

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ATILIM POMPALARINI FAZLA EKSPRESE
EDEN FLUKONAZOL DİRENÇLİ/DOZA
BAĞIMLI DUYARLI *CANDIDA ALBICANS*
SUŞLARINDA BU GENLERİN
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

DR.KEMAL TURAN KALKANDELEN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**ATILIM POMPALARINI FAZLA EKSPRESE
EDEN FLUKONAZOL DİRENÇLİ/DOZA
BAĞIMLI DUYARLI *CANDIDA ALBICANS*
SUŞLARINDA BU GENLERİN
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR.KEMAL TURAN KALKANDELEN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. MİNE DOLUCA DERELİ

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından
2011.KB.SAG.061 sayı ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalıŐmalarım sűresince bilgi, deneyim, zaman ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli tez danıŐmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ'ye, tez izleme komitesinde yer alan ve uzmanlık eğitimimde önemli katkısı bulunan hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep GŪLAY'a, tez izleme komitesinde yer alan hocam Sayın Doç. Dr. M. Cem ERGON'a ve Anabilim Dalı BaŐkanı hocam Sayın Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR'a teŐekkűrlerimi sunarım.

Ayrıca, baŐta tez izleme komitesinde bulunmadığı halde, uygulanan yöntemle ilgili yaŐadığım her tűrlű gűlűkte bana yardımcı olan ve deneyimlerini paylaŐan hocam Sayın Doç Dr. Mehmet Ali ŐKTEM olmak űzere, uzmanlık eđitimimde emeđi geçen deđerli hocalarımlın tűműne teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Tarihçe.....	4
4.2. Genel Özellikler.....	6
4.3. Hücre Yapısı.....	8
4.3.1. Plazma Membranı.....	8
4.3.2. Hücre Duvarı.....	8
4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri.....	9
4.4.1. Morfolojik Değişim.....	10
4.4.2. Adezinler.....	11
4.4.3. İnvazinler.....	11
4.4.4. Tigmotropizm.....	12
4.4.5. Biyofilm Oluşumu.....	12
4.4.6. Fenotipik Dönüşüm.....	13
4.4.7. Hidrolitik Enzimler.....	13
4.4.7.1. Proteazlar.....	13
4.4.7.2. Fosfolipazlar.....	14

4.4.7.3. Lipazlar.....	14
4.5. <i>C. albicans</i> 'ın Klinik Önemi.....	14
4.6. <i>C. albicans</i> İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı.....	16
4.6.1. Direk Bakı.....	16
4.6.2. Kültür.....	16
4.6.3. Serolojik Yöntemler.....	18
4.6.4. Moleküler Yöntemler.....	19
4.7. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları.....	21
4.7.1. Polyenler.....	21
4.7.1.1. Amfoterisin B.....	21
4.7.1.2. Nistatin.....	22
4.7.2. Azol Türevleri.....	22
4.7.2.1. İmidazoller.....	23
4.7.2.2. Triazoller.....	23
4.7.3. Ekinokandinler.....	29
4.7.4. Flusitozin.....	30
4.7.5. Alilaminler.....	31
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
5.1. Suşlar.....	32
5.2. PZT - Dizi Analizi İle Atılım Pompa Genlerinin Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Genlerdeki Nokta Mutasyonlarının Araştırılması.....	35
5.2.1. DNA İzolasyonu.....	35
5.2.2. PZT İçin Gerekli Öncüllerin Tasarlanması ve Hazırlanması.....	36
5.2.3. Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT).....	37

5.2.3.1. <i>TAC1</i> PZT.....	38
5.2.3.2. <i>MRR1</i> PZT.....	39
5.2.4. PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntülenmesi.....	40
5.2.5. PZT Ürünlerinin Dizi Analizi.....	41
5.3. Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
6. BULGULAR.....	42
6.1. <i>TAC1</i> PZT - Dizi Analizi Sonuçları.....	42
6.1.1. <i>TAC1</i> PZT Sonuçları.....	42
6.1.2. <i>TAC1</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	42
6.2. <i>MRR1</i> PZT - Dizi Analizi Sonuçları.....	68
6.2.1. <i>MRR1</i> PZT Sonuçları.....	68
6.2.2. <i>MRR1</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	68
6.2.2.1. SC5314 <i>C. albicans</i> Suşu Referans Alındığında <i>MRR1</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	69
6.2.2.2. ATCC14053 <i>C. albicans</i> Suşu Referans Alındığında <i>MRR1</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	71
6.2.2.3. DSY292 <i>C. albicans</i> Suşu Referans Alındığında <i>MRR1</i> Dizi Analizi Sonuçları.....	72
7. TARTIŞMA.....	100
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	107
9. KAYNAKLAR.....	108

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo-1. Tıbbi öneme sahip <i>Candida</i> türleri ve görülme sıklıkları.....	7
Tablo-2. <i>Candida</i> infeksiyonları için başlıca risk faktörleri.....	10
Tablo-3. Çalışmaya alınan <i>C. albicans</i> suşlarının, flukonazole duyarlılık kategorileri ve flukonazol MİK değerleri.....	33
Tablo-4. İncelenen <i>C. albicans</i> suşlarının ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları.....	34
Tablo-5. Çalışmaya alınan <i>C. albicans</i> suşlarının <i>TAC1</i> gen dizilerinin elde edilebilme oranı.....	43
Tablo-6. ATCC14053 <i>C. albicans</i> 'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen <i>TAC1</i> mutasyonları.....	44
Tablo-7. Çalışmaya alınan <i>C. albicans</i> suşlarının <i>MRR1</i> gen dizilerinin elde edilebilme oranı.....	69
Tablo-8. SC5314 <i>C. albicans</i> 'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen <i>MRR1</i> mutasyonları.....	70
Tablo-9. ATCC14053 <i>C. albicans</i> suşuna ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen <i>MRR1</i> mutasyonları.....	72
Tablo-10. Flukonazole dirençli DSY292 <i>C. albicans</i> 'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen <i>MRR1</i> mutasyonları.....	73
Tablo-11. <i>TAC1</i> ve <i>MRR1</i> genlerinde literatürde bildirilen fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar ve amino asit değişimleri.....	102
Tablo-12. Flukonazol dirençli suşların MİK değerleri, ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları ve saptanan mutasyonlar	103

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil-1.** Çalışılan *C.albicans* suşlarına ait 2946 baz uzunluğundaki *TAC1* gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri..... 42
- Şekil-2.** İncelenen *C. albicans* suşlarının *TAC1* gen bölgelerinde dizi analizi sonucunda saptanan nükleotid değişiklikleri.....45-61
- Şekil-3.** İncelenen *C. albicans* suşlarının *TAC1* gen bölgelerinde dizi analizi sonucunda saptanan amino asit değişiklikleri62-67
- Şekil-4.** Çalışılan *C.albicans* suşlarına ait 3227 baz uzunluğundaki *MRR1* gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri..... 68
- Şekil-5.** Çalışmaya alınan 15 *C. albicans* suşunun *MRR1* gen bölgesinde dizi analizi sonucunda saptanan nükleotid değişiklikleri.....74-92
- Şekil-6.** Çalışmaya alınan 15 *C. albicans* suşunun *MRR1* gen bölgesinde dizi analizi sonucunda saptanan amino asit değişiklikleri93-99

KISALTMALAR

5-FC	: 5-Flusitozin
5-FU	: 5-Florourasil
ABC	: ATP Bağlayan Kaset
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ALS	: Aglütinin Benzeri Dizi
BEE	: Bazal Ekspresyon Elemanı
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyon
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BRE	: Benomil Yanıt Elemanı
CDR	: <i>Candida</i> İlaç Direnci
CLSI	: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
DRE	: İlaç Yanıt Elemanı
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
GOF	: Fonksiyon kazandırıcı
ITS	: “Internal Transcribed Spacer”
İK	: İnvaziv Kandidoz
KDi	: Kan Dolaşımı İnfeksiyonu
Ki-Du	: Kısmi İnhibisyon Etkisi Gösteren Duyarlı
KMK	: Kronik Mukokutanöz Kandidoz
KOH	: Potasyum Hidroksit
MDR	: Çoklu İlaç Direnci
MDRE	: “ <i>MDR1</i> Drug Resistance Element”
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MF	: Major Kolaylaştırıcılar
<i>MRR1</i>	: “Multidrug Resistance Reguator”
MTL	: “Mating Type Locus”
NBD	: Nükleotid Bağlayan Bölge
NRE	: Negatif Yanıt Elemanı
OFK	: Orofarengeal Kandidoz
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
SAP	: Salgısal Aspartik Proteinaz

SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SRE	: Steroid Yanıt Elemanı
<i>TAC1</i>	: “Transcriptional Activator of CDR Genes”
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris EDTA
TMD	: Transmembranöz Bölge
TMS	: Transmembranöz Segment
VVK	: Vulvovajinal Kandidoz
YEPD	: “Yeast Extract Peptone Dextrose”

1. ÖZET

Atılım pompalarını fazla eksprese eden flukanazol dirençli/doza bağımlı duyarlı *Candida albicans* suşlarında bu genlerin transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonların araştırılması

Dr. K.Turan Kalkandelen, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir, 2013

Günümüzde, bağışık yanıtı bozulmuş hastaların sayısı ve bu hastalarda görülen *Candida albicans* infeksiyonlarının sıklığı artmaktadır. Buna paralel olarak, yan etkisi az ve iyi tolere edilen bir antifungal olan flukonazolün kullanımında artış ve direnç görülmektedir. *C. albicans*'da en sık görülen flukonazol direnç mekanizması *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin aşırı ekspresyonu ve bu genlerin kodladığı Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 pompaları ile ilacın hücre dışına atılmasıdır. Bu genlerde görülen aşırı ekspresyona, transkripsiyon faktörleri olan Tac1p ve Mrr1p'yi eksprese eden *TAC1* ve *MRR1* genlerinde görülen nokta mutasyonların neden olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada flukonazole duyarlı altı, kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı dört ve dirençli altı adet olmak üzere toplam 17 *C.albicans* suşunun *TAC1* ve *MRR1* gen bölgelerinin polimeraz zincir tepkimesi ve dizi analizi ile mutasyonlar açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmanın sonucunda çalışılan suşlardan flukonazole dirençli olup Cdr1 ve Cdr2 pompalarını aşırı eksprese ettiği gösterilen iki tanesinde, *TAC1* geninde aşırı ekspresyona neden olduğu bildirilmiş R673Q ve A736V mutasyonları saptanmıştır. Çalışılan suşlardan flukonazole dirençli olup Mdr1 pompasını aşırı eksprese ettiği bilinen bir tanesinin *MRR1* gen bölgesinde ise yine fazla ekspresyona neden olduğu saptanmış P683H mutasyonu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamıza alınan flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında, atılım pompalarını kodlayan genlerin transkripsiyon faktörlerinde görülen nokta mutasyonlarının, flukonazol direncinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, flukonazol direnci, atılım pompaları, transkripsiyon faktörleri, *TAC1*, *MRR1*, *cdr1*, *cdr2*, *mdr1*

2. SUMMARY

Investigation of mutations in transcription factors of the efflux pump genes in efflux pump overexpressing fluconazole resistant/dose dependent susceptible *Candida albicans* strains.

Dr. K.Turan Kalkandelen, Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, 2013

In recent years, the number of immune compromised patients and the frequency of *Candida albicans* infections in these patients has been increasing. In parallel, there has been an increase in the clinical use of fluconazole, a well tolerated antifungal agent with moderate side effects, along with a rise in fluconazole resistance. The most frequent mechanism of fluconazole resistance in *C. albicans* involves overexpression of *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* genes and transportation of the drug out of the cell via Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 efflux pumps encoded by these genes. It has been shown that, the overexpression of these efflux pump genes was caused by gain of function mutations in *TAC1* and *MRR1* genes which encode the transcription factors Tac1p and Mrr1p.

