olası kısmi inhibisyon etkisini önlemek amacıyla 0.5 µg/ml siklosporin A (Sigma C3662) içeren ve içermeyen “yeast extract peptone dextrose” (YPD) agar (Sigma Y1500) kullanılarak E-test yöntemi ile FLU duyarlılıkları incelendi. Bulanıklığı Mc Farland 0.5 olacak şekilde hazırlanmış maya süspansiyonu siklosporin A içeren ve içermeyen YPD agar yüzeylerine inoküle edildi. FLU E test şeritleri (bioMérieux S.A.) agar yüzeyine yerleştirildi ve 35°C’de 24 saat inkübe edildi. E-test şeridi ile inhibisyon zonu sınırının kesişimindeki FLU konsantrasyonu (üreme yoğunluğunda önemli bir azalmanın olduğu ya da tam bir inhibisyonun görüldüğü nokta) MİK değeri olarak kabul edildi (148-150).

3.6.3. Gerçek Zamanlı (“Real-time”) (GZ) Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri GZ PZT yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla önce RNA elde edildi daha sonra cDNA sentezlendi ve PZT uygulandı.

3.6.3.1. RNA Eldesi

Stok besiyerlerinden SDA’ya pasajlanan suşlar 37°C’de 48 saat inkübe edildi. Bir öze dolusu maya kolonisi, 10 ml Sabouraud dekstroz buyyon içerisinde süspanse edildi. Bu besiyerinde 37°C’de bir gece inkübe edilen sıvı kültürler taze Sabouraud dekstroz buyyon ile 1/00 oranında seyreltildi ve orta-logaritmik faza erişene dek (optik yoğunlukları 600nm’de 0.8-1 arasında oluncaya kadar) 37°C’de çalkalanarak bekletildi (151).

Sıvı maya kültürlerinden YeaStar RNA Kit (Zymo Research R1002) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirildi. 1.5 ml sıvı maya kültürü (1.5×10^7 hücre) 500 xg’de 2 dakika santrifüjlendi. Oluşan hücre çökeltisinin üzerine 80µl YR “digestion” tampon ile 5µl zimolaz solusyonu eklendi ve 37°C’de 60 dakika bekletildi. Daha sonra 160µl YR lizis tamponu eklenerek vortekslendi ve 7000rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir toplama tüpü içindeki spin kolona aktarıldı ve 14000 rpm’de 1 dakika

santrifüjlendi. Sonrasında kolona 200µl RNA yıkama tamponu eklendi ve 14000 rpm’de 1 dakika daha santrifüjlendi. Bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Spin kolon 1.5 ml’lik RNaz içermeyen ependorf tüpüne aktarıldı ve kolon membranına doğrudan 60µl DNaz-RNaz içermeyen su eklendi. 14000 rpm’de 30 saniye santrifüj sonunda RNA elde edildi.

Elde edilen RNA’lar cDNA sentezine alınmadan önce DNaz (AppliChem, A3864,0005) ile işlemlendi. DNaz; 150mM NaCl ve DNaz saklama tamponu (%50 gliserol; 20mM Tris-Cl, pH 7.5; 1mM MgCl₂) ile son konsantrasyonda 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Elde ettiğimiz 60µl RNA, 0.8µl DNaz ile 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

10µl RNA örneği 90µl steril distile su içerisinde seyreltildi (1/10). 100µl’lik spektrofotometre küvetlerinde 260 nm ve 280 nm’lerde yapılan ölçümlerle RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri belirlendi. “OD260 x 40 x Seyreltme katsayısı” formülü ile ml’deki RNA miktarı µg cinsinden hesaplandı.

3.6.3.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA’lar “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche, 04 897 030 001) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda cDNA sentezine alındı. 1µg RNA, 2µl “random hexamer primer” ve su (“PCR grade”) ile toplam hacim 13µl olacak şekilde karıştırdı ve 65°C’de 10 dakika inkübe edilerek sekonder RNA yapılarının denatürasyonu sağlandı. Ardından 4µl 5x reaksiyon tamponu, 2µl dNTP karışımı, 0.5µl RNaz inhibitörü ve 0.5µl revers transkriptaz karışımı, kalıp RNA, primer ve su içeren tüplere eklendi. Tüplerin 25°C’de 10 dakika, 55°C’de 60 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edilmesiyle 20µl’lik son hacimde cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’lar -20°C’de saklandı.

3.6.3.3. GZ PZT Uygulaması

3.6.3.3.1. GZ PZT için Gerekli Malzemelerin Hazırlanması

Öncüller ve “probe”lar (Tıbmolbiol), üretici firmanın önerileri doğrultusunda steril deiyonize su ile sulandırıldı, elde edilen 20µM’lık ana dilüsyondan 2µM’lık alikotlar hazırlanarak -20°C’de saklandı.

3.6.3.3.2. GZ PZT Çalışmasında Kullanılan Öncül ve “Probe”lar

ACT1 için;

“Forward” öncül	5’ CCAGCTTTCTACGTTTCC 3’
“Reverse” öncül	5’ CTGTAACCACGTTTCAGAC 3’
“Donor probe”	5’ CGGTATTGTTTTGGATTCTGGTG—FL 3’
“Acceptor probe”	5’ LC 640—TGGTGTTACTCACGTTGTTCC 3’

CDR1 için;

“Forward” öncül	5’ AAGAGAACCATTACCAGG 3’
“Reverse” öncül	5’ AGGAATCGACGGATCAC 3’
“Donor probe”	5’ CAAGACCAGCATCTCCATATACTGTAT—FL 3’
“Acceptor probe”	5’ LC 640—ATTCTTTATGCAAGTGAGGTATGGTG 3’

CDR2 için;

“Forward” öncül	5’ ATGCTGATGCCCTAGT 3’
“Reverse” öncül	5’ GCTTCCTTAGGACATGG 3’
“Donor probe”	5’ ATTGTTGTTATTCTTAGATGAACCAACTTCAG —FL 3’
“Acceptor probe”	5’ LC 640—TTAGATTCTCAAACCTGCCTGGTCG 3’

MDR1 için;

“Forward” öncül	5’ GGAGTTTAGGTGCTGT 3’
“Reverse” öncül	5’ CGGTGATGGCTCTCAA 3’
“Donor probe”	5’GCCAGTTGGAGATGGACT —FL 3’
“Acceptor probe”	5’ LC 640—TTGGTTCATGTGTATCATTTCTG 3’

Donör boya “probe”ları 3' ucundan “florescein” ile, alıcı boya “probe”ları ise 5' ucundan “LightCycler Red 640” ile işaretli olup, 3' ucu da fosforillenmiş olduğundan uzamamaktadır.

3.6.3.3.3. GZ PZT Karışımı ve Isı Döngüsü

PZT karışımı ve ısı döngü programı, Frade ve arkadaşları (Frade et al. 2004) ile “LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit”in (Roche 12 239 272 001) önerileri doğrultusunda optimize edildi. GZ PZT aşağıda belirtildiği koşullarda “Light Cycler” 2.0 (Roche) cihazında uygulandı.

	Reaksiyon hacmi	Son konsantrasyon
Nükleaz içermeyen steril distile su	7.6 µl	-
MgCl ₂ (25 Mm)	2.4 µl	3 mM (+1mM)
“Forward” öncül (2 µM)	1 µl	0.1 mM
“Reverse” öncül (2 µM)	1 µl	0.1 mM
“Donor probe” (2 µM)	2 µl	0.2 mM
“Acceptor probe” (2 µM)	2 µl	0.2 mM
10x enzim, reaksiyon karışımı	2 µl	1x
(10x enzim, reaksiyon karışımı; Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu dNTP karışımı ve 10mM MgCl ₂ içermektedir)		
cDNA (1/2 seyreltilmiş)	2 µl	-
Toplam hacim	20 µl	-

PZT Isı Döngüsü:

95°C’de 10 dakika ön denatürasyon		
95°C’de 10 saniye denatürasyon		
58°C’de (<i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> ve <i>ACT1</i> için)	/	
50°C’de (<i>MDR1</i> ve <i>ACT1</i> için)	15 saniye birleşme	
72°C’de 10 saniye uzama		

} 45 döngü

3.6.3.3.4. Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi

PZT ürünlerinin özgülüğünü doğrulamak için “Light Cycler” cihazında PZT sonrası erime eğrisi analizi (95°C’de 20 saniye, 40°C’de 20 saniye, 85°C’de 0 saniye) yapıldı. Ayrıca analiz sonunda “Light Cycler” kapiller tüplerinin kapakları açılarak, ependorf tüpler içerisine ters çevirilip 3000rpm’de santrifüjlenmesiyle GZ PZT ürünleri elde edildi. PZT ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulandı. Bunun için 5 µl PZT ürünü 1x TBE tamponu (Trizma “base”-Sigma T6066, borik asit- Sigma B6768, Na₂EDTA-Sigma E5134) içerisinde etidyum bromür (Applichem A1152,0100) içeren %1.2’lik agaroz (Sigma A5093) jelde yürütüldü (Thermo EC320 Minicell Primo Electricophoretic gel system) ve UV aydınlatıcıda incelenerek, bilgisayarlı görüntüleme cihazında (Vilbert Lourmat Infinity-1000/26MX) görüntüldü.

3.6.3.3.5. Standart Eğrilerin Oluşturulması

Gen ekspresyonunun kantitasyonu için gen spesifik standart eğriler oluşturuldu. Hedef genlere özgün standart eğrilerin hazırlanması için FLU'ya S ATCC 14053 *C. albicans* suşunun hedefe yönelik üçer reaksiyondan elde edilen GZ PZT ürünleri kullanıldı. Elde edilen ürünler “Pure Link Purification Kit” (Invitrogen, K3100-01) kullanılarak saflaştırıldı ve spektrofotometrik olarak OD'leri (A_{260}) belirlendi. “OD260 x 50 x Seyreltme katsayısı” formülü ile ml'deki DNA miktarı μg cinsinden hesaplandı. PZT ürünlerinin sekansları <http://www.encorbio.com/protocols/Nuc-MW.htm> sayfasına FASTA formatında girilerek, ürünün dalton (Da) cinsinden moleküler ağırlığı hesaplandı. “ $2 \times 10^6 \times \text{DNA konsantrasyonu} (\mu\text{g}) / \text{moleküler ağırlık (Da)}$ ” formülü (LabFAQS-Find a quick solutions, Roche Applied Science) kullanılarak ürünlerdeki DNA miktarı kopya/ μl cinsinden belirlendi. Konsantrasyonları belirlenen DNA ürünlerinin 10'ar katlı seri dilüsyonları hazırlanarak hedef spesifik standart eğrilerin oluşturulmasında kalıp olarak kullanıldı. 10^{-2} - 10^{-7} 'lik dilüsyonların hedefe yönelik öncüller ile üç defa GZ PZT'leri yapıldı ve en az dört standart kullanılarak hedef genlere özgün eğriler oluşturuldu. Her hedef için oluşturulan bu eğrilerden biri seçilerek yapılacak çalışmalarda kantitasyon amacıyla kullanılmak üzere kaydedildi. Gen spesifik standart eğriler her GZ PZT döngüsünde kullanıldı.

3.6.3.3.6. Gen Ekspresyonunun Kantitasyonu

Suşların *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerini hedefleyen GZ PZT uygulamalarında aynı suş için hem hedef gen hem de korunan (“housekeeping”) gen *ACT1*'e yönelik üçer örnek ve birer de standart dilüsyon reaksiyona alındı. Reaksiyon sonrası “LightCycler” yazılımı ve önceden kaydedilmiş olan gene spesifik standart eğrilerin kullanılmasıyla gen ekspresyonlarının kantitasyonu gerçekleştirildi.

Görece gen ekspresyonlarını belirlemek için, izolatların üçer reaksiyondan elde edilen ortalama hedef gen (*CDR1*, *CDR2*, and *MDR1*) ekspresyonu ortalama *ACT1* gen ekspresyonuna oranlanarak normalize edildi.

Normalizasyon sonucu, izolatların görece gen ekspresyonları teorik olarak bu hedef genleri az eksprese ettiği öngörülen ilaç S *C. albicans* ATCC 14053 suşu ile karşılaştırıldı.

3.7. Araştırma Planı

2007-2009	Suşların toplanması Antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması
2008	GZ PZT yönteminin standardizasyonu
2008 - 2010	GZ PZT uygulaması
Ocak - Haziran 2011	Sonuçların değerlendirilmesi
Temmuz- Aralık 2011	Yayın haline getirme
2012 - Nisan 2013	Tez yazımı

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Gen ekspresyon verileri SPSS version 15.0 bilgisayar yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. “Mann-Whitney U” testi ile gruplar arasında gen ekspresyonları açısından anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi. $p < 0.05$ ise fark anlamlı kabul edildi (152).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 14 Eylül 2006 tarih ve 10/18/2006 nolu toplantısında, 178 protokol numaralı “Flukonazol dirençli *Candida albicans* suşlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ve de 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* gen ekspresyon düzeylerinin polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması” isimli araştırma projesinin uygulanması onayı, 14.09.2006 tarih ve 201 sayılı yazı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı’na bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının mikrodilüsyon ve E test yöntemleri ile saptanan FLU duyarlılık sonuçları Tablo 2’de görülmektedir. Buna göre araştırmamıza aldığımız suşların beşi FLU’ya R, dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S, altısı S olarak belirlendi.

Tablo 2. FLU’ya R/kısmi inhibisyon gösteren, S *C. albicans* suşlarının FLU MİK değerleri

Suş No.	Minimal İnhibitör Konsantrasyon (µg/ml)			Duyarlılık Kategorisi
	Mikrodilüsyon yöntemi	YEPD agar/E test yöntemi	0.5µg/ml siklosporin A içeren YEPD agar/E test yöntemi	
H1	64	>256	>256	R
H2	16	48	64	R
H3	32	96	128	R
B	32	64	64	R
960	8	-	-	R
813	>1024	2	1.5	Kısmi inhibisyon-S
1978	1024	0.500	0.500	Kısmi inhibisyon-S
348	1024	0.500	0.500	Kısmi inhibisyon-S
93-05	1024	1.5	0.500	Kısmi inhibisyon-S
533	0.500	-	-	S
565	0.500	-	-	S
644	0.250	-	-	S
1221	0.125	-	-	S
1453	0.250	-	-	S
2157	0.250	-	-	S

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının diğer antifungaller için belirlenen duyarlılık sonuçları Tablo 3’de izlenmektedir.

Tablo 3. FLU'ya R/kısmi inhibisyon gösteren, *S. C. albicans* suşlarının diğer antifungal ilaçlara duyarlılıkları

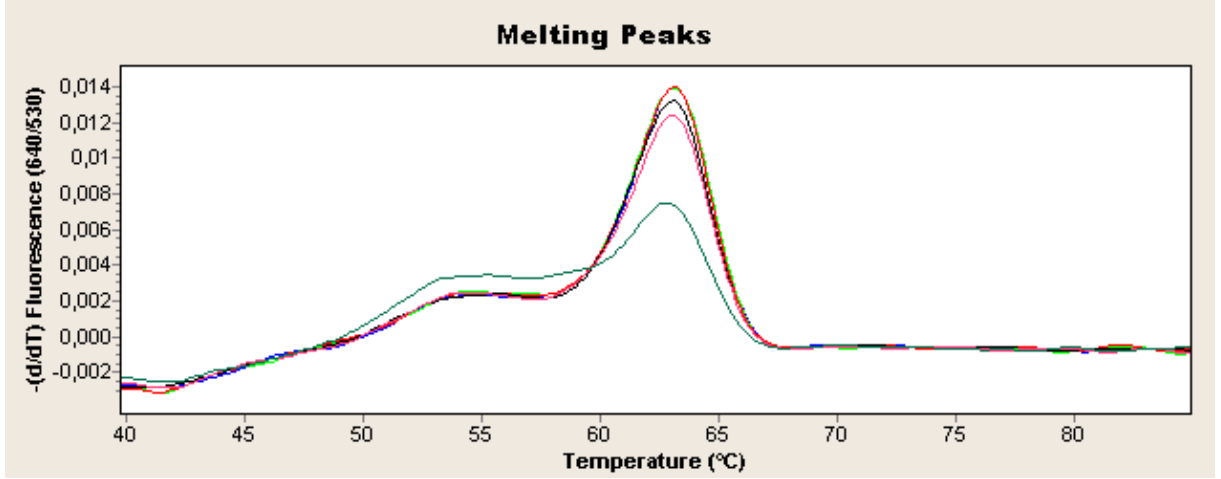
Suş No.	Minimal İnhibitör Konsantrasyon (µg/ml)						
	5-FC	AmB	İtrakonazol	Ketokonazol	Mikonazol	Klotrimazol	Vorikonazol
H1	32	1	4	4	>64	1	0.125
H2	32	1	2	2	64	0.125	0.03
H3	16	0.500	2	2	64	0.125	0.125
B	32	1	1	2	>64	0.250	0.125
960	16	0.500	0.250	0.030	8	0.250	0.06
813	0.125	0.5	>16	16	64	4	>16
1978	32	1	>8	>16	>64	0.500	>16
348	32	0.500	2	2	>64	0.250	>16
93-05	64	1	0.500	0.500	0.125	0.250	>16
533	16	0.500	0.250	0.030	2	0.125	0.03
565	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03
644	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03
1221	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03
1453	16	0.500	0.500	0.030	8	0.125	0.03
2157	32	1	0.500	0.060	16	0.250	0.03

CLSI tarafından 5-FC için MİK değeri $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ R, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı kabul edildiğinden dokuz FLU'ya R/kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S suşların altısı 5-FC'ye R, FLU'ya S suşların ise biri hariç tümü 5-FC'ye orta duyarlı olarak bulundu. AmB ve klotrimazol için $>1 \mu\text{g/ml}$ MİK değeri R kabul edildiğinden tüm suşların AmB'ye S ve bir izolat hariç tümünün klotrimazole de S olduğu görüldü. FLU'ya R/kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S suşların yedisinin itrakonazol ve ketokonazole R, mikonazol için ise $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ MİK değerlerine sahip oldukları belirlendi. FLU'ya S tüm suşlar ketokonazole S, itrakonazole doza bağımlı duyarlı bulundu. Vorikonazol için MİK değeri $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ R kabul edildiğinden, FLU'ya R ve S suşların tümünün vorikonazole S olduğu belirlendi. FLU'ya kısmi inhibisyon gösteren-S dört suştan ikisinin vorikonazol, itrakonazol, ketokonazol ve mikonazol; birinin vorikonazol, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol ve klotrimazol; birinin ise vorikonazol için yüksek MİK değerlerine sahip olduğu dikkati çekti.

4.2. GZ PZT Özgüllüğü: Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi

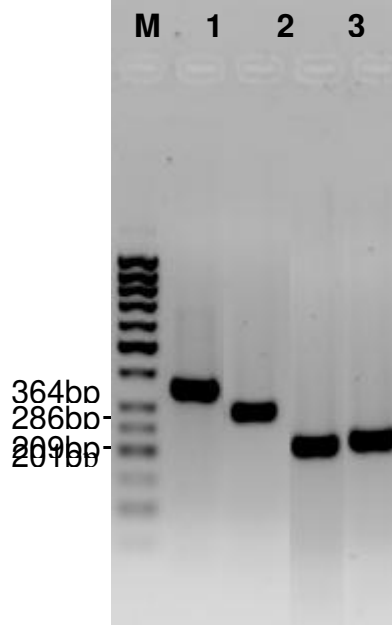
Sonuçları

Uygulanan GZ PZT'nin özgüllüğünü değerlendirmek için hedef genlere spesifik erime eğrileri incelendi. Her hedef için beklenen sıcaklıkta pik varlığı gözlemlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Erime eğrisi analizi ile *ACT1* için elde edilen pikler

Ayrıca PZT ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenen büyüklüklerde tek bir bant varlığının saptanması PZT'nin özgüllüğünü doğruladı. *ACT1* için 209 bazçiftlik, *CDR1* için 286 bazçiftlik, *CDR2* için 364 bazçiftlik ve *MDR1* için 201 bazçiftlik bantlar izlendi (Şekil 2).



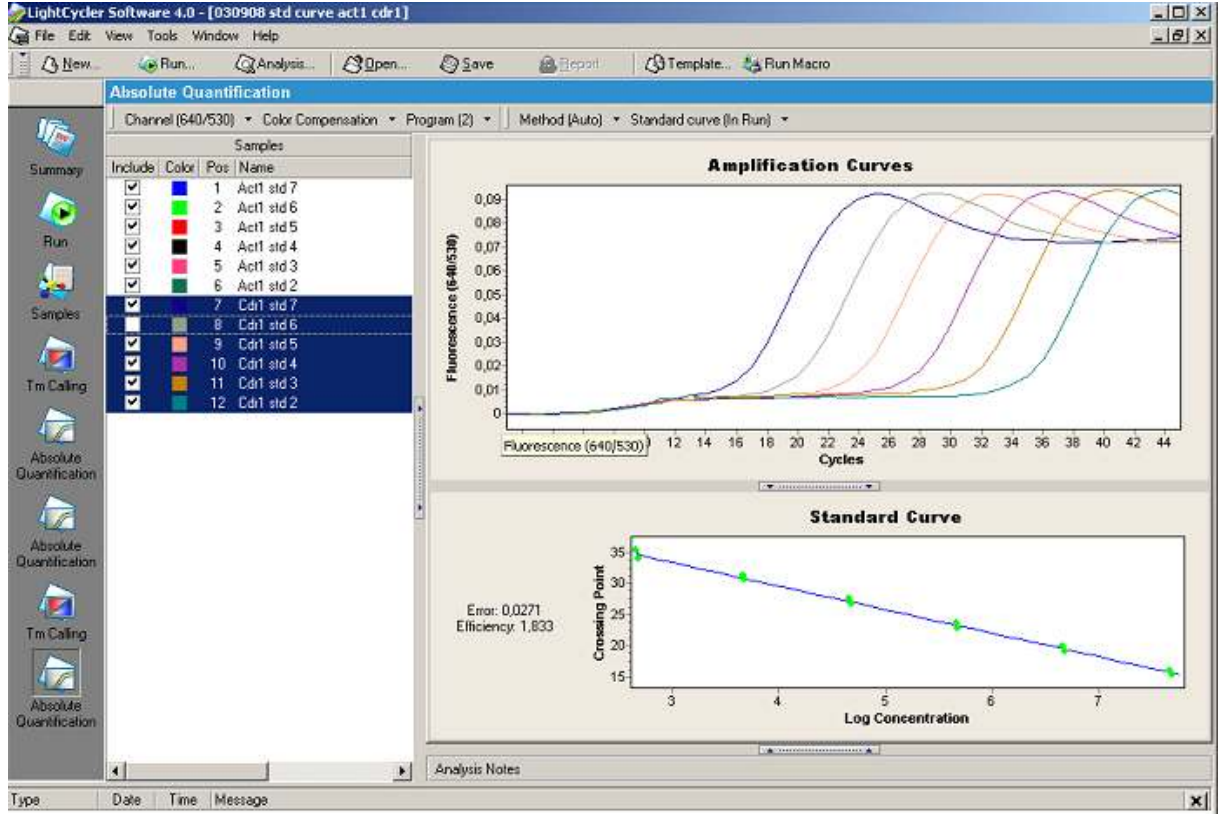
Şekil 2. GZ PZT ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. M, moleküler marker (MBI Fermentas SM 0371); 1, *CDR2* ürünü; 2, *CDR1* ürünü; 3, *MDR1* ürünü; 4, *ACT1* ürünü.