This study was aimed to analyze *TAC1* and *MRR1* genes of 17 *C. albicans* strains which consist of seven fluconazole susceptible, four trailing effect showing susceptible and six fluconazole resistant isolates for gain of function mutations with polymerase chain reaction and sequence analysis.

In conclusion, two of the fluconazole resistant isolates which overexpress Cdr1 and Cdr2 pumps, revealed R673Q and A736V mutations which had been reported to cause overexpression of *TAC1* gene. Also a P683H point mutation, which was known to cause *MRR1* overexpression was detected in a fluconazole resistant strain that overexpressed the Mdr1 pump.

As a result, it can be concluded that, gain of function mutations in the transcription factors of the efflux pump genes play an important role in resistance to fluconazole in our *C. albicans* strains.

Key words: *Candida albicans*, fluconazole resistance, efflux pumps, transcription factors, *TAC1*, *MRR1*, cdr1, cdr2, mdr1

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücudunda pek çok yerde kommensal olarak yaşayan *Candida albicans*, yüzeysel mukozal infeksiyonlardan yaşamı tehdit edici sistemik infeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olan fırsatçı bir patojen olup, özellikle AIDS, kanser kemoterapisi ve organ transplantasyonu hastalarında ciddi mortalite nedenidir. Günümüzde sayısı giderek artan bu hastalarda, *Candida* infeksiyonlarının önlenmesi ve sağaltımı uzun dönem ilaç kullanımını gerektirmekte, sonuç olarak tedavide kullanılan antifungal ajanlara karşı dirençli tür ve suşların seçilmesine neden olmaktadır. Genel durumu kötü olan bu hastalarda, iyi tolere edilmesi nedeniyle sıklıkla ilk basamak ilaç olarak flukonazol kullanılmakta olup, bu ajana karşı görülen direnç, klinikte önemli bir sorun yaratmaktadır (1–6).

C. albicans'da flukonazole direnç, ilacın hücre içinde birikiminde azalma, ilacın hedefi olan 14 α -demetilaz enziminde değişim, bu enzimini kodlayan genin fazla ekspresyonu ve ergosterol biyosentezinde değişiklik mekanizmaları ile ortaya çıkmaktadır. En sık görülen direnç mekanizması olan hücre içi ilaç birikiminde azalmaya, *C. albicans*'ın sahip olduğu iki grup atılım pompasının aşırı ekspresyonu neden olmaktadır. Bunlar ATP bağlayan kaset tipindeki Cdr1 ve Cdr2 ile majör kolaylaştırıcı ailesi içinde yer alan Mdr1'dir. Araştırmalar, bu pompaların aşırı ekspresyonuna, pompaları kodlayan genlerin transkripsiyon faktörleri olan Tac1p ve Mrr1p'yi kodlayan *TAC1* ve *MRR1*'deki fonksiyon kazandırıcı tipteki nokta mutasyonlarının neden olduğunu göstermektedir (7–13).

Çalışmamızda, atılım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* veya *MDR1* genlerini fazla eksprese ettiği belirlenen flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarında, söz konusu genlerin transkripsiyon faktörlerini kodlayan *TAC1* ve *MRR1* bölgelerindeki mutasyonların polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ve dizi analizi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Candida infeksiyonuna işaret eden ilk ipuçları, milattan önce dördüncü yüzyıla, Hippocrates'e kadar gitmektedir. M.Ö. 460-370 yılları arasında yaşayan Hippocrates, ağzı tutan ve ülseratif aftlarla seyreden bir tablodan bahsetmektedir. Aynı klinik tablodan milattan sonra 129-200 yıllarında Bergama'da yaşayan Galen de bahsetmiştir. Galen, tabloyu, "ad aphthas albus" olarak tanımlamıştır. Günümüzde, yüzlerce yıl önce iki tarihi tıp insanı tarafından tanımlanan bu tablonun, ağız mukozasında *Candida* infeksiyonu sonucu gelişen pamukçuk tablosu olduğu düşünülmektedir (14,15).

Pamukçuğun İngilizcedeki karşılığı olan "thrush" kelimesi ise yazılı olarak ilk defa 1665'te, İngiliz Samuel Pepys'in günlüğünde karşımıza çıkmaktadır. Pepys, günlüğünde, ateşi, hıçkırığı ve pamukçuğu olan bir hastadan bahsetmiştir (14).

Candida infeksiyonları bu kadar eski tarihlerden beri bilinmekle beraber, yetersiz bilimsel altyapı nedeniyle, 18. yüzyıla kadar, *Candida* üzerine yapılan araştırmalardan bahsetmek mümkün değildir (14).

16. yüzyılın sonlarında Zaccharias Janssen ve oğlu Hans Janssen'in ilk ışık mikroskopunu bulması ve 17. yüzyılın sonlarında Sabouraud'un mantarların morfolojilerini belirlemeye olanak sağlayan besiyerini geliştirmesi *Candida* üzerine yapılan araştırmaların önünü açan önemli gelişmeler olmuştur (16,17).

Bu gelişmelerden sonra, 1771'de modern pediatriinin kurucusu gözüyle bakılan İsveçli tabip Nils Rosén von Rosenstein, pamukçuğun ağız mukozasıyla sınırlı kalmayan, akciğerlere yayılan invaziv bir formunu bildirmiştir (14,16).

1839'da, Bernhard von Langenbeck, tifoid ateş nedeniyle ölen bir hastanın otopsisinde, orofarinks ve özofagus mukozalarında aftlar ve psödomembranlar görmüştür. Bu lezyonlardan yaptığı mikroskopik incelemede, yoğun miktarda mantar görmüş ve günümüzde hif, yalancı hif ve blastokonidya olarak bilinen yapıları detaylı bir şekilde tanımlamıştır. Ancak Langenbeck, lezyonları ve etkeni tifoyla ilişkilendirmiştir (18).

1839 ve 1844 yılları arasında birbirinden bağımsız üç araştırmacı; Stockholm'de Fredrik Berg, Paris'te David Gruby ve Edinburgh'da John Bennett, pamukçuk etkenini bir "kriptogam" olarak tanımlamışlardır. Etkenin bir mantar olduğunu 1841 yılında ilk bulan, bu üç araştırmacıdan Fredrik Theodor Berg

olmuştur. Berg, hasta çocuktan aldığı mantarı sağlıklı çocuğa inokule ederek hastalık geliştiğini göstermiş ve hipotezini kanıtlamıştır. Berg, bulduğu mantarı, “filamentleri epitel hücreleri arasında yayılan, küf-benzeri bir mantar” şeklinde tanımlamıştır (14).

1849’da Wilkinson ağızda kine benzer bir mantar enfeksiyonunun vajinal bölgede de olabileceğini göstermiştir (14,16).

1853’te mikolog Charles Phillippe Robin, pamukçuğa neden olan bu mantarın detaylı çizimlerini ve açıklamalarını yayınlamış ve ona pamukçuk lezyonunun beyazına istinaden Latince beyaz anlamına gelen “albus” tan yola çıkarak, *Oidium albicans* adını vermiştir. Aynı mantar, 1868’de Fransız bilim insanı Charles Quinquaud tarafından, “*Syringospora robinii*” olarak adlandırılmıştır (14).

1877’de Paul Grawitz, “*Mycoderma vini*” adını verdiği aynı pamukçuk etkeni mantarı, asidik ortama ekmiş ve filamentlerden ziyade maya-benzeri hücreler oluşturduğunu görmüştür. Ürettiği kültürün başarılı olduğunu, köpekleri infekte ederek doğrulamıştır. Aynı yıl, Max Rees, bebeklerin ve yaşlı hastaların biyopsilerinden elde ettiği pamukçuk etkeni mikroorganizmayı, maya-benzeri bir mantar olarak tanımlamıştır. Organizma Grawitz’in mayası ile aynı gözükmemektedir ancak Rees ona alkolü fermante etme becerisi olduğu ve genel olarak *Saccharomyces*’lere benzediği için “*Saccharomyces albicans*” adını vermiştir. Bu iki araştırmacı, filamentöz hücrelerin yanı sıra maya-benzeri hücreler şeklinde de görülebilen *Candida albicans*’ın dimorfik yapısına dikkat çeken ilk bilim insanlarıdır (14).

Bu dimorfik yapı, farklı araştırmacıların farklı çalışmalarda bazen maya benzeri bir mantarı, bazen de filamentöz yapılı bir mantarı pamukçuk etkeni olarak izole etmelerine neden olmuştur (14).

Pamukçuğun, ekildiği besiyerine göre farklı tipte hücreler oluşturan tek bir mantar tarafından oluşturulduğu 1887’de Charles Audry tarafından belirlenmiştir. Audry, *Saccharomyces albicans*’ın jelatinli besiyerlerinde maya benzeri hücreler oluşturduğunu, buyyona ekildiğinde ise bazen filamentler yaptığını bildirmiştir (14).

Tanımlanması 200 yıllık bir süreci kapsayan pamukçuk etkeninin adlandırılmasında en önemli değişikliklerden biri 1890’da, Alman botanikçi Wilhelm Zopf tarafından yapılmıştır. Zopf, mayaya, tıp literatüründe uzun yıllar boyu kullanılacak olan “*Monilia albicans*” adını vermiştir. *Candia* hastalıkları için günümüzde halen kullanılan “moniliazis” tanımı buradan gelmektedir (14).

1895 yılında *Candida* türlerinin neden olduğu ilk beyin absesi olgusu bildirilmiş fakat 1943 yılına kadar *Candida*, serebral bir lezyondan soyutlanamamıştır (16).

1923 yılında, Hollandalı mikolog Christine Marie Berkhout, o güne kadar insanda ağız, sindirim sistemi, vulvovajinal bölge ve tırnak yatağında infeksiyonlara neden olduğu gösterilmiş olan bu mantar türünü, genellikle bitki patojeni olan ve insanları infekte etmeyen monilia sınıfından çıkarmış ve *Candida albicans* olarak isimlendirmiştir. Berkhout, "candida" kelimesini antik Roma senatörlerinin giydiği beyaz kıyafet olan "toga candida" dan esinlenerek üretmiştir. Buna rağmen monilia ismi bir süre daha kullanılmaya devam edilmiştir (14,16).

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 (19,20).

4.2. Genel Özellikler

Candida türleri, askomiçetler içinde sınıflanan, üç ila altı mikrometre boyutlarında, oval veya yuvarlak biçimli, tek hücreli, ökaryotik mikroorganizmalardır. Genellikle mitoz ile tomurcuklanarak çoğalırlar (1,21,22).

Candida glabrata dışındaki türlerde, tomurcuklanan hücrenin, ana hücreden kopmaması ve zincirler halinde uzamasıyla oluşan, filamentöz, yalancı hif yapıları görülür. Yalancı hifler, hiflerden, duvarlarının birbirine paralel olmaması ve hücrelerin birleşim noktalarında görülen boğumların varlığı ile ayrılır. *Candida albicans* gibi bazı türler hem hif hem de yalancı hif oluşturabilirler (21,22).

Türden türe farklılıklar göstermekle beraber, genel olarak Kandidalar, katı besiyerinde beyaz ya da krem renginde, yumuşak, pürüzsüz koloniler oluşturmakla beraber, *Candida krusei*'de basık ve kuru, *C.guilliermondii*'de pembe, *C. zeylanoides*'de sarımtırak koloniler görülebilmektedir. (22).