4.3. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Kullanımı

“LightCycler” bilgisayar yazılımı ile standart kalıbın her seri dilüsyonu için döngü numarasına karşılık gelen floresan siddetinin işaretlenmesiyle standart eğriler oluşturuldu. Floresan sinyalin arka plandan çıkıp, log linear faza girdiği döngü numarası “crossing point (Cp)” olarak tanımlandı. Standart eğriyi oluşturmak için her Cp değeri standarttan tanımlanmış olan konsantrasyonuna karşılık gelecek şekilde işaretlendi. Sonuç olarak test örneği için ölçülen Cp değeri ile standart eğriye göre örnekteki hedef DNA konsantrasyonu hesaplandı. Hedef genlerin amplifikasyon etkinlikleri bilgisayar yazılımı ile eğrinin eğimine göre belirlendi. Tablo 4’de standart eğrilerin oluşturulmasında kullanılan seri dilüsyonların DNA konsantrasyonları, GZ PZT sonucu belirlenen ortalama Cp değerleri ve hedef genlerin amplifikasyon etkinlikleri sunulmaktadır. Şekil 3’de ise *CDR1* için oluşturulan standart eğri ve seri dilüsyonlara ait amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

Tablo 4 Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Etkinlikleri

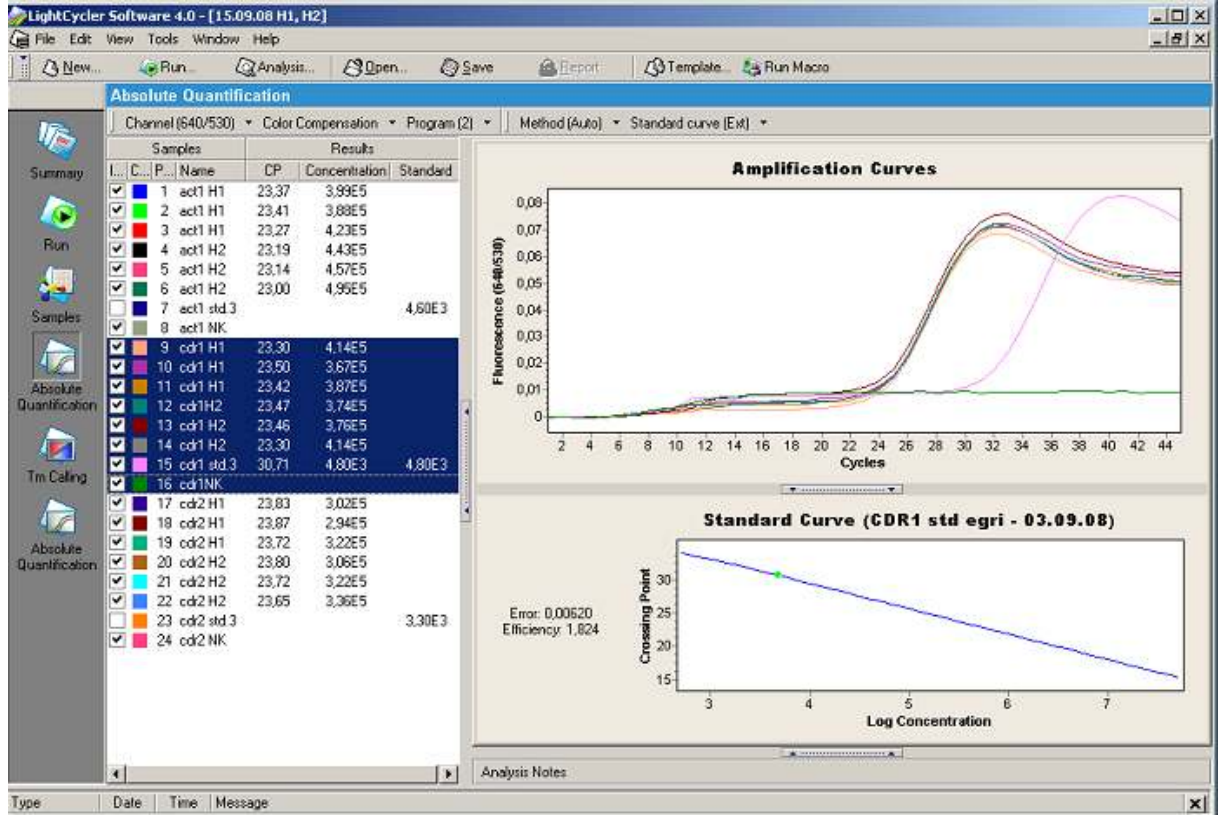
Standart	<i>ACT1</i> Amplifikasyon etkinliği:1.826		<i>CDR1</i> Amplifikasyon etkinliği:1.824		<i>CDR2</i> Amplifikasyon etkinliği:1.876		<i>MDR1</i> Amplifikasyon etkinliği:1.969	
	Konsantrasyon (kopya/µl)	Ortalama Cp	Konsantrasyon (kopya/µl)	Ortalama Cp	Konsantrasyon (kopya/µl)	Ortalama Cp	Konsantrasyon (kopya/µl)	Ortalama Cp
7	4,6x10 ⁷	16,79	4,8x10 ⁷	15,58	3,3x10 ⁷	17,98	4,2x10 ⁷	18,98
6	4,6x10 ⁶	20,53	4,8x10 ⁶	19,83	3,3x10 ⁶	21,98	4,2x10 ⁶	22,19
5	4,6x10 ⁵	24,21	4,8x10 ⁵	22,66	3,3x10 ⁵	25,71	4,2x10 ⁵	25,30
4	4,6x10 ⁴	28,72	4,8x10 ⁴	26,78	3,3x10 ⁴	29,57	4,2x10 ⁴	28,47
3	4,6x10 ³	32,41	4,8x10 ³	30,68	3,3x10 ³	33,51	4,2x10 ³	33,50
2	4,6x10 ²	>37,4	4,8x10 ²	34,07	3,3x10 ²	>39,24	4,2x10 ²	35,61



Şekil 3. Seri dilüsyonların amplifikasyonu ile oluşturulan *CDR1* standart eğri

4.4.Gen Ekspresyon Sonuçları

Çalışılan suşların gen spesifik standart eğriye göre hedef gen ekspresyonlarını gösteren örnek bir GZ PZT uygulaması H1 ve H2 suşları için Şekil 4’de izlenmektedir.



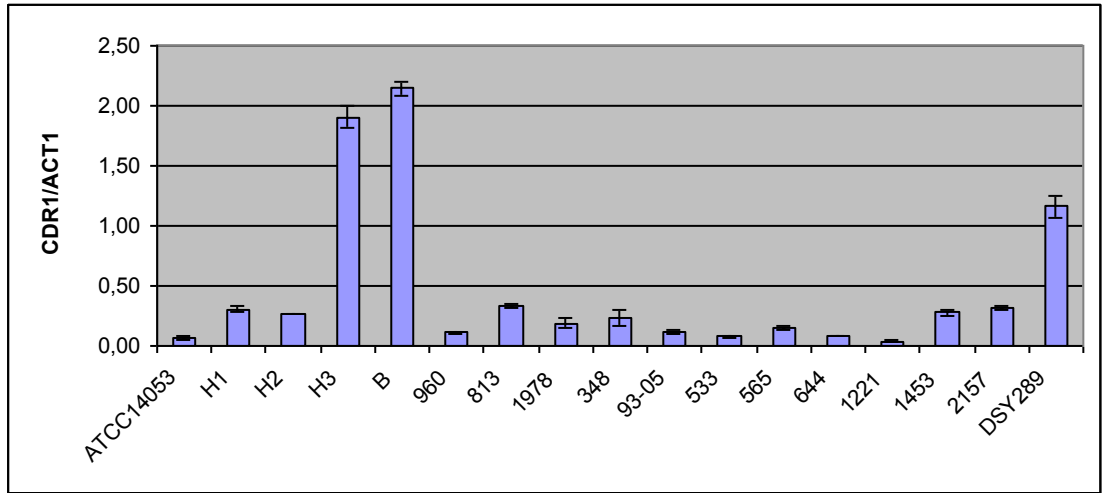
Şekil 4. H1 ve H2 suşlarının *CDR1* amplifikasyonuna ilişkin GZ PZT uygulaması

4.4.1. *CDR* Ekspresyon Düzeyleri

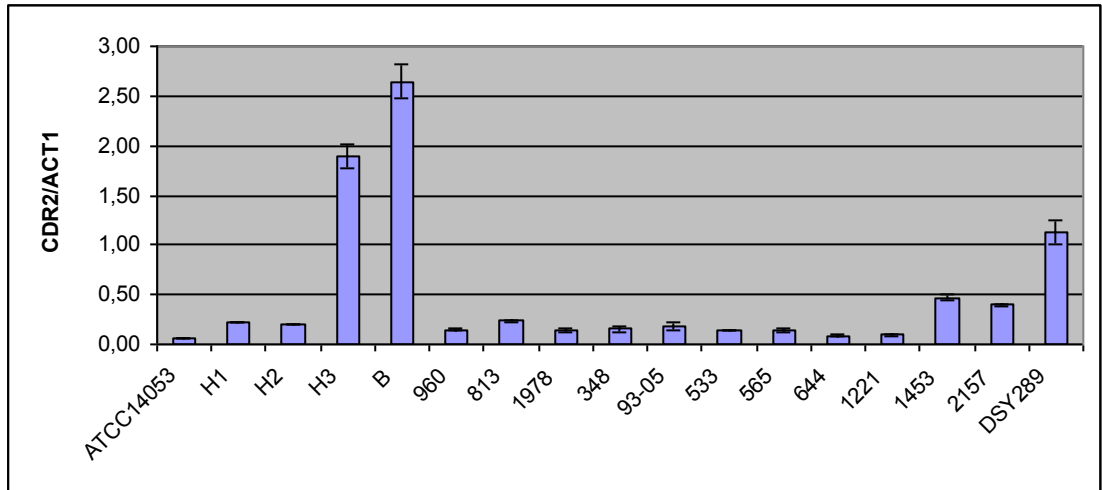
C. albicans suşlarının *CDR1* ve *CDR2* için aynı çalışmaya ait üç GZ PZT reaksiyonundan elde edilen ortalama sayısal değerler ve *ACT1* ile normalizasyon oranları Tablo 5’de, grafikleri ise Şekil 5 ve Şekil 6’da görülmektedir.

Tablo 5. *CDR1* ve *CDR2* mRNA düzeylerinin kantitasyonu ve *ACT1* ile normalizasyon değerleri

Suş No.	Flukonazol Duyarlılık kategorisi	Ortalama <i>CDR1</i> mRNA Konsantrasyonu	Ortalama <i>CDR2</i> mRNA Konsantrasyonu	<i>CDR1</i> / <i>ACT1</i>	<i>CDR2</i> / <i>ACT1</i>
H1	R	3,89 10 ⁵	2,86 10 ⁵	0,31	0,23
H2	R	3,88 10 ⁵	3,01 10 ⁵	0,27	0,21
H3	R	1,01 10 ⁶	5,28 10 ⁵	1,91	1,90
B	R	5,80 10 ⁵	7,15 10 ⁵	2,14	2,64
960	R	1,19 10 ⁵	1,65 10 ⁵	0,11	0,14
813	Kısmi inhibisyon-S	1,44 10 ⁴	1,02 10 ⁴	0,34	0,24
1978	Kısmi inhibisyon-S	8,36 10 ⁴	1,15 10 ⁵	0,18	0,14
348	Kısmi inhibisyon-S	1,04 10 ⁵	2,27 10 ⁴	0,23	0,15
93-05	Kısmi inhibisyon-S	6,70 10 ⁴	5,44 10 ⁴	0,12	0,18
533	S	1,10 10 ⁵	1,51 10 ⁵	0,08	0,14
565	S	1,54 10 ⁵	1,53 10 ⁵	0,15	0,15
644	S	5,68 10 ⁴	5,99 10 ⁴	0,08	0,09
1221	S	6,73 10 ⁴	8,00 10 ⁴	0,04	0,09
1453	S	1,79 10 ⁵	3,05 10 ⁵	0,28	0,47
2157	S	5,16 10 ⁵	6,35 10 ⁵	0,32	0,40
DSY 289	R kontrol	1,28 10 ⁶	1,24 10 ⁶	1,16	1,12
ATCC 14053	S kontrol	6,73 10 ⁴	8,47 10 ⁴	0,07	0,06



Şekil 5. *C. albicans* suşlarının *CDR1* normalizasyon grafiği



Şekil 6. *C. albicans* suşlarının *CDR2* normalizasyon grafiği

İzolatların normalize edilmiş *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla değerlendirilmesine ilişkin veriler Tablo 6'da gösterilmekte olup, karşılaştırmalı olarak da Şekil 7'de sunulmaktadır.

CDR gen ekspresyon verileri incelendiğinde, FLU'ya S *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, FLU'ya R *C. albicans* suşlarında ortalama 14.1 kat *CDR1*, 18.3 kat *CDR2*; kısmi inhibisyon etkisi gösterenlerde ortalama 3.3 kat *CDR1*, 3.2 kat *CDR2*; ve S'larda ortalama 2.4 kat *CDR1*, 4.0 kat *CDR2* ekspresyonu saptandı (Tablo 6).