Candia türleri, klinik laboratuvarlarda en sık izole edilen mantarlardır. Bunun nedeni doğada çok yaygın olarak bulunmaları ve insanda gastrointestinal sistemde, deride ve mukoza yüzeylerinde normal flora üyesi olmalarıdır. Normal florada bulunan *Candida* türleri, bir hastalık veya tedavi girişimi nedeniyle konağın bağışıklık savunmasının bozulduğu durumlarda, fırsatçı patojenler olarak dokulara yayılmakta ve yaşamı tehdit edici infeksiyonlar oluşturmaktadır (1,21).

Candida cinsi içinde, bir kısmı tıbbi öneme sahip, yaklaşık 150 tür bulunmaktadır. Tıbbi önemi olan türler, tablo-1'de gösterilmiştir. Bu türlerin başında, tüm mantar patojenleri içinde klinik örneklerden en çok soyutlanan tür olan *Candida albicans* gelmektedir. Son yıllarda *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi türlerin neden

olduğu infeksiyonlarda artış görölmekle beraber, florada diğerlerinden daha fazla bulunan *C. albicans*, hemen hemen tüm kandidoz formlarında en sık soyutlanan tür olmaya devam etmektedir (1,21,23).

Tablo-1. Tıbbi öneme sahip *Candida* türleri ve görölme sıklıkları (21)

Sık	Daha az	Nadir
<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. famata</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. kefyr</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lipolytica</i>
	<i>C. rugosa</i>	<i>C. norvegensis</i>
	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. sake</i>
	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. zeylanoides</i>

C. albicans, insan patojeni olan *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, ve *C. guilliermondii* ile beraber ayrı bir filogenetik alt grup olan “CTG clade” içinde yer almakta ve CTG kodonunu, lösün yerine serin olarak çevirmektedir (21).

C. albicans, diğer kandidalar gibi, tomurcuklanarak çoğalır, uygun ortamlarda yalancı ve gerçek hifler oluşturur. İnfekte dokulardan hazırlanan preparatlarda bu yapılar, gram boya ile gram olumlu boyanır. Ancak maya hücrelerinin deri, ağız, vajen gibi dokulardan hazırlanan preparatlarda ve dışkı örneklerinde, normal florada bulunmaları nedeniyle, infeksiyon olmaksızın bulunabileceği unutulmamalıdır (1,22).

C. albicans, sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinde 37°C’de 24 saatte maya kokan, krem rengi, pürüzsüz koloniler oluşturur. Kanlı ve çukulata agar gibi zengin besiyerlerinde ise yıldıza bezeyen saçaklı koloniler yapar. *C. dubliniensis* ile beraber çimlenme borusu testinde pozitif sonuç verir. Mısır unlu tween 80 agarda oluşturduğu büyük, yuvarlak, kalın duvarlı, terminal klamidosporeler tanısında önemli karakteristik yapılardır (1,22).

4.3. Hücre Yapısı

C. albicans hücresi ökaryotik yapıda olup, hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, 80S ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve bir membran ile çevrili nukleus yapılarından meydana gelmektedir (24).

4.3.1. Plazma Membranı

C. albicans'ın plazma membranı, daha gelişmiş ökaryotik hayvanların hücrelerinde olduğu gibi, çift kat lipit tabakadan oluşmuştur. Yapısında, serbest yağ asitleri, glikolipidler, fosfolipidler, sfingolipidler ve steroller bulunur. Daha üst hayvanlarda olduğu gibi, membranın akışkanlığından, yapısındaki steroller sorumludur. Temel fark mantar hücre membranlarında, kolesterol yerine ergosterol bulunmasıdır. Ergosterol, *C. albicans*'ın hem maya hem de hif formunda bulunmakta olup antifungal ilaçlar için iyi bir hedef oluşturur (25).

Plazma membranı, *C. albicans*'ın hayatta kalmak için gereksinim duyduğu moleküllere karşı seçici geçirgen yapıdadır ve hücre duvarı sentezinden, sinyal iletimine kadar pek çok yaşamsal metabolik faaliyet için gerekli olan enzimlerin bulunduğu yerdir (25).

4.3.2. Hücre Duvarı

C. albicans'ın hücre duvarı, hücreyi dışarıdan saran iskeletidir. Hücreye şeklini verir ve onu konak savunmasından korur. Konak hücreye tutunmada rol oynar. Yapısının %90'ını karbonhidratlar, %10'unu proteinler oluşturur. Hücre duvar yapısındaki karbonhidratlar, üç farklı şekilde bulunur. Bunlar, mannozün bir polimeri olan mannan, birbirlerine β -1,3 ya da β -1,6 bağlarıyla bağlı, dallanmış glukoz polimeri olan β -glukan ve β -1,4 bağıyla bağlı N-asetil-D-glukozaminin dallanmamış polimeri olan kitindir (26).

C. albicans hücre duvarı bileşenlerinin kuru ağırlık olarak dağılımı, %40 mannoproteinler, %40 β -1,3 glukan, %20 β -1,6 glukan ve %1-2 oranında kitin şeklindedir. Bu kompozisyon, ortamda antifungal özellikli moleküllerin varlığı gibi çeşitli çevresel etmenlere ve hücrenin maya ya da hif formunda olmasına göre değişimler gösterebilir. Hif formundaki hücrelerin duvarındaki kitin miktarı belirgin oranda daha fazladır (26–28).

C. albicans hücre duvarının mimarisine bakıldığında iç ve dış olmak üzere iki tabakadan oluştuğu görülür (27):

Hemen hücre membranının dışında bulunan iç tabaka, 100 nm kalınlığında ve elektron saydam yapıdadır. Kitin, β -1,3 glukoz ve az miktarda hücre duvar proteininden oluşur. Kitin mikrofibrillerinin üzerine kovalent bağ ile oturmuş olan β -1,3 glukoz molekülleri, birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmış, düzensiz ama sağlam bir yapı oluşturur. Bu yapının içine serpiştirilmiş şekilde bulunan hücre duvar proteinleri, β -1,6 glukoz molekülleri ve glikozil fosfatidil inozitol (GPI) çapaları ile β -1,3 glukoz ve kitine bağlanır. Hücreye şeklini veren tabaka budur (26,27).

180 nm kalınlığındaki daha kalın dış tabaka ise elektron yoğun olup mannan ve hücre duvar proteinlerinin birleşiminden oluşan mannoproteinlerden meydana gelmiştir. Bu tabaka, hücreyi konağa ait moleküllerin saldırısından korur, antifungal ilaçların hücre içine girişini sınırlar ancak hücrenin şekli üzerine bir etkisi yoktur (26,27).

4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

C. albicans, deri, vajen, ağız ve gastrointestinal sistem mukozasında kommensal olarak bulunan, konağa ait normal flora, epitel bariyerleri ve doğal bağışıklık sistemi ile kontrol altında tutulan, bu etmenlerden bir ya da bir kaçında zafiyet geliştiği durumlarda enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir (26,29).

C. albicans'ın kommensalden, patojene dönüşmesi tek bir olay değil, detayları bugüne kadar tamamen aydınlatılmamış kompleks bir süreçtir. Sürecin ilk basamağı, kommensal yaşam için de gerekli olan adezyon, yani konak hücreye tutunmadır. Adezyon sonrasında konağa ait epitel bariyeri, doğal bağışıklık sistemi ve flora sağlıklı ise, ilişki kommensal olarak devam eder, değilse süreç patojenite yönüne ilerler; invazyon ve sonrasında doku hasarı ve bunlarla beraber yangı olaya dahil olur (26).

Candida enfeksiyonlarına zemin hazırlayan başlıca durumlar tablo-2'de gösterilmiştir.

C. albicans'ın, deri, vajen, ağız ve gastrointestinal sistem mukozası gibi, birbirinden çok farklı çevresel baskıları olan anatomik bölgelerde kommensal olarak yaşayabilmesinin ve birbirinden farklı hastalıklara yol açabilmesinin nedeni, tutunma, invazyon, doku hasarı ve oluşan yangısal yanıtla savaş sürecinin her aşamasında kendisine yardımcı olan virulans faktörlerine ve yapısal özelliklere sahip olmasıdır (26,30).

Tablo-2. *Candida* infeksiyonları için başlıca risk faktörleri (21)

<i>Candida</i> İnfeksiyonları için risk faktörleri		
Vulvovajinal Kandidoz	Oral Kandidoz	İnvaziv Kandidoz
Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı	Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı	Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı
Diyabet	Diyabet	Gastrointestinal cerrahi
Kortikosteroid tedavisi	Topikal Kortikosteroid tedavisi (Örn. İnhaler vb.)	Yanıklar
HIV infeksiyonu	HIV infeksiyonu	Parenteral beslenme
Kontrasepsiyon kullanımı	Diş protezi ve Kötü ağız hijyeni	Nötropeni
Hormon replasman tedavisi	Kanser kemoterapisi	Kanser kemoterapisi
	1 yaş altı	Organ transplantasyonu
	İleri yaş	Hastanede uzun yatış süresi
	Travma	Santral venöz kateter
		Böbrek yetmezliği

C. albicans'ın virülans faktörleri; maya-hif dönüşümü, hücre yüzeyinde adezin ve invazinlerin ekspresyonu, tigmotropizm, biyofilm oluşumu, fenotipik dönüşüm ve dış ortama salgılanan hidrolitik enzimler şeklinde sıralanabilir. *C. albicans*'ın infeksiyon oluşturmaya yardımcı olan, ancak virülans faktörleri arasında sayılmayan yapısal özellikleri ise, ortam pH'ındaki değişimlere hızlı adapte olabilme yeteneği, metabolik esnekliği, güçlü besin elde etme sistemi ve sağlam stres yanıtıdır (30,31).

4.4.1. Morfolojik Değişim

C. albicans, maya, hif, yalancı hif, çimlenme borusu ve klamidospore formlarında görülebilen polimorfik bir mikroorganizmadır. Çok hücreli, filamentöz formlar olan, yalancı hif ve hif formlarının her ikisini birden oluşturabilen iki *Candida* türünden biridir. Bu formlardan klamidospore, hasta örneklerinde görülmezken, maya, yalancı hif ve hif yapıları sıklıkla görülür ve *C. albicans*'ın patogeneğinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda in-vitro şartlarda hif oluşturamayan türlerin virülansının daha düşük olduğu gösterilmiştir (30,32).

Formlar, hücre duvar yapıları, gen ekspresyon düzeyleri, yüzey molekülleri, yayılma ve invazyon potansiyelleri açısından farklılık gösterir. Maya formu, hastalığın

yayılmasından, hif formu ise invazyonundan sorumludur. Bununla beraber, yalancı hif yapılarının rolü tam olarak anlaşılamamıştır (26,30).

Maya-hif dönüşümünü etkileyen çeşitli çevresel etmenler bildirilmiştir. Düşük pH (< 6), 30°C sıcaklık gibi şartlar *C. albicans*'ın, maya formunda gelişimini indüklerken, yüksek pH (> 7), 37°C sıcaklık, yüksek CO₂ konsantrasyonu, ortamda serum ya da N-asetilglukozaminin varlığı gibi etmenler, hif formunda gelişimi indükler (30).

Morfolojik değişimi düzenleyen diğer bir mekanizma, mikroorganizmalar arası bir tür iletişim sistemi olan "quorum sensing"dir. *C. albicans*'da başlıca "quorum sensing" molekülleri farnesol, tyrosol ve dodecanol'dür. "Quorum sensing"ın etkisi ile yüksek hücre yoğunluğu (>10⁷ hücre/ 0.1 ml), maya formunda üremeyi indüklerken, düşük hücre yoğunluğu (<10⁷ hücre/ 0.1 ml), hif oluşumunu indükler (30).

4.4.2. Adezinler

C. albicans'ın diğer *Candida*'lara, mikroorganizmalara, cansız yüzeylere ve konak hücrelere tutunmasından "adezin" adı verilen bir grup özelleşmiş hücre yüzey proteini sorumludur. *C. albicans*'ın en iyi bilinen adezinleri, aglütinin benzeri sekans (agglutinin-like sequence, ALS) protein ailesidir. Bu ailede Als1,2,3,4,5,6,7 ve Als9 olmak üzere sekiz adet ALS proteini bulunmaktadır (30).

Bu sekiz ALS proteininden, "hifle ilişkili adezin" olarak da adlandırılan Als3, *C. albicans*'ın epitel hücrelerine tutunmasında özellikle önemlidir. Yanak ve vajen epitelinin infeksiyonu sırasında ALS3 geninin ekspresyon düzeyinin arttığı, bu genin delesyona uğratıldığı mutantlarda tutunmanın %60 oranında azaldığı gösterilmiştir (30,33).

C. albicans'ın bildirilmiş diğer önemli adezinleri, Als1, Ala1, Hwp1, Int1 ve Mnt1'dir. Als3 ve Hwp1'in adezyonun yanı sıra, biyofilm oluşumunda da rol oynadığı düşünülmektedir (30,32).

4.4.3. İnvazinler

C. albicans'ın konak hücreye girişi, iki farklı yolla gerçekleşmektedir, indüklenmiş endositoz ve aktif penetrasyon. İndüklenmiş endositoz, konak hücre tarafından yönetilen bir olay olup, ölü hif yapıları dahi bu şekilde içeri alınabilmektedir. Diğer taraftan aktif penetrasyon doğrudan mantar hücresinin güdümündedir ve canlı hif yapısı gerektirir (30,34).

C. albicans, indüklenmiş endositozun gerçekleşmesi için yüzeyinde, "invazin" adı verilen bir takım özel proteinler bulundurulur. İnvazinler konak hücrelerde bulunan "E-cadherin", "N-cadherin" gibi ligandlara bağlanır ve maya hücresinin konak hücre içine alımını başlatır (30).

C.albicans'ta, iki adet invazin tanımlanmıştır, aynı zamanda bir adezin olan Als3 vs Ssa1. Ssa1 ısı şok proteini 70 (HSP70) ailesi içinde yer alan bir yüzey proteindir. Moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, Als3 ve Ssa1'in konak hücredeki "E-cadherin"e bağlandığı ve "clathrin" bağımlı mekanizmalar ile endositozu uyardığı düşünülmektedir (30).

4.4.4. Tigmotropizm

C.albicans hücresinin herhangi bir canlı ya da cansız bir yüzeye dokunmaya yanıt olarak hızla büyümesine, temasa yönelmesine tigmotropizm denir. Maya hücreleri bir yüzeye temas ettikleri zaman hif formuna dönüşür. Eğer temas edilen yüzeyin belirli bir topolojisi varsa, hifler buna uygun biçimde uzar. Katı yüzeylere temas biyofilm oluşumunu indükler. *C. albicans*'in epitel hücrelerine karşı normal virülans gösterebilmesi için tigmotropizmin gerekli olduğu fare deneylerinde gösterilmiştir (30).

4.4.5. Biyofilm Oluşumu

C. albicans'ın bir diğer önemli virülans faktörü, kateterler, protez dişler ve mukozal hücre yüzeyleri gibi canlı ve cansız yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilmesidir (30).

Biyofilm, bir yüzeye ya da birbirlerine tutunmuş, ekstrasellüler polimerik bir madde ile örtülmüş, serbest durumdaki benzerlerinden fenotipik olarak farklılık gösteren mikroorganizma topluluğudur (35).

Biyofilm oluşumu maya hücrelerinin yüzeye tutunmasıyla başlar. 2-4 saat içinde, tutunan maya hücreleri tomurcuklanarak çoğalır ve mikrokoloniler oluşturur. Tutunmadan 4-6 saat sonra bu hücrelerde filamentöz büyüme başlar ve yalancı hif ve gerçek hif yapıları oluşur. 6-8 saat içinde tutunma yüzeyi, tomurcuklanan maya hücreleri ve hiflerle örülmüş, tek katlı bir yapı ile tamamen örtülmüştür. Bu noktadan sonra biyofilm yapısının olgunlaşma süreci başlar ve 24-48 saat içinde kompleks, çok katmanlı, olgun biyofilm yapısı oluşur (36).

Olgun biyofilm, ortama planktonik hücreler yaymaya başlar ve bir rezervuar görevi görür. Bu durum, virülansa doğrudan katkıda bulunmaktadır çünkü biyofilmden salınan planktonik hücreler, ilk başta yüzeye tutunan planktonik hücrelerden çok daha virülandır (30).

Olgunlaşmış biyofilm yapısındaki hücreler, antifungallere ve konak savunmasına karşı çok daha dirençlidir. Bunun nedeni biyofilm içindeki polisakkaritten zengin ekstraselüler matriks yapısının, antifungal moleküllerin içeri geçişine izin vermemesi ve antifungal ilaçları hücre dışına taşıyan atılım pompalarının biyofilm içindeki hücrelerde, planktonik hücrelere oranla çok daha fazla eksprese edilmesidir (30).

4.4.6. Fenotipik Dönüşüm

C. albicans genel olarak kültürde pürüzsüz, beyaz ya da krem rengi koloniler oluşturmakla beraber çeşitli fenotipik değişimler gösterebilmektedir. Bu fenotipik değişimlerin en önemlisi, WO-1 suşunda gösterilen beyaz kolonilerin, opak kolonilere dönüştüğü beyaz-opak dönüşümüdür (29,32).

Beyaz-opak fenotipik değişiminde, sadece koloni morfolojisi değil, hücre morfolojisi de değişmektedir. Beyaz, pürüzsüz koloniler oluşturan yuvarlak ya da ovalimsi hücreler, gri, basık koloniler oluşturan uzamış ya da fasulye biçimli hücrelere dönüşmektedir. Bu dönüşümün *C. albicans*'ın virülansı üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılammış olmakla beraber, yüzey antijenlerinin ve biyofilm oluşturma potansiyellerinin farklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca beyaz ve opak kolonilerin deriyi kolonize etme potansiyelleri ve vajenden soyutlanma sıklıkları da farklılık göstermektedir (29,30,32).

4.4.7. Hidrolitik Enzimler

C. albicans'ın konak hücreye tutunması ve hif formuna dönüşmesini takiben, *C. albicans* hifleri, konak hücre içine girmelerini kolaylaştırdığı düşünülen çeşitli hidrolitik enzimler salgılamaktadırlar. *C. albicans*'ın dış ortama üç farklı grup hidrolitik enzim salgıladığı bildirilmiştir (30).

4.4.7.1. Proteazlar

C. albicans'ın proteazları olan salgısal aspartik proteazlar (Sap) ailesi içinde, Sap1-10 olmak üzere on adet proteinaz bulunmaktadır. Bunlardan Sap1-8 hücre

dışına salgılanmakta, Sap9 ve Sap10 ise hücre yüzeyine bağlı olarak bulunmaktadır. Sap'lar, lezyon bölgesindeki albümin, hemoglobin, kreatinin ve salgısal IgA gibi pek çok insan proteinini parçalamaktadır. Kobaylarla yapılan çalışmalarda, Sap genleri delesyona uğratılan suşlarda virülans kaybı olduğu gösterilmiştir (30,32).

4.4.7.2. Fosfolipazlar

C. albicans'ın fosfolipazları A,B,C ve D sınıfları olmak üzere 4 sınıftır. Bunlardan sadece B sınıfınının 5 üyesinin hücre dışına salgılandığı (PLB1-5) ve patojeniteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Fosfolipazlar konak hücrelerdeki gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize etmektedir. Fare modeliyle yapılan bir çalışmada, fosfolipazları daha fazla üreten suşların, daha az üreten suşlara oranla daha virülan oldukları gösterilmiştir (29,30,37).

4.4.7.3. Lipazlar

C. albicans'ın on adet lipazı vardır (LIP1-10) ve bunların da virülansa katkıda bulunduğu düşünülmektedir (30).

4.5. *C. albicans*'ın Klinik Önemi

C. albicans, pek çok farklı çevresel koşulda yaşayabilme ve gelişebilme yetisine sahip, son derece esnek bir mikroorganizmadır. Bu sayede, insan vücudunda ulaştığı hemen her bölgede çoğalmakta ve özellikle altta yatan ciddi hastalığı olan ve/veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, yüzeysel mukozal infeksiyonlardan yaşamı tehdit edici sistemik infeksiyonlara kadar çok çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (1,21).

C. albicans, vücutta en yaygın olarak mukoza yüzeylerini infekte etmektedir. Sık tutulan yerler vulvovajinal bölge ve orofarenkstir. Tüm vulvovajinal kandidoz (VVK) olgularının %90'ından *C. albicans* sorumludur. VVK, iritasyon, kaşıntı ve vajinal akıntı ile seyreder. Kadınların çoğu (yaklaşık %75'i) hayatında en az bir defa VVK geçirmekte ve bunların %8 kadarında tekrarlayan infeksiyonlar görülmektedir. VVK, diğer kandidozlardan farkı olarak, hazırlayıcı etmenlerin varlığında, bağışıklık sistemi sağlam bireylerde de görülebilmektedir (21,38).

C. albicans'ın sık tuttuğu bir diğer mukoza bölgesi orofarenkstir. *C. albicans*, normal ağız florasının önemli bir komponentidir. Altta yatan bir hastalık (örn. diabet) ya da bağışık yanıtın bozulduğu durumlarda (örn. AIDS) aşırı miktarda çoğalıp,

orofarengal kandidoza (OFK) neden olabilir. Bununla beraber takma diş kullananlar, yaşlılar ve yenidoğanlarda herhangi bir hastalık olmadan da OFK görülebilmektedir. OFK klinikte kendini birkaç farklı formda göstermektedir. En sık görülen ve “pamukçuk” olarak da bilinen psödomembranöz form, klinikte karşımıza oral mukoza üzerinde süt kesigi şeklinde bir lezyon olarak çıkmaktadır. Diğer OFK formları, kırmızı, bazen ağrılı alanlarla seyreden eritematöz tip, *Candida*'ya bağlı gelişen, yerinden oynatılamayan, beyaz epitel kalınlaşması şeklindeki *Candida* lökoplakisi ve ağız kenarında ağrılı çatlakların olduğu “anguler cheilitis”tir. Bu lezyonlar orofarenkse sınırlı kalabilecekleri gibi özofagus ve tüm gastrointestinal kanala da yayılabilmektedirler (21,39).

Hasta bireylere rahatsızlık veren ve yaşam kalitesini düşüren mukozal kandidozlar önemli klinik tablolar olmakla beraber, yaşamı tehdit eden durumlar değildirler. *C. albicans*'ın yaşamı tehdit eden infeksiyonları olan sistemik kandidoz ve kandidemi, organizma, mukozaya invaze olup epiteli geçtiği ve kan dolaşımına ulaştığı zaman ortaya çıkmaktadır. İnvaziv kandidoz (İK) olarak bilinen bu tabloda sıklıkla mayanın kaynağı endojendir ve kişinin kendi barsak florasıdır. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı floradaki bakterileri baskılarken *C.albicans*'ın aşırı çoğalmasına neden olmakta ve riski artırmaktadır. Riski artıran diğer etmenler kemoterapi, gastrointestinal cerrahi ve parenteral beslenme gibi barsak bütünlüğünü bozan ve *C. albicans*'ın kan dolaşımına girmesine zemin hazırlayan durumlardır. Daha nadir olarak ekzojen kaynaklı *C. albicans*larla da İK oluşabilmektedir. Genellikle bu duruma, mayayı kan dolaşımına doğrudan ulaştıran bir intravenöz kateter neden olur. Bir şekilde kan dolaşımına ulaşan endojen veya ekzojen *Candida* hücreleri hemen her organa yayılabilmekte ve infekte edebilmekte, tanı ve uygun tedavi olmadığında sonuçta ölüme neden olabilmektedir (21).