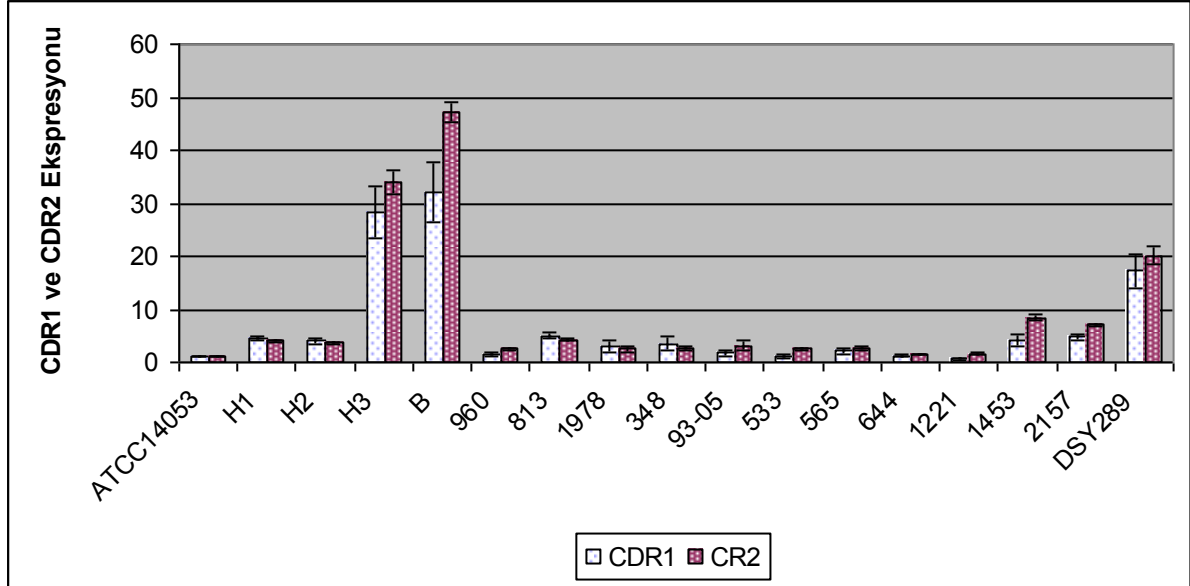
Tablo 6. Çalışmaya alınan izolatların *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonları

Suş No.	Flukonazol duyarlılık kategorisi	ATCC suşuna göre <i>CDR1</i> ekspresyon oranı $\pm$ SS	<i>CDR1</i> ekspresyon oranlarının grup ortalaması (ortanca değeri)	ATCC suşuna göre <i>CDR2</i> ekspresyon oranı $\pm$ SS	<i>CDR2</i> ekspresyon oranlarının grup ortalaması (ortanca değeri)
H1	R	4.6 $\pm$ 0.5	14.1 (4.6)	4.0 $\pm$ 0.1	18.3 (4.0)
H2	R	4.0 $\pm$ 0.5		3.7 $\pm$ 0.2	
H3	R	28.4 $\pm$ 4.9		33.9 $\pm$ 2.3	
B	R	32.0 $\pm$ 5.7		47.2 $\pm$ 2.0	
960	R	1.6 $\pm$ 0.4		2.6 $\pm$ 0.2	
813	Kısmi inhibisyon-S	5.0 $\pm$ 0.6	3.3 (3.3)	4.2 $\pm$ 0.1	3.2 (3.0)
1978	Kısmi inhibisyon-S	2.9 $\pm$ 1.1		2.5 $\pm$ 0.5	
348	Kısmi inhibisyon-S	3.6 $\pm$ 1.5		2.7 $\pm$ 0.5	
93-05	Kısmi inhibisyon-S	1.8 $\pm$ 0.5		3.2 $\pm$ 0.8	
533	S	1.2 $\pm$ 0.3	2.4 (1.8)	2.6 $\pm$ 0.2	4.0 (2.6)
565	S	2.2 $\pm$ 0.6		2.6 $\pm$ 0.3	
644	S	1.3 $\pm$ 0.2		1.6 $\pm$ 0	
1221	S	0.6 $\pm$ 0.1		1.6 $\pm$ 0.1	
1453	S	4.2 $\pm$ 1.1		8.4 $\pm$ 0.6	
2157	S	4.8 $\pm$ 0.8		7.1 $\pm$ 0.3	
DSY289	R kontrol	17.3 $\pm$ 3.2		20.1 $\pm$ 1.6	
ATCC 14053	S kontrol	1.0		1.0	
SS: Standart sapma					

FLU'ya R suşlar arasında H3 ve B'de daha yüksek (ATCC kontrol suşuna göre 28.4 ve 32.0 kat *CDR1*; 33.9 ve 47.2 kat *CDR2*) olmakla birlikte, tümünde (Kontrol suşuna göre 1.6-32.0 ve 2.6-47.2 kat) *CDR1* ve *CDR2* fazla ekspresyonu belirlendi. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S *C. albicans* suşlarında da ılımlı düzeylerde (ATCC kontrol suşuna göre 1.8-5.0 ve 2.5-4.2 kat) *CDR1/2* fazla ekspresyonu izlendi. FLU'ya S iki suшта (1453 ve 2157) kısmen

yüksek (ATCC suşuna göre 4.2, 8.4 ve 4.8, 7.1 kat), diğerlerinde ise ılımlı/düşük seviyelerde (ATCC kontrol suşuna göre 0.6-2.2 ve 1.6-2.6 kat) *CDR1/2* ekspresyonu saptandı (Tablo 6).

CDR1 ve *CDR2* ekspresyon düzeylerinin aynı suş için tüm izolatlarda paralel olduğu gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 7. *C. albicans* suşlarının ATCC kontrol suşuna kıyasla *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonları

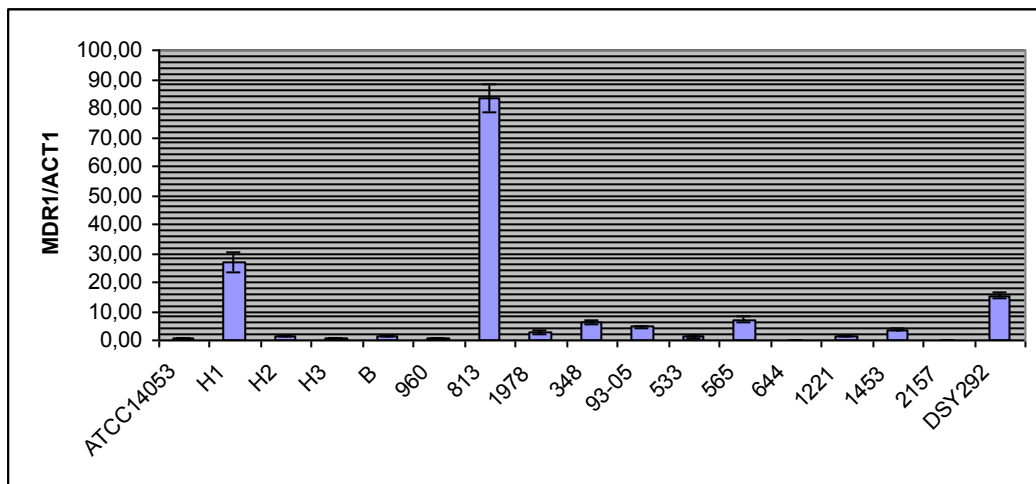
FLU'ya R, kısmi inhibisyon etkisi gösteren, *S. C. albicans* suşları arasında *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı ($p=0.10$, $p=0.32$, $p=0.28$, $p=0.14$; $p=0.22$, $p=0.67$; $p>0.05$).

4.4.2. *MDR1* Ekspresyon Düzeyleri

C. albicans suşlarının *MDR1* için aynı çalışmaya ait üç GZ PZT reaksiyonundan elde edilen ortalama sayısal değerleri ve *ACT1* ile normalizasyon oranları Tablo 7'da, grafiği ise Şekil 8'de görülmektedir.

Tablo 7. *MDR1* mRNA düzeylerinin kantitasyonu ve *ACT1* ile normalizasyon değerleri

Suş No.	Flukonazol Duyarlılık kategorisi	Ortalama <i>MDR1</i> mRNA Konsantrasyonu	<i>MDR1/ACT1</i>
H1	R	$1,49 \cdot 10^7$	26,42
H2	R	$9,84 \cdot 10^5$	1,39
H3	R	$1,67 \cdot 10^5$	0,78
B	R	$9,61 \cdot 10^4$	1,31
960	R	$1,33 \cdot 10^4$	0,92
813	Kısmi inhibisyon-S	$1,31 \cdot 10^6$	83,49
1978	Kısmi inhibisyon-S	$1,54 \cdot 10^4$	2,78
348	Kısmi inhibisyon-S	$2,11 \cdot 10^5$	6,05
93-05	Kısmi inhibisyon-S	$3,84 \cdot 10^5$	4,50
533	S	$2,29 \cdot 10^5$	1,12
565	S	$7,98 \cdot 10^5$	6,94
644	S	$1,54 \cdot 10^5$	0,19
1221	S	$5,02 \cdot 10^5$	1,32
1453	S	$2,47 \cdot 10^5$	3,75
2157	S	$2,27 \cdot 10^5$	0,30
DSY292	R kontrol	$1,15 \cdot 10^6$	15,28
ATCC 14053	S kontrol	$4,83 \cdot 10^5$	0,81



Şekil 8. *C. albicans* suşlarının *MDR1* normalizasyon grafiği

Suşların normalize edilmiş *MDR1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla değerlendirilmesine ilişkin veriler Tablo 8’de gösterilmekte olup, karşılaştırılmal olarak da şekil 9’da sunulmaktadır

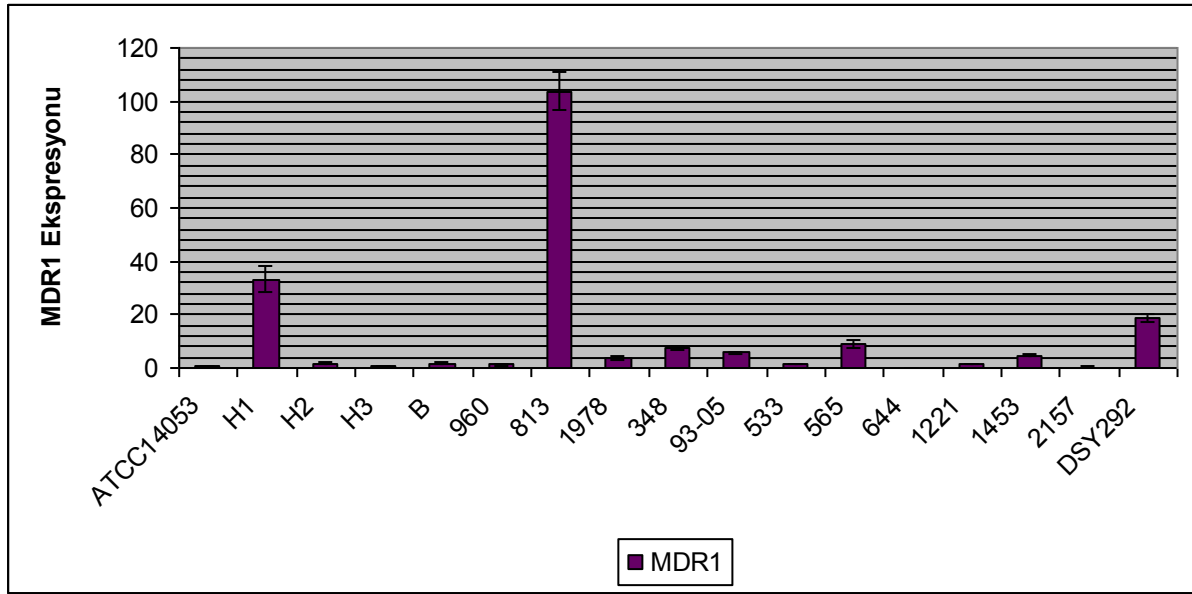
MDR1 gen ekspresyon verileri incelendiğinde, FLU’ya S *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, FLU’ya R *C. albicans* suşlarında ortalama 7.8 kat; kısmi inhibisyon etkisi gösterenlerde ortalama 30.2 kat ve S’larda ortalama 2.9 kat *MDR1* ekspresyonu saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. Suşların *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla *MDR1* ekspresyonları

Suş No.	Flukonazol duyarlılık kategorisi	ATCC suşuna göre <i>MDR1</i> ekspresyon oranı $\pm$ SS	<i>MDR1</i> ekspresyon oranlarının grup ortalaması (ortanca değeri)
H1	R	33.3 $\pm$ 4.9	7.8 (1.7)
H2	R	1.7 $\pm$ 0.2	
H3	R	1.0 $\pm$ 0.1	
B	R	1.7 $\pm$ 0.3	
960	R	1.2 $\pm$ 0.1	
813	Kısmi inhibisyon-S	103.9 $\pm$ 6.9	30.2 (6.7)
1978	Kısmi inhibisyon-S	3.5 $\pm$ 0.8	
348	Kısmi inhibisyon-S	7.6 $\pm$ 0.7	
93–05	Kısmi inhibisyon-S	5.7 $\pm$ 0.5	
533	S	1.4 $\pm$ 0.2	2.9 (1.5)
565	S	8.8 $\pm$ 1.6	
644	S	0.2 $\pm$ 0	
1221	S	1.6 $\pm$ 0.1	
1453	S	4.7 $\pm$ 0.6	
2157	S	0.4 $\pm$ 0	
DSY292	R kontrol	19.0 $\pm$ 1.5	
ATCC 14053	S kontrol	1.0	
SS: Standart Sapma			

En yüksek (ATCC kontrol suşuna göre 103.9 kat) *MDR1* fazla ekspresyonu 813 no.'lu kısmi inhibisyon etkisi gösteren-*S. C. albicans* suşunda saptandı. Bu grupta yer alan diğer suşların *MDR1*'i ılımlı düzeylerde (Kontrol suşuna göre 3.5-7.6 kat) eksprese ettikleri görüldü. FLU'ya R *C. albicans* suşları arasında ise H1 suşunda yüksek (ATCC suşuna göre 33.3 kat), H2, B ve 960 no.'lu izolatlarda ise düşük düzeyde (ATCC kontrol suşuna göre 1.0-1.7 kat) *MDR1* fazla ekspresyonu belirlendi (Tablo 8, Şekil 9).

FLU'ya S'larda 1453 ve 565 no.'lu suşlar dışında, düşük/çok düşük düzeyde *MDR1* ekspresyonu izlendi (Tablo 8, Şekil 9).



Şekil 9. *C. albicans* suşlarının ATCC kontrol suşuna kıyasla *MDR1* ekspresyonları

FLU'ya R, kısmi inhibisyon etkisi gösteren, *S. C. albicans* suşları arasında *MDR1* ekspresyonu açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı ($p=0.58$, $p=0.08$, $p=0.08$; $p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Son yirmi beş yıldaki, invaziv fungal infeksiyonlar risk grubundaki immünyetmezlikli bireylerin sayısındaki artış nedeniyle ciddi bir önem kazanmıştır. *Candida* türleri ABD ve Avrupa’da sırasıyla dördüncü ve altıncı en yaygın hastane kökenli kan dolaşımı infeksiyonu etkenidir. *C. albicans* dünya çapında kandidemi infeksiyonlarının en önemli nedeni olarak varlığını sürdürmekte olup, coğrafik olarak epidemiyolojisi farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, non-*albicans Candida* türlerinin sıklığının giderek arttığı bildirilmiştir (1-3, 25, 153).

Antifungal sağaltım ve profilaksi amacıyla azollerin özellikle de FLU’nun uzun süreli ve yaygın kullanımı direnç sorununu beraberinde getirmiştir. *Candida* türlerinin FLU direnci in vitro duyarlılık testleri ile saptanmış olup, ilgili veriler toplumsal süveyans programlarına ilişkin çalışmalarda sunulmuştur. 2008-2009 yılları arasında “SENTRY” antimikrobiyal süveyans programı kapsamında Kuzey ve Latin Amerika ile Avrupa’daki 79 merkezden kandidemi etkeni olarak soyutlanan toplam 1752 adet *Candida* spp. içerisinde 854 *C. albicans* suşu saptanmış olup, bu suşlarda FLU direnci belirlenmemiştir (154). Aynı grubun Asya Pasifik bölgesini de kapsayan kandidemi etkeni 2085 *Candida* türü ile yürüttüğü bir başka çalışmada ise 1010 *C. albicans* suşunun %0.1’nde FLU direnci bildirilmiştir (155). 2004-2007 yılları arasında yürütülmüş ve 5821 invaziv *Candida* izolatının CLSI standartlarına göre mikrodilüsyon yöntemi ile FLU duyarlılığının araştırıldığı bir başka süveyans çalışmasında ise tüm *Candida* türleri için FLU direnç oranı %2.3 iken, *C. albicans* için bu oran % 1.2 olarak bulunmuştur (156). ABD’de 2008-2011 yılları arasında iki ayrı merkezde yürütülen popülasyon temelli bir süveyans çalışmasında da kandidemi etkeni olarak soyutlanan toplam 2329 adet *Candida* izolatının %38’i *C. albicans* olup, bu suşların %2.3’ünün FLU’ya R olduğu ve önceki süveyans dönemine göre direnç oranında bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (157). “ARTEMIS DISK” küresel antifungal süveyans programı kapsamında, 1997-2007 yıllarında 142 farklı merkezden toplanan ve 31 farklı türü kapsayan 256,882 *Candida* suşunun antifungal duyarlılıklarının CLSI M44-A disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir araştırmada 128,625 *C. albicans* suşunun %1.4’ünde FLU direnci saptanmıştır (117).

Ülkemizde 2005-2009 yılları arasında kan örneklerinden soyutlanan toplam 166 *Candida* suşunun antifungal duyarlılıklarının CLSI disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada *C. albicans* izolatlarında FLU direncine rastlanmamıştır (158). Kiraz ve arkadaşları beş yıllık sürede vücut sıvılarından soyutlanan ve E test yöntemi ile antifungal duyarlılıkları

değerlendirilen on farklı türden 2068 *Candida* izolatu arasında 1265 *C. albicans* suşu için FLU direnç oranını %1.4 olarak bildirmiştir (110). Yoğun bakım hastalarının çeşitli klinik örneklerinden soyutlanan *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmalarda da *C. albicans* suşlarında FLU direnci saptanmamıştır (159-161).

Anabilim Dalımızda Aralık 2003-Ocak 2005 ve Mart 2008-Haziran 2009 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 1150 *C. albicans* suşunun CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile FLU duyarlılıklarının incelendiği çalışmalarda, 650 suştan birinde (%0.15) FLU direnci, üçünde kısmi inhibisyon etkisi belirlenmiş olup, diğer 500 suş arasında FLU'ya kısmi inhibisyon etkisi gösteren bir izolat saptanmıştır (127, Yayınlanmamış veri). FLU direnç oranımız çok düşük olup, bu veri yukarıda bildirilen gerek yurt içi gerekse yurt dışı araştırmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. FLU'nun uzun süreli ve yaygın kullanımına karşın direncin düşük olması, bu özelliğin ekstra kromozomal hareketli elemanlarla taşınmayıp, kromozomal kökenli olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda, FLU'ya R suşlardan dördünün itrakonazol ile ketokonazole R ve mikonazol için yüksek MİK değerlerine sahip olması, azoller arasında çapraz direnci düşündürmekte olup, bu durum önceki çalışmalarda da tanımlanmıştır (162-164). Ayrıca bu suşlarda belirgin düzeyde *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonunun da saptanmış olması, *CDR* pompalarının FLU dışında itrakonazol ve ketokonazole de çapraz dirençten sorumlu olması bilgisi ile paralellik göstermektedir. Araştırmamızda ayrıca FLU'ya kısmi inhibisyon gösteren suşların diğer azollere R/yüksek MİK değerlerine sahip olması bu antifungaller için de kısmi inhibisyon etkisi gösterdiği olasılığını düşündürmektedir. Ancak, bu azoller için elimizde E-test bulunmadığından suşlar siklosporin içeren/içermeyen besiyerinde E-test yöntemi ile değerlendirilememiştir. Bu etkiyi gösteren suşlar sıvı mikrodilüsyon testlerinde MİK'in üzerindeki azol konsantrasyonlarında azalmış fakat sürekli bir üreme profili sergilemektedir. Kısmi inhibisyon etkisi sıvı mikrodilüsyon yönteminin bir artefaktı olarak ortaya çıkmasına rağmen, bu tür bir üreme FLU'ya duyarlılığı azaltmaktadır. Öte yandan, bu grup suşların R'den ziyade S olarak sınıflandırılması gerektiği bildirilmiştir (165). Bu görüşler doğrultusunda çalışmamıza alınan bu izolatlar, S kabul edilmekle birlikte ayrı bir grup olarak ele alınmıştır. Anabilim Dalımızda yapılan çalışmalarda *C. albicans* için kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S suşların oranı %0.2-%0.46 olarak belirlenmiş olup (Yayınlanmamış veri, 127), bir başka araştırmada bu oran %0.35 olarak bildirilmiştir (166).

Çalışmaya alınan suşlarımızın yedisi 5-FC'ye R, yedisi de orta duyarlı bulunmuş olup, literatürde *C. albicans* suşları arasında 5-FC direncinin %3 ile %4.3 arasında olduğu rapor edilmiştir (167, 168, 148). 5-FC'ye azalmış duyarlılık oranı suşlarımızın kısıtlı sayıda ve FLU duyarlılıkları açısından özel bir grupta olması nedeniyle genel populasyonu temsil eden literatür verisinden farklılık göstermektedir.

FLU'nun yaygın ve tekrarlayan kullanımı sonucunda *C. albicans* suşlarında ortaya çıkan direnç farklı mekanizmalar ile gelişebilmekte ve bunlar aynı suшта birarada bulunabilmektedir. Orofaringeal kandidozlu HIV pozitif hastalardan soyutlanan FLU R izolatlar üzerinde yapılan bir çalışmada beş suшта *CDR1/2* ve *MDR1*; üç suшта *MDR1* ve *ERG11*; iki suшта *CDR1/2* ve *ERG11* geni fazla ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca, 11 suшта *ERG11* geni nokta mutasyonları ve atım pompalarının fazla salınımı; iki suшта *ERG11* geni nokta mutasyonları ile birlikte fazla ekspresyonu saptanmıştır. Araştırmada izolatların %85'inde atım pompalarının fazla salınımı, %65'inde *ERG11* geninde mutasyonların varlığı, %35'inde ise *ERG11* geninin aşırı salınımı direnç mekanizmaları olarak belirlemiş ve atım pompaların fazla salınımının en yaygın direnç mekanizması olduğu sonucuna varılmıştır (13). White ve arkadaşlarının (169) HIV ile infekte bir hastadan iki yıllık dönemde soyutladıkları toplam 16 oral *C. albicans* izolatu ile yaptıkları çalışmada, zaman içinde kademeli olarak artan azol direnci ile ilişkili olarak *CDR1*, *MDR1* ve *ERG16* gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiş olup, FLU'ya yüksek dirençli izolatlarda her üç genin de fazla ekspresyonu saptanmıştır. Orofaringeal kandidozlu iki AIDS hastasının tekrarlayan infeksiyonlarından soyutlanan ve FLU sağaltımı süresince giderek direnç kazanan on *C. albicans* izolatında dirençten sorumlu moleküler değişimlerin incelendiği bir araştırmada ise bir hastada artmış *MDR1* ve *ERG11* ekspresyonlarının, diğerinde ise artmış *MDR1* ekspresyonu ve *ERG11* mutasyonlarının flukonazol direncinin aşamalı gelişimi ile paralel olduğu bildirilmiştir (170).