Candida türleri ABD'de kan dolaşımı infeksiyonlarının (KDİ) en sık dördüncü etkeni olarak saptanmaktadır. Bu olgularının %50-60'ının *C. albicans* tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. *Candida* türlerine bağlı oluşan KDİ'lerinin mortalitesinin %30-%50 arasında olduğu bildirilmiş olup, diğer mikroorganizmalar ile olan KDİ'lerden (örn. *Staphylococcus aureus*) daha yüksektir (21,38).

C. albicans'la ilgili bir diğer tablo, kronik mukokutanöz kandidozdur(KMK). KMK, ender görülen bir durum olup, T-lenfositlerin *Candida* türlerine yetersiz bir yanıtı söz konusudur. Bu hastalarda şiddetli seyreden ve sürekli bulunan

mukokutanöz *Candida* lezyonları ile beraberinde yaygın tırnak tutulumu ve vajinit vardır. Lezyonlar şekilsiz bir granüloamatöz görünüm alacak kadar irileşebilir (39).

4.6. *C. albicans* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Maya infeksiyonu kuşkusu olduğunda örneklerin alınması veya laboratuvara gönderilmesi konusunda özel işlemlere gerek yoktur. Ancak örnekler laboratuvara, iki saatten daha az bir süre içerisinde ulaştırılmalıdır. Bir gecikme olacaksa, steril olan 37°C'de, normal flora ile kontamine olma olasılığı yüksek örnekler ise 4°C'de saklanmalıdır (1).

Tanı için, infekte olan bölgeye göre değişmekle birlikte, yüzeysel lezyonlardan sürüntü ve kazıntılar, kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), doku biyopsileri, idrar, eksudalar belli başlı uygun örneklerdir (40).

4.6.1. Direk Bakı

Örnekler öncelikle direk olarak incelenmelidir. Bu amaçla gram boyama, kalkoflor beyazı ve %10-30'luk potasyum hidroksit (KOH) kullanılır (1).

Doku biyopsileri, santrifüjlenmiş sıvılar ve diğer örnekler, yalancı hif ve tomurcuklanmış maya hücreleri açısından Gram boyama ile incelenir. Deri ve tırnak kazıntıları ise bir damla %10'luk KOH ve kalkoflor beyazı ile incelenir. (40).

4.6.2. Kültür

Örneklerin mantar izolasyonu için işleme alınması, bakteri izolasyonu işlemi ile birlikte ve onun bir uzantısı şeklinde yapılır. Örnek bakteriyolojik ve fungal besiyerlerine ekilir. Sık kullanılan fungal besiyerleri Sabouraud dekstroz agar (SDA), "Mycobiotic" agar, beyin-kalp infüzyon agarın mantar formülasyonudur. Bu besiyerleri, kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler eklenerek seçici hale gelirler. Ayrıca katı besiyerlerine sikloheksimit ilavesi ile besiyerini kontamine edebilecek saprofit mantarlara karşı da seçicilik kazandırılabilir. Piyasada ticari olarak bulunan ve sürekli izleme yapan Bactec (BD Diagnostic SYstems), Bact/AlerT (BioMerieux) gibi kan kültürü sistemleri *C. albicans*'ı ve diğer pek çok *Candida* türünü, üretebilmektedir. Ancak duyarlılıkları çeşitli araştırmalarda %50 civarında, en iyi %70 olarak bildirilmektedir. Bu nedenle İK ve kandideminin saptanmasında, otomatize olmayan, lizis temelli bir kan kültür sistemi olan, lizis santrifugasyon sisteminin kullanılması önerilmiştir. Bu yöntem, kültürde mantarların üreme hızını ve

saptanma oranını %36 arttırmakla beraber, örneklerin işlemlenmesini zorlaştırmakta, maliyeti yükseltmekte ve kontaminasyonda artışa neden olmaktadır (1,41–43).

Örnekte var olması durumunda besiyerinde *C.albicans* genellikle 37°C'de 24-72 saatte ürer. Kolonileri beyaz ya da krem renginde, parlak ve maya kokuludur. *Candida* türlerinin 37°C'de üreyebilmeleri çok önemli bir özelliktir ve onları saprofitlerden ayırır (1).

Kültürde üreyen mayaların tanımlanmasında çimlenme borusu testi, en değerli ve basit testlerden biridir. Test sonucunda pozitif kabul edilecek çimlenme borusu, köken aldığı maya hücrelerinden boğumlanmadan çıkar ve çıktığı hücrenin 3-4 katı uzunluğa, yarısı kadar bir eni sahiptir. *C.albicans* üç saatin sonunda çimlenme borusu oluşturarak diğer *Candida* türlerinden ayrılır (1,44).

Testin 37°C'de dört saatten fazla tutulması diğer mayaların da bu süreden sonra çimlenmeye başlamasına neden olur. Ayrıca maya inokulumunun yoğun olması ve ortamda bakterilerin bulunması yalancı negatif sonuçlara neden olabilir (1).

C. dubliniensis'in de çimlenme borusu pozitif olduğu, öte yandan *C. albicans*'ın antifungal tedavi alan hastaların örneklerinde, %5 oranında çimlenme borusu testinde yalancı negatif olabileceği de unutulmamalıdır (44).

Tanımlamada ikinci basamak mısır unlu tween 80 agara lam kültürü yapılmasıdır. Mısır unlu tween 80 agar, *Candia* türlerinin üretilmesi ve miçelyum özelliklerine göre ayırt edilmeleri için hazırlanmış bir besiyeridir. Burada *C. albicans* oda ısısı veya 30°C'de 24-48 saatte yalancı hiflerin ucuna yerleşmiş terminal klamidosporeler ve hiflerin etrafında düzenli blastokonidya kümeleri oluşturmasıyla diğer *Candida* türlerinden ayrılır (1,44).

C. albicans'ın tanımlanmasına yardımcı olan ve sık kullanılan diğer besiyerleri kromojenik agarlardır. Özellikle CHROMagar Candida (CHROMagar Fransa), koloni özelliklerine ve renk oluşumuna dayanarak 10'dan fazla türün ayrımını yapabilmekte ve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*'nin ön identifikasyonu için kullanılmaktadır. CHROMagar kromojenik besiyerinde *C. albicans* yeşil renkli düz "s" tipi koloniler oluştururken, *C. tropicalis* agara difüze olan, mavi-gri, "s" tipi düz, *C. krusei* ise pürtüklü, açık pembe renkli koloniler oluşturur. Bununla beraber bu testte *C. albicans*'ın %2-10 arasında beyaz koloniler oluşturabildiği, bu nedenle besiyerinin sadece bir ön identifikasyon yöntemi olarak kullanılmasının uygun olduğu vurgulanmıştır (1,39).

Soyutlanan mayaların identifikasyonunda kullanılan diğer testler, şeker asimilasyon, şeker fermentasyon, fenol oksidaz, üreaz ve hızlı trehaloz testleri gibi metabolik testler ve moleküler yöntemlerdir (1).

Şeker asimilasyon testlerinde, mayanın oksijen varlığında belirli bir şekeri tek karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığı incelenir. *C. albicans*, glikoz, maltoz ve galaktozu iyi, ksiloz ve trehalozu kısmen ya da zayıf asimile eder. Günümüzde API 20C AUX ve API ID32C(BioMerieux) gibi şeker asimilasyon tabanlı ticari sistemler rutin kullanım için mevcuttur (1).

Şeker fermentasyon testlerinde, mayanın oksijen yokluğunda belirli bir şekeri fermente ederek karbon dioksit ve alkol oluşturup oluşturmadığı izlenir. *C. albicans*, glukoz ve maltozu güçlü, galaktoz ve trehalozu zayıf fermente eder. Şeker fermentasyon testleri günümüzde rutin laboratuvarlarda nadiren kullanılmaktadır (1).

Mayanın ortamdaki üreyi parçalayıp amonyak oluşturup oluşturmadığının incelendiği üreaz testi *Candidalar* dışındaki mayaların ayırımında daha yararlıdır çünkü *C. albicans* dahil, *Candida* türlerinin çoğu üreaz negatiftir (1).

Hızlı trehaloz testi ise üç saat gibi kısa bir sürede *C. glabrata*'nın ön identifikasyonunu sağlayan, trehalozun hızlı asimilasyonuna dayalı bir testtir. Ancak sıklıkla yalancı pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu test *C. albicans* için negatiftir (1).

Kültürde üretilen mantarların identifikasyonu PZT, dizi analizi, nükleik asit hibridizasyon "probe"ları gibi moleküler yöntemlerle DNA'larında bulunan ve tür düzeyinde farklılıklar gösteren gen bölgeleri incelenerek de yapılabilir. *Candida* türlerinde bu amaçla en yaygın kullanılan DNA bölgeleri, ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan "internal transcribed spacer" (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P450 lanosterol alfa-demetilaz (L1A1), salgısal aspartik proteinaz (SAP), aktin, kitin sentaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleridir (45).

4.6.3. Serolojik Yöntemler

Özellikle yüksek mortaliteyle seyreden İK olguları, araştırmacıları baştan beri sonuç vermesi uzun süren ve duyarlılığı düşük olan (%30-50) kültüre alternatif tanısal yöntemler aramaya itmiştir. Bu bağlamda özellikle serolojik yöntemlere yönelinmiş, antikor, antijen ya da her ikisini birden arayan testler geliştirilmeye çalışılmıştır. Ne var ki *C. albicans*'ın (ve diğer *Candida* türlerinin) normal floralarda yaygın olarak bulunması, özellikle antikor bazlı testlerin anlamını büyük ölçüde

azaltmıştır. Sadece antikor pozitifliği ile kolonizasyon-infeksiyon ayrımı yapılamamaktadır. Antikor titrelerinde üç haftada dört katlık artış infeksiyon lehine anlamlı olmakla beraber, bu durumda da gereksinim duyulan erken tanı ortadan kalkmaktadır. Bu noktada mikroorganizmaya ait antijenlerin direk gösterildiği antijen testleri daha önem kazanmıştır (44,46,47).

Yapılan çalışmalarda *C. albicans*'ın tanısında kullanılmak üzere çeşitli antijenler ve *C. albicans* metabolitleri kullanılmıştır. Bunların kayde değer olanları, hücre duvar yapısında bulunan 1,3-β-D-glukan, mannan ve arabinotoldür. 1,3-β-D-glukan, *Candida* türlerine özgül olmadığı için vücutta bir mantar infeksiyonu olduğunu gösterse bile bunun hangi mantar ile olduğu hakkında fikir vermemektedir. Bu nedenle yine hücre duvar yapısında bulunan mannan, İK tanısında ön plana çıkmaktadır. Mannan, *Candida* infeksiyonları sırasında kan dolaşımına çıkan önemli bir antijendir. Ancak mannan, serumdan anti-mannan antikorları ile hızla temizlendiği için ancak bu antikorların yokluğunda saptanabilmektedir. Güncel eğilim, mannan antijeninin, anti-mannan antikorları ile beraber saptanması ve değerlendirilmesi yönündedir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda, İK tanısında her iki testin de birlikte çalışılması durumunda duyarlılık ve özgüllük oranları %83 ve %86 şeklindedir (39,47).