Artmış gen ekspresyonları, RNA hibridizasyonu [örneğin "Northern Blotting" (NB)], kantitatif revers transkriptaz PZT (RT-PZT), GZ PZT gibi yöntemlerle saptanabilmekte olup, "microarray" sistemleri de gen ekspresyonlarının araştırılmasında kullanılan hibrid teknolojileridir. Ancak, günümüzde "microarray" sistemleri maliyetleri nedeniyle kısıtlı olarak uygulanabilmektedir (113). Araştırmamızda, atım pompalarının ekspresyonları GZ PZT yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Geniş bir kantitasyon aralığına sahip olması, PZT sonrası işlem gerektirmemesi, reaksiyonun ekspanansiyel fazında ölçüm yaparak duyarlı bir kantitasyon imkanı sağlaması, basit ve hızlı olması kullandığımız bu yöntemin avantajlarıdır

(171-173). Ayrıca uyguladığımız GZ PZT yöntemi FRET (“fluorescence resonance energy transfer”) formatına dayanmakta olup, bu yöntemde iki bağımsız “probe”un spesifik oryantasyonda hibridizasyonu sonucu floresan yayıldığından, FRET hibridizasyon “probe”ları yüksek seviyede özgüllük sağlamaktadır (174).

Araştırmamızda, FLU’ya R suşların tümünde başta B ve H3 suşları olmak üzere *CDR1* ve *CDR2*’nin fazla ekspresyonu belirlenmiş olup, bu suşların ortalama *CDR1/2* ekspresyon düzeyleri kısmi inhibisyon gösteren ve S suşlardan yüksek bulunmuştur. Kısmi inhibisyon gösteren ve S suşların ise benzer *CDR* ekspresyon düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Lee ve arkadaşları (165) yedisi FLU’ya kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S, beşi DBD/R 12 *C. albicans* izolatının *CDR1*, *MDR1* ve *ERG11* ekspresyonlarını GZ PZT yöntemi ile araştırdıkları çalışmalarında, DBD/R suşların kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S’lara göre daha yüksek seviyede *CDR1*, *MDR1* ve daha düşük seviyede *ERG11* eksprese ettiğini bildirmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise Maebashi ve arkadaşları (175) Japonya’daki üç AIDS hastasından elde ettikleri biri FLU R, biri DBD ve ikisi S dört *C. albicans* suşu ile yaptıkları çalışmada, RT-PZT yöntemi ile *CDR* ekspresyon düzeylerini, duyarlı standart suşa göre, flukonazole R suşta 4.4, flukonazole DBD suşta 3.3 ve S suşlarda 1.3 - 2.1 kat fazla belirlemişlerdir. *CDR1/2* ekspresyonları açısından FLU’ya R ve kısmi inhibisyon gösteren ve S suşlarımızın bulguları bu çalışmaların sonuçları ile uyum göstermektedir.

FLU’ya R suşlar arasında başta H1 olmak üzere H2, B ve 960 no.’lu suşlarda *MDR1* fazla ekspresyonu saptanmış olup, ortalama *MDR1* gen ekspresyon düzeyleri kısmi inhibisyon etkisi gösteren suşlarda, R ve S suşlara göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bunun nedeni 813 no.’lu suşun ATCC kontrol suşuna göre, 104 kat *MDR1* ekspresyonu göstermesi olduğu düşünülmüştür.

Kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S/S suşlardan 813, 348, 1453, 2157 ile 813, 348, 93-05, 1978, 565,1453’ün duyarlı diğer suşlara oranla yüksek düzeylerde sırasıyla *CDR1/2* ve *MDR1* eksprese ettiği belirlenmiştir. Goldman ve arkadaşları (176) çalışmalarında FLU, itrakonazol ve ketokonazole S iki izolatın birinde *MDR1* ve *CDR2*, diğerinde *CDR2* fazla ekspresyonu saptamıştır. White ve arkadaşları da (163) FLU’ya S iki suştan birinin *CDR1*, diğerinin de hem *CDR1* hem de *CDR2*’i fazla eksprese ettiğini ve bu suşların itrakonazole R olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada ise kısmi inhibisyon etkisi gösteren suşların FLU indüksiyonu sonrasında DBD ve R suşlara kıyasla daha az da olsa *CDR1* ve *MDR1*’i fazla eksprese ettikleri görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S

izolatların atım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyonlarını R/DBD suşlara göre farklı bir yolla kontrol ettikleri bildirilmiş, ancak bu farklılık net bir şekilde açıklanamamıştır (165). Araştırmamızda bu grup suşlar için elde ettiğimiz ekspresyon bulguları yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermekte olup, kısmi inhibisyon etkisi gösteren suşlarda atım pompa genlerinin ekspresyonlarının bu etkide rolü olabileceği düşünülebilir.

Chen ve arkadaşları (177) HIV ile infekte hastalardan soyutlanmış FLU'ya R 14 *C. albicans* izolatu ile yaptıkları araştırmada, suşların tümünde *CDR1* ve *CDR2*, dördünde ise *MDR1* fazla ekspresyonunu göstermiş olup, izolatların ATCC 10231 kontrol suşuna göre 1.6–8.0 kat *CDR1* ve 3.7–52 kat *CDR2* geni fazla ekspresyonunu bildirmiştir. Araştırmacılar suşlarının FLU direncinde *CDR1* ve *CDR2* genlerinin önemli rol oynadığını ve bu iki genin birlikte düzenlendiğini vurgulamıştır. Çalışmamızda FLU'ya R izolatlarımızda ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla 1.6–32.0 kat *CDR1*, 2.6–47.2 kat *CDR2* ekspresyonu saptanmış olup, suşlarımızın *CDR1* ve *CDR2* gen ekspresyon düzeylerinin paralel olduğu gözlenmiştir. Bu konuda elde ettiğimiz bulguların Chen ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Araştırmamızda, FLU'ya R beş suşun tümünün *CDR1* ve *CDR2*'yi, dördünün ise *MDR1*'i fazla eksprese ettiği belirlenmiştir. Bu veriler suşlarımızdaki temel FLU direnç mekanizmasının her iki atım pompası ile de ilişkili olabileceğini göstermiştir. Perea ve arkadaşları (13) HIV pozitif hastalardan soyutladıkları FLU R izolatlarda NB yöntemi ile atım pompalarının ekspresyonlarını inceledikleri çalışmada on hastadan elde edilen 11 suшта *CDR*, sekiz hastadan soyutlanan 11 suшта ise *MDR1* geni fazla ekspresyonunu bildirmiştir. White ve ark (163) 13 FLU R, 4 DBD ve 19 S *C. albicans* suşunda FLU direnç mekanizmalarını araştırmış ve NB yöntemi ile dört R ve bir DBD suшта *CDR1/2*, bir DBD suшта ise *MDR1* fazla ekspresyonu saptamıştır. Anabilim Dalımızda aynı suşlarla yapılan bir tez çalışmasında atım pompaları ve *ERG11* gen ekspresyonları RT-PZT yöntemi ile araştırılmış olup, FLU R beş izolatın dördünde *CDR1*, beşinde *CDR2*, üçünde *MDR1* ekspresyonu belirlenmiş ve suşlarımızın hiçbirinde *ERG11* fazla ekspresyonu görülmemiştir (178). RT-PZT'nin duyarlılığının daha düşük olması nedeniyle, GZ PZT ile saptadığımız düşük ekspresyon oranları bu yöntem ile saptanamamıştır. Frade ve arkadaşlarının üçü FLU R, dördü DBD ve üçü S on *C. albicans* izolatının *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve *ERG11* ekspresyonlarını iki farklı yöntem ile araştırdığı çalışmada, GZ PZT ile FLU R izolatların *CDR1*, *CDR2* ve *ERG11* ekspresyonları S izolatlara göre yüksek bulunmuş olup, *MDR1* fazla ekspresyonu ise sadece

bir DBD suşta saptanmış, diğer suşlarda ise çok az gösterilmiş veya hiç *MDR1* ekspresyonu izlenmemiştir. Ekspresyon seviyeleri NB yöntemi ile değerlendirildiğinde *MDR1* dışındaki genler için iki yöntem arasında iyi bir korelasyon (korelasyon katsayısı ≥ 0.91) gözlenmekle birlikte, NB yönteminin çok yüksek ve çok düşük ekspresyon düzeylerini saptamada kısıtlılıkları olduğu bildirilmiştir. Her iki çalışmanın verileri de araştırmamızda kullandığımız GZ PZT yönteminin gen ekspresyonlarının değerlendirilmesinde daha duyarlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda, FLU MİK'leri ve atım pompalarının ekspresyon seviyeleri arasında belirli bir korelasyon saptanmamıştır. Sonuçlarımızın bu veri açısından önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (176, 179).

Araştırmamızda atım pompa genlerinin ekspresyonlarının FLU'ya R, kısmi inhibisyon etkisi gösteren ve *S. C. albicans* suşları arasında farklı olduğu gözlenmesine rağmen, yapılan istatistik analizi sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamış olup, bu sonucun gruplarımızdaki suş sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışmanın en önemli kısıtlılığı FLU R/DBD suş sayısının az olması olup, bu durum FLU direnç oranının düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda *CDR1* ve *CDR2* genlerinin ekspresyonunun Tac1p; *MDR1* geninin ekspresyonu ise Mrr1p, Cap1p, Mcm1p ve Upc2p gibi transkripsiyon faktörleri ile kontrol edildiği saptanmıştır (133, 135, 180-182). Bu transkripsiyon faktörleri atım pompa genlerinin “promoter” bölgesindeki “cis acting” elementlere bağlanmaktadır. FLU'ya R izolatlarda Tac1p ve Mrr1p'deki mutasyonların sırasıyla *CDR1/2* ve *MDR1* geni fazla ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (131, 134-136, 183). Upc2p'deki mutasyonların ise esasen *ERG11* fazla ekspresyonu aracılığıyla FLU direncine yol açtığı ancak *MDR1* ekspresyonunda ılımlı bir artışa neden olduğundan dirence katkıda bulunmadığı bildirilmiştir. Cap1p mutasyonlarının ise klinik izolatlarda saptanmadığı vurgulanmıştır (184). Ayrıca atım pompa genlerinin “promoter” bölgesinde meydana gelen nükleotit değişimlerinin de genlerin fazla ekspresyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (129, 130). Suşlarımızın FLU direncinde atım pompalarının fazla ekspresyon mekanizmasının anlaşılması için transkripsiyon faktörleri Tac1p ve Mrr1p mutasyonları açısından araştırılmaktadır.

Daha önce aynı *C. albicans* suşları ile yapılan bir başka çalışmada (127) *ERG11* geni mutasyonları araştırılmış olup, literatürde daha önce FLU'ya direnç gelişiminde rolü olduğu bildirilmiş K143R, G464S, G465S ve V488I ile dirençte rolü kesin olmayan D116E, D153E,

E266D, S412T ve R469K mutasyonları saptanmıştır. Bizim araştırmamızda, H1, H2, B suşlarında K143R ve V488I mutasyonuna ek olarak *CDR1/2*, *MDR1* fazla ekspresyonunun; H3 suşunda G464S, G465S mutasyonu ile birlikte *CDI/2* fazla ekspresyonunun FLU direncinde rolü olduğu görülmüştür. 960 no.'lu suşta ise sadece düşük düzeyde *CDR1/2* ve *MDR1* fazla ekspresyonu saptanmış olup, bu durum suşun diğer R suşlara göre daha düşük bir FLU MİK değerine (8µg/ml) sahip olmasını açıklamaktadır. Başta bu suşta olmak üzere tüm R izolatlarda *ERG3* geni mutasyonları gibi ergosterol biyosentez yolağındaki diğer genlerin olası genetik değişimleri ile ilişkili başka mekanizmaların da dirence katkısı olabileceği unutulmamalıdır.

Bu veriler ışığında çalışmamıza alınan FLU'ya R *C. albicans* suşlarında *ERG11* mutasyonları ile birlikte atım pompalarının fazla ekspresyonlarının dirençten sorumlu önemli mekanizmalar olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra kısmi inhibisyon gösteren suşlarda da bu genlerin ekspresyonlarının bu etkide rolü olabileceği düşünülebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamıza alınan FLU'ya R/kısmi inhibisyon gösteren-S dokuz *C. albicans* suşunun altısı 5-FC'ye R, ikisi orta duyarlı, tümü AmB'ye S, biri dışında tümü klotrimazole S, yedisi itrakonazol ve ketokonazole R, üçü de vorikonazole R olarak bulunmuştur. FLU'ya S altı adet *C. albicans* suşunun beşinin 5-FC'ye orta duyarlı, birinin R olduğu, tümünün AmB, vorikonazol, ketokonazol ve klotrimazole S, itrakonazole DBD olduğu saptanmıştır.