Diğer bir antijen olarak serumda *C. albicans*'a ait bir metabolit olan D-arabinitol'ün saptanması, hematojen yayılan kandidozun bir göstergesi olabilmektedir. Ancak ticari bir testin bulunmaması ve duyarlılık ile özgüllüğün de değişiklikler göstermesi nedeniyle tanı amaçlı kullanımı günümüzde belirsizliğini korumaktadır (39).

Sonuç olarak günümüzde *C. albicans* tanısında altın standart halen kültür olup, buna alternatif bir serolojik yöntem bulunmamaktadır. Kültür negatif hastalarda 1,3-β-D-glukan ve mannan gibi antijenler saptanması çok yararlı olmakla beraber tek başına kullanılmamaları, ancak destekleyici-yardımcı yöntemler olarak kullanılmalrı gerekmektedir (47).

4.6.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, mikroorganizmaya ait genetik materyali PZT ile çoğaltıp sekanslamayı, ya da komplementer bir nükleik asit hibridizasyon "probe"u kullanarak varlığını göstermeyi hedefleyen yöntemlerdir. Teknolojik ilerlemelere paralel olarak günümüzde bu yöntemler son derece popüler olmuş, pek çok mikroorganizmanın

tanısında altın standart yöntemlere, özgüllüğü, duyarlılığı yüksek, hızlı alternatifler oluşturmuşlardır. *C. albicans*'ın moleküler tanısı için standardize edilmiş, geçerli bir ticari moleküler yöntem bulunmamakla beraber, literatürde umut vaad eden pek çok farklı araştırma ve yayına rastlanmaktadır (45,48).

Az miktarda patojene ait DNA'nın bile çoğaltılıp saptanabilmesi, kültürde olduğu gibi canlı mikroorganizma varlığına ihtiyaç duyulmaması, bağışıklık sistemi tarafından parçalanmış hücrelere ait DNA parçalarının dahi saptanarak tanıya gidilebilmesi, bu yöntemlerin avantajlarıdır. Diğer bir avantaj, birden fazla türle meydana gelen ve bir türün diğerini baskılaması nedeniyle, kültürde saptanması her zaman kolay olmayan infeksiyonların, multipleks PZT gibi yöntemler ile belirlenebilmesidir (48).

C. albicans'ın moleküler yöntemlerle tanısında karşılaşılan başlıca güçlüklerden biri, bu yöntemlerle kolonizasyon ve infeksiyon ayrımının yapılamamasıdır. *Candida* türleri mukozalarda kommensal olarak bulunduğu, mukoza ve solunum yolu örneklerinde tek başına *Candida* DNA'sının gösterilmesi tanı koydurucu olmamaktadır. İK ve kandidemi tablolarında ise kan ya da serumda mayaya ait DNA'nın gösterilmesi tanıda faydalıdır. Yapılan bir çalışmada, nötropenik olmayan hastalar için serumun, tam kandan daha duyarlı bir örnek olduğu bildirilmiştir. Serum ve kan örneklerinde *Candida* türlerine ait DNA'nın gerçek zamanlı PZT yöntemi ile arandığı altı farklı çalışma bulgularının derlendiği bir yayında, duyarlılığın %100-77, özgüllüğün ise %100-66 arasında olduğu bildirilmiştir. 54 çalışmanın dahil edildiği bir sistematik derlemede ise İK olgularında PZT'nin duyarlılığı ve özgüllüğünün, kanıtlanmış ya da olası İK olgularında %100 olduğu, şüpheli İK olgularında ise sırasıyla %95 ve %92 olduğu belirtilmiş ve *Candida* türlerinin erken tanısında PZT'nin faydalı bir yöntem olduğunun altı çizilmiştir (48–51).

Günümüzde *C. albicans* tanısında moleküler yöntemlerle ilgili önemli sorun, farklı merkezlerde protokoller arasında bir standardizasyon olmamasıdır. Uygun örnek türü ve miktarından çoğaltılacak gen bölgesine kadar uygulamalar çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca bu yöntemleri uygulamak için eğitimli personele ve belirli bir laboratuvar alt yapısına gereksinim vardır. Yüz güldürücü sonuçlar vereceği düşünülen bu yöntemlerin rutin laboratuvarlarda tanı amaçlı kullanılmaya başlanabilmesi için halen standardizasyon ve geniş çaplı geçerlilik çalışmalarına gereksinim söz konusudur (48,50).

4.7. *Candida* İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları

4.7.1. Polyenler

Bu grupta amfoterisin B ve nistatin yer alır. Amfoterisin B sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılırken, nistatin sadece topikal olarak uygulanabilmektedir (52).

4.7.1.1. Amfoterisin B

Amfoterisin B, polyen makrolid grubu bir antifungal olup, *Streptomyces nodosus*'un bir metabolitidir. Yapısında hidrofilik bir polihidroksil zinciri ile lipofilik bir polyen hidrokarbon zinciri içeren amfoterik bir bileşiktir. Yedi adet konjuge olmuş çift bağ içerir ve ısı, ışık ve uç pH değerlerinde bozulabilir. Suda iyi çözünmez ve oral yolla ya da kas içine uygulandığında emilim göstermez. Karaciğer, dalak, böbrek, kemik iliği ve akciğer de dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlara geniş çapta dağılım gösterir. BOS'a geçişi sınırlıdır ve bu nedenle bazı santral sinir sistemi infeksiyonlarının tedavisinde intratekal yolla uygulanması gerekir (40,52,53).

Ticari olarak mevcut olan parenteral amfoterisin B formülasyonu amfoterisin deoksikolattır. Bu bileşiğin çok nefrotoksik olması nedeniyle, amfoterisin B'nin lipid formülasyonları geliştirilmiştir. Klinik kullanımda olan bu formülasyonlar, lipozomal amfoterisin B, amfoterisin B lipid kompleks ve amfoterisin B koloidal dispersiyondur. Bu lipid formülasyonlarının etkinlik açısından konvansiyonel amfoterisin B'ye üstünlüğü yoktur ve çok daha pahalıdır (52,53).

Amfoterisin B ve lipid formülasyonları asıl etkisini mantar hücre membranının yapısında bulunan başlıca sterol olan ergosterole bağlanarak gösterir. Mantar membranının yapısına giren sekiz ile on polyen molekülü, aköz porler oluşturacak şekilde dizilir. Sonuç, proton, potasyum, magnezyum, şeker vb gibi yaşamsal öneme sahip sitoplazma içeriğinin, bu porlar aracılığıyla hücre dışına kaybı ve mantar hücresinin ölümüdür. Amfoterisin B'nin antifungal aktivitesini arttıran ikincil bir etkisi ise mantar hücre membranında oksidatif hasar oluşturmalarıdır (8,52,53).

Amfoterisin B'nin, arasında *C.albicans* ve diğer *Candida* türlerinin de bulunduğu geniş bir etki spektrumu vardır. *C. neoformans*, *Aspergillus* türleri, zigomiçetler, ve endemik dimorfik patojenler bu spektruma dahildir. Ciddi sistemik mikozlarda en etkili ilaç olduğu bildirilmiştir (40,53).

Amfoterisin B, ergosterolden daha düşük afinite ile memeli hücresinin temel membran sterolu olan kolesterole de bağlanır. Amfoterisin B nin toksik yan etkilerinin çoğundan bu bağlanma sorumludur. Bu mekanizma ile gelişen başlıca yan etki nefrotoksitedir. Bunun dışında, amfoterisin B tedavisi sırasında ateş, titreme, myalji, hipotansiyon ve bronkospazm gibi akut yan etkiler ve tromboflebit gelişebilmektedir. Tedavi sürecinde akut yan etkilere tolerans gelişir (40,53).

30 yılı aşkın bir süredir kullanılmalarına rağmen, polyenlere karşı direnç tüm mantar türlerinin yanı sıra *C. albicans* ve diğer *Candida* türleri arasında da nadirdir. Bununla beraber *C. lusitanae*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* izolatlarında amfoterisin B'ye karşı azalmış duyarlılık bildirilmiştir. Bu türler arasında görülen amfoterisin B direncinin büyük kısmı tedavi sırasında gelişen sekonder direnç olup, primer direnç daha nadirdir ve bazı *C. lusitanae* suşlarında bildirilmiştir (8,9,53).

Amfoterisin B'ye direnç mekanizmaları çok net olmamakla beraber, mantar hücre membranında ergosterol miktarının azalması ile ilişkilidir. Bunun yanında fosfolipidlerin yapısının bozulması, membrandaki sterol/fosfolipid oranının değişmesi de dirence yol açmaktadır. Ergosterol sentezinde rol alan *ERG3* geninde görülen bir defektin ergosterol yerine, polyenlere bağlanmayan diğer bazı sterollerin hücre membranında yer almasına ve ilaca azalmış duyarlılığa neden olduğu gösterilmiştir (8,53).

4.7.1.2. Nistatin

Nistatin, parenteral verildiğinde çok toksik olan ve bu nedenle günümüzde sadece topikal olarak kullanılabilen diğer bir polyendir. Ağız ve vajinanın lokal kandidozlarının tedavisinde kullanılır (40).

4.7.2. Azol Türevleri

Azol bileşikleri, 14 α -demetilaz (sitokrom p450 lanosterol demetilaz) enzimi ve daha az olarak da sitokrom p450 sterol Δ^{22} -desaturaz üzerinden, mantar hücre membranında bulunan asıl sterol olan ergosterolün biyosentezini inhibe ederek antifungal etki gösteren bileşiklerdir. Bu enzimler lanosterolün ergosterole dönüşümünde rol alır ve inhibisyonu mantar hücresinde membran sentezini bozar. Azoller, genel anlamda fungistatik etki gösteren ve kısmen üreme inhibisyonu yapabilen bileşiklerdir (52,53).

Azol türevleri, yapısal olarak farklılık gösteren iki nitrojenli bir azol halkası içeren imidazoller ve üç nitrojenli bir azol halkası içeren triazoller olmak üzere iki gruptan oluşur (52).

4.7.2.1. İmidazoller

Belli başlı imidazoller, ketokonazol, mikonazol ve klotrimazoldür. Genel olarak imidazoller, mukozal veya deri infeksiyonlarında topikal olarak kullanılır ve sadece ketokonazolün sistemik etkinliği vardır (13,53).

Ketokonazol, sistemik mikoz, dermatofitoz, ve kutanöz kandidoz tedavisinde kullanılan lipofilik bir antifungaldir. Oral yoldan emilimi vardır ancak emilebilmesi için gastrik pH'ın asidik olması gereklidir. Lipofilik özelliği, yağlı dokularda ve pürülan eksudalarda yayılmasını ve birikmesini sağlar ancak proteinlere yüksek oranda bağlandığı için, santral sinir sistemine geçişi zayıftır. Etkinliği triazol grubu antifungal ilaçlara göre daha az olmasına rağmen, etki spektrumu içinde endemik dimorfik patojenler, *Candida* türleri, *C. neoformans* ve *Malassezia* türleri yer alır. Diğer azollere dirençli *Candida* suşlarının bazılarında ketokonazole çapraz direnç görülebilmektedir (52,53).

Ketokonazol tedavisi sırasında hepatotoksisite, gastrik toksisite, testosteron ve kortizol düzeylerinde düşme, bulantı, kusma, fotosensitivite, kaşıntı ve döküntü ortaya çıkabilmektedir. Bu yan etkileri nedeniyle ketokonazol günümüzde sistemik olarak nadiren kullanılan bir antifungaldir. Yerini daha az toksik ve daha etkili olan triazollere ve diğer ilaçlara bırakmıştır (40,52,53).

4.7.2.2. Triazoller

Mukozal ve sistemik kandidozların tedavisinde kullanılan triazoller, flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve posakonazoldür. Bunlardan vorikonazol, itrakonazol ve posakonazol filamentöz mantarlara karşı da etkin iken, flukonazolün etkinliği büyük oranda mayalar ile sınırlıdır (13).

Flukonazol, özellikle kandidoz tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antifungaldir. Suda iyi çözünen bir bileşiktir. Hem oral hem de intravenöz formunun olması, hepatik, gastrik ve endokrinolojik yan etkilere düşük oranda yol açması ve BOS'a iyi geçmesi başlıca avantajlarıdır. Flukonazol tedavisine bağlı yan etkiler nadirdir ve allerjik reaksiyonlar, anjiyoödem, trombositopeni ve alopesi şeklinde olabilir (52,53).

Flukonazol birçok *Candida* türüne ve *C. neoformans*'a karşı etkilidir. Bununla beraber *C. krusei*, flukonazole doğal dirençlidir ve *C. glabrata*'nın flukonazol yanıtı ise değişkendir. Bu mantarda genel olarak azalmış bir duyarlılık söz konusudur. Bazı suşlarda doza bağlı duyarlılık vardır ve bunlar yüksek doz flukonazol ile tedavi edilebilir. *C. glabrata* suşlarının %15 kadarında ise flukonazole karşı gerçek direnç söz konusudur. *Candida* türlerinden *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* ve *C. zeylanoides* de ise flukonazole düşük duyarlılık bildirilmektedir. 41 farklı ülkeden 10.5 yılda toplanan örneklerle yapılan ARTEMIS DISK çalışmasında, *C. rugosa*'nın %41.8, *C. famata*'nın %10.3 *C. inconspicua*'nın %53.2, *C. norvegensis*'in %40.7 *C. lipolytica*'nın %28.5 ve *C. zeylanoides*'in %24.3 oranında flukonazole dirençli olduğu belirlenmiştir (52–55).

Nadir olmakla beraber, *C. albicans*'ta da flukonazol direnci görülebilmektedir. Yoğun bakım ve AIDS hastaları ile yapılan çalışmalarda, uzun süren flukonazol tedavisi sonucunda, *C. albicans* suşlarında direnç geliştiği gözlenmiştir. Uzun tedavi sürelerinin, dirençli suşların seçilmesine neden olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar *C. albicans* suşlarında flukonazol direncinin %1.0-2.3 civarında görüldüğünü bildirmektedir (3,8,9,52,55–57).

C. albicans suşlarında flukonazol direnci gelişiminden sorumlu dört mekanizma bildirilmiştir. Bunlar, ilacın hücre içinde birikiminde azalma, ilacın hedefi olan lanosterol demetilaz enziminde değişim, ilacın hedefi olan enzimi sentezleyen *ERG11* geninde fazla ekspresyon ve ilacın bloke ettiği metabolik yollara alternatif metabolik yolların kullanılması olarak sıralanabilir. İlacın hücre içinde birikiminde azalma ya ilacın hücre içine alımında bozukluk ya da ilacın aktif pompalar ile dışarı atılmasıyla gerçekleşmektedir. İlacın hücre içine alımında bozukluk, membran sterollerindeki ve/veya fosfolipidlerindeki değişim nedeniyle permeabilitenin azalması sonucu ortaya çıkar. Bu durum bazı *C. albicans* suşlarında gösterilmiştir. Başta flukonazol olmak üzere azoller, daha çok pasif difüzyon ile hücre içine alındığından, ilacın aktif pompalar ile hücre dışına atılmasının esas baskın mekanizma olduğu bildirilmiştir. Dirençli bir suшта, bu mekanizmalardan biri veya birden fazlası aynı anda etkin olabilmektedir. Birden fazla mekanizmanın söz konusu olduğu durumlarda, basamak tarzı bir direnç izlenmektedir (7–9).

C. albicans'da, flukonazolü hücre dışına atan iki farklı grup atılım pompası bildirilmiştir. Bunlar ATP bağlayan kaset taşıyıcılar (ABC) ve majör kolaylaştırıcılarıdır (MF) (13,52).

ABC taşıyıcılar aktif transport pompaları olup, iki adet hidrofilik transmembranöz bölge (TMD) ve iki adet sitoplazmik nükleotid bağlayan bölge (NBD) den oluşmaktadır. TMD'ler tipik olarak, 12 adet transmembranöz segmentten (TMS) meydana gelmektedir. Substratların membranın bir tarafından diğer tarafına taşınması için gereken enerji ATP'nin NBD'ler tarafından hidrolizi ile elde edilir. ABC taşıyıcıların görevi azol molekülleri gibi hücre için toksik etkili hidrofobik ve/veya lipofilik maddeleri hücre dışına atmaktır (12,13).

C. albicans, bünyesinde flukonazol direncinde rol oynayan iki tane ABC taşıyıcı tipinde atılım pompasına sahiptir, bunlar "Candida drug resistance 1"(Cdr1) ve Cdr2'dir. Uzun süre antifungal tedavi alan hastalardan soyutlanmış birçok suşta belirlenen flukonazol direncinden, bu pompaların aşırı ekspresyonunun sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bunlardan Cdr1'i kodlayan *CDR1* geni, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol gibi azollerin yanı sıra terbinafin, amorolfın, sikloheksimit, brefeldin A ve flufenazin gibi moleküllerin de hücre dışına atılmasında rol alan bir çoklu ilaç direnci (MDR) genidir. *C. albicans*'da, *CDR1* geninin her iki allelinin birden kayba uğratılması, hücre içi flukonazol konsantrasyonunun -yukarıda sayılan diğer moleküllerle beraber- artması ile sonuçlanmaktadır. Araştırmalar, klinik izolatlarda görülen azol direncine *CDR2*'ye oranla *CDR1*'in daha fazla katkıda bulunduğunu göstermiştir. *C. albicans*'da var olduğu gösterilen diğer 26 ABC taşıyıcının ise azol direncindeki rolü gösterilmemiştir (12,13).

CDR1 ve *CDR2*'nin regülasyonu, bu genlerin promoter bölgeleri üzerinden yapılmaktadır. *CDR1*'in promoteri üzerinde bugüne kadar, bazal ekspresyondan sorumlu bazal ekspresyon elemanı (BEE), flufenazin ve östradiol'e yanıtan sorumlu ilaca yanıt elemanı (DRE), steroid hormonlara yanıtan sorumlu steroide yanıt elemanı (SRE) ve negatif regülatuar eleman (NRE) olmak üzere dört ekspresyon elemanı saptanmıştır. BEE ve DRE'nin *CDR1* promoter bölgesinden delesyonu, bazal *CDR1* ekspresyonunu ve ilaca yanıtla bağlı ekspresyonu azaltırken, NRE'nin delesyonu, bazal ekspresyonda artışa neden olmaktadır. *CDR2*'nin promoter bölgesinde bu ekspresyon elemanlarından sadece DRE yer almaktadır (13).

Araştırmalarda DRE'nin, *CDR1* ve *CDR2*'nin fazla eksprese olduğu azol dirençli klinik suşlarda direnç gelişiminde rol oynadığı anlaşılmış ve bunun moleküler mekanizması araştırıldığında "mating type locus" (MTL) yakınında bu bölgeyi tanıyan ve çinko parmak motifleri içeren 2946 baz uzunluğunda bir gen bölgesi bulunmuştur. Bu bölgenin azollere duyarlı bir suşta delesyona uğratılmasının, suşu

daha da duyarlı hale getirdiği, dirençli bir suşta delesyona uğratılmasının ise direncin kaybolmasına neden olduğu gösterilmiş ve bu gen bölgesine *CDR*'nin transkripsiyonel aktivatörü (*Tac1*) adı verilmiştir (13,58).

Tac1, steroidlerin ve bazı toksik kimyasalların varlığında, atılım pompası genlerinin promoter bölgelerindeki DRE'ye doğrudan bağlanarak ekspresyonlarını indükleyen, Zn_2Cys_6 ailesine üye bir transkripsiyon faktörüdür (13,58).

TAC1 geninin azol direncindeki rolünü ortaya çıkarmaya yönelik olarak yapılan çalışmalarda, azol duyarlı ve dirençli *C. albicans* suşlarının *TAC1* bölgeleri ayrı ayrı sekanslanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu şekilde 17 farklı pozisyonda 23 adet fonksiyon kazandırıcı özellikte (GOF) nokta mutasyon saptanmıştır. *C. albicans*'da flukonazol direncine neden olduğu gösterilen bu *TAC1* GOF nokta mutasyonları S108N, T225A, W239L, P276L, S290C, E461K, R673Q, R693K, A736C, A736V, A736T, N740D, N740S, H741Y, I794V, E841G, N972D, N972S, N972I, F973S, N977D, G980E VE G980W'dir (13,59,60).

C. albicans'da, flukonazolü hücre dışına atan ikinci atılım pompası ailesi ise MF taşıyıcılarıdır. MF taşıyıcılar, plazma membranında bir kanal oluşturacak şekilde bir araya gelip membran boyunca uzanan 12-14 adet TMS'ten oluşur. Moleküllerin bu pompalarla taşınması ATP gerektirmez ve pompada NBD bulunmaz. Taşıma işlemi için proton gradientinden faydalanılır. MF taşıyıcılar, molekülleri genellikle antiport yolu ile taşır. Protonlar hücreye girer ve küçük moleküller hücreden uzaklaştırılır (12,13).

C. albicans'ın flukonazol direncine katkıda bulunduğu gösterilmiş bir adet MF taşıyıcı tipi atılım pompası geni bulunmaktadır ve bu "multidrug resistance" (*MDR1*) dir. *MDR1*, daha önceleri, benomil direncinden sorumlu olduğu için *BEN* olarak adlandırılmıştır. *MDR1*, benomil, metotreksat, sikloheksimit, benzotriazol, 4-NQO, serülenin, ve brefeldin A gibi çeşitli bileşiklere karşı dirençte de rol oynayan bir çoklu ilaç direnci genidir (12,13).

MDR1'i aşırı eksprese eden klinik *C. albicans* izolatları, flukonazole ve yukarıda sayılan diğer bileşiklere daha fazla dirençlidir. Bununla beraber *CDR* genlerinin aşırı ekspresyonundan farklı olarak, *MDR1*'in aşırı ekspresyonu, sadece flukonazol direnciyle ilişkili olup diğer azollere karşı çapraz dirence neden olmamaktadır (13,57).

MDR1'in regülasyonunu aydınlatmak üzere farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, *MDR1*'in promoter bölgesi üzerinde fonksiyonel bir bölge

saptanmış ve *MDR1* ilaca yanıt elemanı (MDRE) olarak adlandırılmıştır. Flukonazol dirençli izolatlarda, bu bölgenin yapısal olarak aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Bölge aynı zamanda benomile bağlı indüklenebilir yanıtın ortaya çıkabilmesi için de gerekli olduğu için başka araştırmacılar tarafından da benomil yanıt elemanı (BRE) olarak adlandırılmıştır. Sonraki çalışmalarda *C. albicans* genomunda promoterdeki bu bölgeyi (MDRE/BRE) tanıyan transkripsiyon faktörleri aranmıştır. Sonuç olarak *MDR1* aşırı eksprese eden *C. albicans* suşlarında, inaktive edildiğinde organizmanın bu özelliğine son veren bir bölge gösterilmiş ve “multidrug resistance regulator” (Mrr1) olarak adlandırılmıştır. Tac1 gibi, Mrr1 de Zn₂Cys₆ çinko parmak motifleri içermektedir. Flukonazol dirençli bir suшта *MRR1*'in inaktivasyonu, direncin kaybına ve pompayı indükleyen diğer moleküllere yanıtızlığa neden olmaktadır. Gen bankasında bulunan çeşitli *C. albicans* suşlarına ait *MRR1* genleri 3327, 3339 ve 3375 baz uzunluktadır (13,61).