Çalışmamıza alınan beş FLU'ya R, dört kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S ve altı S *C.albicans* suşunda atım pompalarının ekspresyonları araştırılmış olup, R suşlar arasında H3 ve B'de daha yüksek olmakla birlikte tümünde *CDR1* ve *CDR2*; H1 suşunda yüksek, H2, B ve 960 no.'lu izolatlarda ise düşük düzeyde *MDR1* fazla ekspresyonu belirlenmiştir. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren-S suşlarda bir suшта görülen yüksek *MDR1* ekspresyonu dışında, ılımlı düzeylerde *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* fazla ekspresyonu izlenirken, S suşlarda iki suş dışında atım pompalarının ekspresyonlarının düşük düzeylerde olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda FLU R *C. albicans* suşlarında *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* atım pompa genlerinin fazla ekspresyonları saptanmıştır. Çalışılan suşlarda dirençten sorumlu mekanizmaların, *ERG11* mutasyonları ve atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu sonucuna varılmış olup, FLU direncinde birden fazla mekanizmanın birlikte sorumlu olduğu görülmüştür.

Dirençte rol oynayan birçok mekanizma söz konusu olduğundan, suşlarımızın direncinde atım pompaların rolünün belirlenmesi gelecekte yapılacak çalışmalar açısından yol gösterici olup, bu pompaların ekspresyonlarını kontrol eden transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonların ve bu faktörlerin bağlandığı “promoter” bölgesindeki nükleotit değişimlerinin araştırılmasının, fazla ekspresyon mekanizmasının anlaşılmasına ışık tutacağı düşünülmektedir.

Suşlarımızın FLU direncinde atım pompalarının rolünün belirlenmiş olması, bu pompaları inhibe eden ilaçların azollerle birlikte kullanılması ya da bu inhibisyon etkisini gösteren yeni ilaçların üretilmesi gibi sağaltım yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamıza alınan FLU'ya R *C. albicans* suşlarında *ERG11* mutasyonları ile birlikte atım pompalarının fazla ekspresyonlarının dirençten sorumlu önemli mekanizmalar olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kısmi inhibisyon gösteren suşlarda da bu genlerin ekspresyonlarının bu etkide rolü olabileceği düşünülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:142-51.
2. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 2008;12:204-212.
3. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2007;48:1-12.
4. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39:309–17.
5. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:133–63.
6. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D *et al.* Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48:503–35.
7. Charlier C, Hart E, Lefort A *et al.* Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:384–410.
8. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2006;42:244–51.
9. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002;359:1135–44.
10. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:73–85.
11. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587:240–8.
12. Mishra NN, Prasad T, Sharma N *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2007;54:201–35.
13. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR *et al.* Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains

- displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2676–84.
14. Prasad R, Panwar S. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Curr Sci.* 2004;86:62–73.
 15. St Georgiev V. Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Curr Drug Targets.* 2000;1:261–84.
 16. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology.* Fourth edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 1999 p.818–20.
 17. 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.
 18. 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.* Seventh edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone; 2010 p.2656–2674.
 19. Howell SA, Hazen KC. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011 p. 1-29.
 20. Saniç A. Mantarlar: Genel Mikrobiyolojik Özellikler ve Sınıflandırma Mutlu Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö editör. *Fungal İnfeksiyonlar.* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006 p. 9–20.
 21. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, eds. *Medical Microbiology.* Twenty four edition. USA: McGraw-Hill Companies, 2007 p.621- 657.
 22. Gale CA, Berman J. Cell cycle and growth control in *Candida* species. In: Calderone CA and Clancy CJ, eds. *Candida and Candidiasis.* Second edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2012 p.101-24.
 23. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2002 p. 1797- 1808.
 24. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of

- Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 2007;45:1735–45.
25. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. Int J Infect Dis. 2010;14:e954–e966.
 26. Brandt ME, Warnock DW. Taxonomy and Classification of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. Manual of Clinical Microbiology. Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011 p. 1745-55.
 27. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. FEMS Yeast Res. 2006; 6:14–29.
 28. Munro C, Richard ML. The Cell Wall: Glycoproteins, Remodelling and Regulation. In: Calderone CA and Clancy CJ, eds. *Candida* and Candidiasis. Second edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2012 p.197-223
 29. Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, P.W.J. de Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to candida biofilm formation. J Dent Res. 2009;8:105–115.
 30. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. J Microbiol. 2011; 49:171–177.
 31. Yücesoy M. *Candida* türlerinin virulans faktörleri ve konağa ait faktörler. Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg. 1999;13:377-388.
 32. van de Veerdonk FL, Kullberg B-J and Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. Curr Opin Crit Care. 2010;16:453–459.
 33. 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.
 34. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36: 223- 228.
 35. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An introduction to the medically important *Candida* species In: Calderone CA and Clancy CJ, eds. *Candida* and Candidiasis.

- Second edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2012 p.11-25.
36. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006; 60: 5-15.
 37. Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL Jr, Trupin SR, Hoyer LL. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2005;73:1656-63.
 38. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family-a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008;46:1-15.
 39. 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.
 40. Douglas LJ. *Candida* biofilm and their role in infection. *Trends in Microbiology* 2003;11:30–36.
 41. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:340- 345.
 42. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62:10-24.
 43. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:608- 611.
 44. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6:979- 986.
 45. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:5048–51.
 46. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009;47:681-9.
 47. Kuleta JK, Kozik MR, Kozik A Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*; 2009;56: 211–24.

48. Tay ST, Abidin IA, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol.* 2011;49:556–60.
49. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005;48:365-377.
50. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:400-428.
51. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol.* 2001;147:1997- 2005.
52. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ Y. Sağlıklı ve *Candida* enfeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2000;14:405-408.
53. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK, Jayatilake JAMS, Yeung KWS, Yau JYY, Samaranayake LP. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS* 2006;114:857–66.
54. Fotadar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses.* 2005;48 62- 67.
55. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2001;44:361- 367.
56. Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest.* 2007;117:3049-58.
57. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol.* 2008;54:647-59.
58. Arıkan S. Mantarlarda Pleomorfizm. In: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, editörler. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı p.77–86, 27–30 Mayıs 2003, Bodrum.
59. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61: 529–553.

60. Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:366–371.
61. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. Opportunistic Mycoses In: Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA, editors. *Medical Microbiology*. Sixth Edition. Philadelphia, Mosby Elsevier; 2009 p.751–774.
62. Vargas K, Messer SA, Pfaller MA. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3593–3607.
63. Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 2003;2:390–397.
64. Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun.* 2005;73:5482-5492.
65. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Mycology. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Sixth edition. Philadelphia: PA Lippincott Co, 2006 p. 1151-1242.
66. Vasquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD editor. *Clinical Mycology*. First edition. Oxford University Press, 2003 p.141-219.
67. Hoepelman AIM. Opportunistic Fungi. In: Cohen J, Powderly WG, ed. *Infectious Diseases*. Second Edition. Mosby, Elsevier, 2004 p.2341-2348.
68. Yakoob J, Jafri W, Abid S, Jafri N, Islam M, Hamid S, Shah HA, Hussainy AS. *Candida* esophagitis: Risk factors in non-HIV population in Pakistan. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2328–2331.
69. 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.
70. Shea YR. Algorithms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p.1745–1761.
71. Ener B. Fungal infeksiyonlarda tanı. *Ankem Derg.* 2011;25(Ek 2):156-161.

72. LaRocco MT. Reagents, Stains, and Media: Mycolgy. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. Manual of Clinical Microbiology. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p.1737–1744.
73. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. Laboratory Diagnosis of Fungal Diseases. In: Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA, editors. Medical Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia, Mosby Elsevier; 2009 p.689- 699.
74. Larone DH. Yeast and Yeast Like Organisms. Medically Important Fungi A Guide to Identification. Fifth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2011 p.109–143.
75. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2003;2:8.
76. Cárdenes CD, Carrillo-Muñoz AJ, Arias A, Rodríguez-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, Arévalo MP. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. J Microbiol Methods. 2004;59:293-7.
77. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, Quindós G. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important Candida species. J Clin Microbiol. 2006;44:3340-5.
78. Ilkit M, Hilmioglu S, Tasbakan M, Aydemir S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 6):762-5.
79. Liguori G, Di Onofrio V, Gallé F, Lucariello A, Albano L, Catania MR, Guida M. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. J Prev Med Hyg. 2010;51:121-4.
80. Baradkar VP, Mathur M, Kumar S. Hichrom candida agar for identification of *Candida* species. Indian J Pathol Microbiol. 2010;53:93-5.
81. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. Med Mycol. 2011;49:16-25.

82. Agarwal S, Manchanda V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29:172-7
83. Vijgen S, Nys S, Naesens R, Magerman K, Boel A, Cartuyvels R. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Med Mycol.* 2011;49:107-10.
84. Valenza G, Strasen J, Schäfer F, Frosch M, Kurzai O, Abele-Horn M. valuation of new colorimetric vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3784-7.
85. Meurman O, Koskensalo A, Rantakokko-Jalava K. Evaluation of Vitek 2 for identification of yeasts in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:591-3.
86. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol.* 2006;44:227-8.
87. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001;39:9-33.
88. Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1782-5.
89. Rimek D, Redetzke K, Singh J, Heinrich K, Kappe R. Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia. *Mycoses.* 2004;47: 23–6.
90. Ellepola NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005;43:65–84.
91. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C; Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14:R222.
92. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha-and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:164–71.

93. Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR. Reactivity of (1,3)-beta-d-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3450-3.
94. Morrison CJ, Hurst SF, Reis E. Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:835-848.
95. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*. 2004;126(3): 289-97.
96. Willinger B. Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections. *Curr Drug Targets*. 2006;7: 513-22.
97. Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis*. 2006;8(3): 128-39.
98. Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A, Poulain D. Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4551-8.
99. Doluca Dereli M. *Candida* İnfeksiyonlarının Tanısındaki Yenilikler. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 3-7 Kasım 2012, Kuşadası/Aydın.
100. 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.
101. 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.561-568.

102. 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.
103. White TC. Mechanisms of Resistance to Antifungal Agents. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. Manual of Clinical Microbiology. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p.1961–1971.
104. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. Antifungal Agents. In: Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA, eds. Medical Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia, Mosby Elsevier; 2009 p.701–713.
105. Arkan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. Manual of Clinical Microbiology. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p.1949–1960.
106. Chiu YS, Chang SC, Hsueh PR, Wang JL, Sun HY, Chen YC. Survey of amphotericin B susceptibility of *Candida* clinical isolates determined by Etest. J Microbiol Immunol Infect. 2006;39:335-41.
107. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JJ, Colombo AL; Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in latin america: a laboratory-based survey. PLoS One. 2013;8:e59373.
108. Jung SI, Shin JH, Choi HJ, Ju MY, Kim SH, Lee WG, Park YJ, Lee K; Korean Study Group for Candidemia. Antifungal susceptibility to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine in *Candida* bloodstream isolates from 15 tertiary hospitals in Korea. Ann Lab Med. 2012;32:426-8.
109. Altuncu E, Bilgen H, Cerikçioğlu N, Ilki A, Ulger N, Bakır M, Akman I, Ozek E. Neonatal *Candida* infections and the antifungal susceptibilities of the related *Candida* species. Mikrobiyol Bul. 2010;44:593-603.
110. Kiraz N, Oz Y. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. Med Mycol. 2011;49:126-31.
111. Chen PL, Lo HJ, Wu CJ, Lee HC, Chang CM, Lee NY, Wang AH, Lin WL, Ko NY, Lee CC, Ko WC. Species distribution and antifungal susceptibility of blood *Candida*

- isolates at a tertiary hospital in southern Taiwan, 1999-2006. *Mycoses*. 2011;54:e17-23.
112. Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Ofiazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia*. 2011;172: 187–199.
 113. Edlind TD, Saribaş Z, Arıkan S. Antifungal Direncin Moleküler Yöntemlerle Saptanması. 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. 569–576.
 114. Ng AW, Wasan KM, Lopez-Berestein G. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J Pharm Pharm Sci*. 2003;6:67-83.
 115. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porras A, Yagüe G; FUNGEMYCA Study Group. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1181-7.
 116. Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *J Glob Infect Dis*. 2011;3:357-60.
 117. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1366-77.
 118. Pappas G, Ierodiakonou V, Falagas ME. Lost in translation: differences in antimicrobial indication approval policies between the United States and Europe. *Clin Ther*. 2009;31:1595-603.
 119. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem*. 2012;20:5678-98.

120. Watt K, Manzoni P, Cohen-Wolkowicz M, Rizzollo S, Boano E, Jacqz-Aigrain E, Benjamin DK. Triazole use in the nursery: fluconazole, voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *Curr Drug Metab.* 2013;14:193-202.
121. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL *et al.* Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2012;11:1289-99.
122. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, Bossche HV. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1999;145:2701-13.
123. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66:373-84.
124. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, Ni YX, Ge HL. Erg 11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2013;13: 386-93.
125. Oliveira Carvalho V, Okay TS, Melhem MS, Walderez Szeszs M, Del Negro GM. The new mutation L321F in *Candida albicans* *ERG11* gene may be associated with fluconazole resistance. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 9.
126. Feng LJ, Wan Z, Wang XH, Li RY, and Liu W. 2010. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in *ERG11* gene. *Chin. Med. J. (Engl)* 2010;123:544–548.
127. Manastır L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses.* 2011;54:99–104.
128. Tsao S, Rahkhoodae F, Raymond M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4): 1344-52.

129. Coste AT, Crittin J, Bauser C, Rohde B, Sanglard D. Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot Cell*. 2009;8:1250-67.
130. Bruzual I, Kumamoto CA. An MDR1 promoter allele with higher promoter activity is common in clinically isolated strains of *Candida albicans*. *Mol Genet Genomics*. 2011;286:347-57.
131. Coste A, Turner V, Ischer F *et al.* A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. 2006;172:2139–56.
132. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*. 2009;9:1029-50.
133. Rognon B, Kozovska Z, Coste AT, Pardini G, Sanglard D. Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology*. 2006;152(Pt 12):3701-22.
134. Znaidi S, De Deken X, Weber S, Rigby T, Nantel A, Raymond M. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2007; 66:440-52.
135. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2007; 3:e164
136. Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol*. 2008;69:827–40
137. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67: 2131-8.
138. Johnson EM, Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility Test Methods: Yeast and Filamentous Fungi. In: Carroll KC, Funke G, Jorgensen JM, Landry ML,

- Warnock DW eds. Manual of Clinical Microbiology. Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011 p. 2020-2037.
139. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
 140. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Updat. 2010;13:180-95.
 141. Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. J Infect. 2007;54:504-8.
 142. Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2004;42:2249-51.
 143. Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC endpoint determination and evaluation of a sterol quantitation method for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 2477–2481.
 144. Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., and Bille, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:2378–2386.
 145. Pfaller, M.A., Castanheira, M., Messer, S.A., Moet, G.J., and Jones, R.N. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 69:45–50.

146. Milan, E.P., Burattini, M.N., Kallás, E.G., Fischmann, O., Costa, P.R., and Colombo, A.L. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 32:211–216.
147. Pelletier, R., Peter, J., Antin, C., Gonzalez, C., Wood, L., and Walsh, T.J. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *Clin Microbiol.* 2000; 38:1563–1568.
148. 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 LT, 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;42:1519-27.
149. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol.* 2002;40:918-21.
150. van Eldere J, Joosten L, Verhaeghe V, Surmont I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. *J Clin Microbiol.* 1996;34:842-7.
151. Frade, J.P., Warnock, D.W., and Arthington-Skaggs, B.A. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* 2004.;42:2085–2093.
152. Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma teknikleri ve analiz yöntemleri. İzmir, D.E.Ü. Rektörlük Matbaası, 2001, p.228-232.
153. Ruan SY, Hsueh PR. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2009;108:443-51.
154. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY

- Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38:65-9.
155. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011;49:396-9.
156. Lyon GM, Karatela S, Sunay S, Adiri Y; Candida Surveillance Study Investigators. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1270-5.
157. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3435-42.
158. Aydin F, Bayramoglu G, Guler NC, Kaklikkaya N, Tosun I. Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey. *Med Mycol*. 2011;49:316-9.
159. Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O, Ozlu N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses*. 2007;50:52-7.
160. Kucukates E, Erturan Z, Susever S, Yegenoglu Y. In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. *APMIS*. 2005;113:278-83.
161. Ergon MC, Gülay Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses*. 2005;48:126-31.
162. Muller FM, Weig M, Peter J, Walsh TJ. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:338–40.
163. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1704–13.

164. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:349–53.
165. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53:217–24.
166. Lee MK, Kim HR, Kang JO *et al*. Susceptibility and trailing growth of *Candida albicans* to fluconazole: results of a Korean multicentre study. *Mycoses*. 2007;50:148–9.
167. Pfaller, M.A, Messer, S.A., Boyken, L., Huynh, H., Hollis, R.J., and Diekema, D.J. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3518-3521.
168. Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J.H., Pappas, P.G., Hamil, R.J., Larsen, R.A., Horowitz, H.W., Powderly, W.G., Hyslop, N., Kauffman, C.A., Clearly, J., Mangino, J.E., and Lee, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:3149-3154.
169. 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;41:1482–7.
170. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:3065–72.
171. Fronhoffs S, Totzke G, Stier S *et al*. A method for the rapid construction of Crna standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 2002;16:99–110.
172. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39:75–85.
173. Wittwer CT, Kuskawa N., Dolapçı I. Real-time PCR. 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.71–84.
174. Houghton SG, Cockerill FR 3rd. Real-time PCR: overview and applications. *Surgery*. 2006;139:1-5.
175. Maebashi K, Nimi M, Kudoh M, Fischer FJ, Makimura K, Niimi K, Piper RJ, Uchida K, Arisawa M, Cannon RD, Yamaguchi H. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:527–536.
176. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E *et al*. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50:25–32.
177. Chen LM, Xu YH, Zhou CL, Zhao J, Li CY, Wang R. Overexpression of *CDR1* and *CDR2* genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *J Int Med Res*. 2010; 38:536–45.
178. Irmak O. Flukonazol dirençli *Candida albicans* suşlarında atılım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ve 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* gen ekspresyon düzeylerinin semi-kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi - Uzmanlık tezi, 2010.
179. Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27:403–8.
180. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell*. 2004; 3:1639–52.
181. Riggle PJ, Kumamoto CA. Transcriptional regulation of *MDR1*, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an *Mcm1p* binding site. *Eukaryot Cell*. 2006;5:1957-68.
182. Znaidi S, Weber S, Al-Abdin OZ, Bomme P, Saidane S, Drouin S, Lemieux S, De Deken X, Robert F, Raymond M. Genomewide location analysis of *Candida albicans* *Upc2p*, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. *Eukaryot Cell*. 2008;7:836-47.

183. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6:1889-904.
184. Schubert S, Barker KS, Znaidi S, Schneider S, Dierolf F, Dunkel N, Aïd M, Boucher G, Rogers PD, Raymond M, Morschhäuser J. Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:2212-23.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

 T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74 Fax : 0 232 - 259 05 41
İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 12663 18 Eylül 2006

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 14 Eylül 2006 tarih 201 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen; 178 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Mine YÜCESOY'un sorumlu olduğu "Flukonazol dirençli kandida albicans suşlarında atılım pompalarını kodlayan CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ve de 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan ERG11 gen ekspresyon düzeylerinin polimeraz zincir tepkimesi ile karşılaştırılması" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Mine Yücesoy
Ek: 1 adet kurul kararı

Prof. Dr. Sebnem ÖZKAN
Dekan



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 14.09.2006/201

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Prof. Dr. Uğur MÜNGAN
Prof. Dr. Hüseyin İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Prof. Dr. Özgül SAĞOL
Prof. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yrd. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 14 Eylül 2006 tarih ve 10/18/2006 no.lu toplantısında, 178 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Mine YÜCESOY'un sorumlu olduğu "Flukonazol dirençli kandida albicans suşlarında atılım pompalarını kodlayan CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ve de 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan ERG11 gen ekspresyon düzeylerinin polimeraz zincir tepkimesi ile karşılaştırılması" isimli, Araştırma Fon Saymanlığından destekleneceği belirtilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

8.2. Tez Başlığı Değişikliği

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARLARI**

**TOPLANTI SAYISI : 01
TOPLANTI TARİHİ : 10.01.2011**

**TOPLANTI GÜNÜ : Pazartesi
TOPLANTI SAATİ : 11.00**

KARAR 05/ Enstitümüz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji doktora programı öğrencisi Sinem GÜLAT 'ın, tez danışmanı Prof. Dr. Mine DOLUCA tarafından 05/01/2011 tarihli yazı ile önerilen ve Etik Kurul onayı alınan tez başlığı değişikliğinin aşağıdaki şekilde kabulüne mevcudun oy birliği ile karar verildi.

Yeni Tez konusu: 'Flukonazol Dirençli Candida Albicans Suşlarında Atılım Pompalarını Kodlayan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin 'real-time' Polimeraz Zincir Tepkimesi İle Araştırılması'

Not: Teze DEU.HSL.PHD-2006970083 kodu verilmiştir. Tezin iç ve dış kapaklarında yer alması gereklidir.

8.3. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ Araştırma Görevlisi SİNEM GÜLAT	
TC Kimlik No / Pasaport No:	16421586474
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı, 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0232 412 45 15
e-posta :	sinem.ozer@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2006
Türkiye	Celal Bayar Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2003

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	2006-2013

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Sağlık Bilimleri

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	

Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Biçmen C, Doluca M, Gulat S, Gündüz AT, Tuksavul F. "Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts <i>Plus</i> ", New Microbiologica 2012; 35:327–334.
Özer S, Yücesoy M. Simüle kan örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile <i>Candida</i> DNA'sının saptanması", Mikrobiyoloji Bülteni 2007;41:419-428.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Gulat S, Irmak O, Yucesoy Doluca M, "Investigation of efflux pumps and ERG11 gene expression levels in fluconazole resistant <i>Candida albicans</i> isolates" 22th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, İNGİLTERE, Nisan 2012
Doluc M, Gülat S, Özhun M, "Klinik Örneklerden Soyutlanan <i>Candida albicans</i> Suşlarının Genotip Dağılımları ve Antifungal Duyarlılıkları", Klimud I.Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, ANTALYA, Kasım 2011
Biçmen C, Doluca M, Gülat S, Gündüz AT, Tuksavul F, "Klinik örneklerden soyutlanan maya türlerinin tanımlanması, anti-mikotik ilaç duyarlılıklarının araştırılması ve integral sistemin değerlendirilmesi", XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, K.K.T.C., Kasım 2010
Gülat S, Doluca M, "Flukonazole dirençli/doza bağımlı duyarlı <i>Candida albicans</i> izolatlarında atım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinin araştırılması", XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, K.K.T.C., Kasım 2010
Yucesoy Doluca M, Ergon M, Gulat S, "Evaluation of four chromogenic media for the presumptive identification and differentiation of yeasts", 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, AVUSTURYA, Nisan 2010

Yucesoy M, Ergon M, Gulat S, "Comparison of four different chromogenic media for the presumptive identification of yeasts",Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008 IUMS, 12. International Congress of Mycology, İSTANBUL, Ağustos 2008
Irmak O, Gulat S, Ergon MC, Yucesoy M, "Antifungal susceptibility testing of <i>Trichosporon asahii</i> isolates with microdilution method",Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2008 IUMS, 12. International Congress of Mycology, İSTANBUL, Ağustos 2008
Yucesoy M, Ayhan Y, Irmak O, Gülfidan G, Gulat S, "Antifungal susceptibilities of <i>Candida</i> bloodstream isolates from two different Turkish hospitals", 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, İSPANYA, Nisan 2008
Özer S, Yücesoy M, "Kan kültür örneklerinden soyutlanan <i>Candida albicans</i> izolatlarının moleküler genotiplendirilmesi", 5. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, ÇANAKKALE, Haziran 2007
Özer S, Yücesoy M, "Kan örneklerinden polimeraz zincir tepkimesi ile <i>Candida</i> DNA'sının araştırılması",XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, ANTALYA, Eylül 2006
Yucesoy M, Ergon MC, Ozer S, "Performance of three differential media for the presumptive identification of yeasts", 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, FRANSA, Nisan 2006
Özer S, Yücesoy M, "Kan kültürlerinden soyutlanan <i>Candida</i> türlerinin antifungal duyarlılıkları", 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi, KONYA, Mayıs 2005

Diğer Yayınlar

--