Yapılan araştırmalarda *MDR1*'in transkripsiyon faktörünü kodlayan *MRR1* geninde atılım pompasının aşırı ekspresyonuna ve flukonazol direncine neden olan 13 pozisyonda 14 adet GOF mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlar K335N, Q350L, T360I, T381I, P683H, P683S, N803D, R873T, G878E, A880E, W893R, T896I, G997V ve L998F'tir (13,62).

C. albicans'da sık görülen diğer bir flukonazol direnç mekanizması, ilacın hedefi olan lanosterol demetilaz enziminde değişimdir. Flukonazole dirençli *C. albicans* izolatlarından yapılan incelemede, lanosterol demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* geninde 110 civarında farklı nokta mutasyonu saptanmıştır. Ne var ki birden fazla mutasyon sıklıkla beraber bulunduğu için, gelişen direnç üzerine bu mutasyonların tek tek katkıları bilinmemektedir. Mutasyonlar, sentezlenen enzimde amino asit değişikliklerine ve sonuç olarak azalmış ya da sıfır ilaç afinitesine ve flukonazol direncine neden olmaktadır. Benzer bir şekilde *C. krusei*'de görülen intrinsik flukonazol direnci, sahip olduğu enzimin flukonazol afinitesinin düşük olmasına bağlanmaktadır. Lanosterol demetilaz enziminde değişikliğe neden olan diğer mekanizmalar *ERG11*'in fazla ekspresyonuna yol açan gen amplifikasyonu ve gen konversiyonu veya mitotik rekombinasyondur. Fazla ekspresyona yol açan gen amplifikasyonunun, *C. albicans*'da *ERG11* geni, MTL “mating” lokusu ve *TAC1*'i içeren 5. kromozomun sol kolunda bir izokromozom oluşmasıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Kromozom duplikasyonuna bağlı olarak oluşmuş gen amplifikasyonu azol dirençli bir *C. glabrata* suşunda izlenmiştir. Gen konversiyonu veya mitotik

rekombinasyon açısından iki grup araştırıcının, suşların direnç geliştirdiğinde *ERG11*'in allelik sekanslarında değişiklikler saptadığı bildirilmiştir. İki araştırmada da mutasyonun önce *ERG11*'in bir allelinde olduğu ve bunun *ERG11*'de heterozigot olan bir suşa yol ağtığı izlenmiştir. Daha sonra rastgele gen konversiyonu veya mitotik rekombinasyonun mutasyonu ikinci allele de kopyaladığı ve sonuğa *ERG11* geninin iki allelinde de mutasyon olarak, heterozigotluğun kaybolduğu bildirilmiştir. Bu homozigot suşlar, hücreler sadece dirençli Erg11 eksprese etmesi nedeniyle daha sonra ilaç basıncı altında seğilmektedir (13,57).

C. albicans'da flukonazol direncine neden olduğu düşünülen bir başka mekanizma, *ERG11* geninin fazla ekspresyonudur. Bu yolla organizma hücre içindeki lanosterol demetilaz konsantrasyonunu standart tedavi dozlarında flukonazol moleküllerine üstün gelecek şekilde arttırmakta ve metabolik faaliyetine devam etmektedir. Bu mekanizmanın özellikle bir üstteki mekanizma ile beraber olması ciddi tedavi sıkıntlarına yol açmaktadır. Ancak bu durumun *Candida* türlerinde görülen direncin az bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir çünkü bugüne kadar bu yolla lanosterol demetilaz enzimi miktarında ancak küçük artışlar tanımlanmıştır (8,9,57).

C. albicans'da bildirilen son flukonazol direnç mekanizması, alternatif metabolik yollar kullanılarak flukonazol tarafından bloke edilen metabolik yolağın değiştirilmesidir. Normalde azoller vasıtasıyla *ERG11*'in durdurulması sonucu, yolağın daha ilerisindeki enzimler tarafından toksik bileşenlere çevrilecek olan 14 α -metillenmiş metabolitler birikmekteyken, *ERG3*'ün mutasyona uğradığı ve çalışmadığı bu özel durumda, bir takım ara steroller sentezlenmekte ama C5 desaturaz enzimi çalışmadığı için, toksik son metabolitler oluşmamaktadır. Sonuğa hücre membranına 14 α -metilfekosterol gitmekte ve ergosterolün yerini alarak hücre canlılığını sürdürmektedir. Bu şekilde direnç gelişen bir maya hücresi, tüm azollere dirençli olmaktadır. Bu mekanizma, nadir olmakla beraber bazı dirençli *C. albicans* suşlarında gösterilmiştir (9,63,64).

Bir diğer triazol olan itrakonazol, flukonazolden lipofilik olmasıyla ayrılır. Bu özelliği sayesinde yağ dokuya ve pürülan eksudalara iyi geçerken, BOS'a geçişi kısıtlıdır. Oral ve intravenöz formları vardır. Etki spektrumu içinde *Candida* türleri ve *C. neoformans*'ın yanı sıra, *Aspergillus* türleri, dermatofitler, esmer küfler ve endemik dimorfik etkenler yer alır. Flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarının hepsine olmasa da bir kısmına karşı etkilidir. Mayalara karşı fungistatik

etki gösterirken *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal etkilidir. Ancak zigomiçetler ve *Fusarium* türlerine karşı etkili değildir. Dermatofit infeksiyonlarında ve onikomikozda sıklıkla topikal olarak kullanılmaktadır. Yan etkileri flukonazole benzemekle beraber, ilaç etkileşimleri sık görülür (52,53).

Vorikonazol, geniş spektrumlu yeni bir triazoldür ve *Candida* türleri, *C. neoformans*, *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Fusarium* türleri, esmer mantarlar ve endemik dimorfik patojenlere karşı etkilidir. Vorikonazol, *Candida* türleri arasında, *C. krusei*'ye ve flukonazole düşük duyarlılık sergileyen *C. albicans* ve *C. glabrata* kökenlerinin bazılarına karşı etkilidir. Vorikonazole karşı azalmış duyarlılık, *C. rugosa*, *C. lipolytica* ve *C. zeylanoides*'de bildirilmiştir. ARTEMIS DISK çalışmasında *C. rugosa*'nın %21.2, *C. lipolytica*'nın ise %14.1 oranında vorikonazole dirençli olduğu bulunmuştur. Vorikonazolün zigomiçetlere karşı hiçbir etkisi olmamakla beraber, *A. terreus* ve *P. boydii* gibi amfoterisin B'ye dirençli mantarlara karşı etkilidir. Oral ve intravenöz kullanılan formları vardır. Tüm dokulara ve santral sinir sistemine geçişi iyidir. İtrakonazol gibi mayalara fungistatik, *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal etkilidir. Vorikonazol genelde iyi tolere edilmekle beraber, hastaların üçte birinde geçici görme kaybına neden olabilmektedir. Vorikonazolün vücuttan atılımı %80 karaciğerden olmaktadır ve karaciğerde sitokrom p450 sistemi ile metabolize olan ilaçlarla etkileşimi sıklıkla görülür (52–55).

Posakonazol, nispeten yeni bir triazoldür. Lipofiliktir ve %98 civarında proteinlere bağlanır. Yarılanma ömrü uzundur. Etki spektrumu geniştir ve *Candida* türleri, *C. neoformans*, *Aspergillus* türleri ve bazı zigomiçetleri kapsar. Oral formülasyonu vardır ancak mideden emilimi besin maddelerinden çok etkilenir. Vorikonazolden farklı olarak metabolizması büyük oranda karaciğer sitokrom p450 enzimlerinden bağımsızdır. Klinikte akut myeloid lösemi ve remisyon indüksiyon terapisi alan myelodisplastik sendrom hastalarında, profilaktik olarak kullanıldığında yaşam süresini en çok uzatan antifungal ilaç olduğu gösterilmiştir ve bu hastalarda kullanılması önerilmektedir (65).

4.7.3. Ekinokandinler

En yeni antifungal grubu olan ekinokandinler, doğada çeşitli mantarlar tarafından sentezlenen lipopeptidlerin sentetik deriveleridir. Etkilerini mantar hücre duvarında yer alan önemli bir karbonhidrat olan β -1,3 glukan'ı sentezleyen, 1,3- β -D-glukan sentetaz enzimini yarışmasız olarak inhibe ederek gösterirler.

Memeli hücrelerinde 1,3-β-D-glukan sentetaz enzimi olmadığı için ekinokandinlerin etkileri son derece seçicidir. Bu enzimin inhibisyonu, *Candida* türlerinde defektif hücre duvarı oluşmasına, selüler instabiliteye ve sonuçta hücre lizisyle fungisidal etkiye, *Aspergillus* türlerinde ise anormal hif büyümesine ve fungistatik etkiye neden olmaktadır (53,57,64).

Ekinokandinlerin etki spektrumu, hücre duvarı glukan bileşiminde β-1,3 glukan miktarı fazla olan mantarlarla sınırlıdır. *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı etkili olmakla beraber, *C. neoformans*, *Trichosporon*, *Fusarium* türleri ve zigomiçetlere karşı etkili değildir. Bu nedenle ekinokandinlerin *Candida* ve *Aspergillus* türleri ile gelişen invaziv infeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılması önerilmektedir. Ekinokandinlerin flukonazole dirençli *Candida* türlerine karşı etkinliği iyidir ancak *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* türlerine karşı etkisinin, diğer mayalara etkisine oranla daha sınırlı olduğu görülmektedir (52,53).

Ekinokandinler yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle oral alımda çok az emilirler ve intravenöz olarak kullanılmaları gerekir. %95 oranında proteinlere bağlanırlar. Tüm ana organlara yayılmakal beraber BOS konsantrasyonları düşüktür. Genellikle iyi tolere edilirler ve diğer ilaçlarla etkileşimleri azdır (53,64).

Kullanıma girmiş üç ekinokandin, anidulafungin, kaspofungin ve mikafungindir. Bunların üçü de *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı benzer spektrum ve etkinliğe sahiptir (53).

Ekinokandinlere direnç, 1,3-β-D-glukan sentetaz enziminin alt birimlerini kodlayan genlerde nokta mutasyonları gelişmesi ile ortaya çıkmaktadır. *Candida* türlerinde, enzimin büyük alt birimini kodlayan *FKS1* geninde nokta mutasyonlar sonucu gelişen ekinokandin direnci bildirilmiştir (57).

4.7.4. Flusitozin

Flusitozin (5-florositozin, 5-FC) florlanmış bir primidin olup, antimetabolit olarak etki gösteren tek antifungal ilaçtır. 5-FC, pürin-sitozin permeaz enzimi ile hücre içine girer ve sitoplazmada bir mantar enzimi olan sitozin deaminaz ile 5-florourasile (5-FU) çevirilir. 5-FU fosforlanır ve ve 5-floroüridilik asit (FUMP) oluşur. FUMP tekrar fosforlanır ve RNA'nın yapısına girerek protein sentezinin durmasına yol açar. Memeli hücrelerinde sitozin deaminaz bulunmadığı için ilacın etkisi seçicidir (40,52,53).

Flusitozinin antifungal spektrumu, *Candida* türleri, *C. neoformans*, *Rhodotorula* türleri, *S. cerevisiae* ve bazı esmer küflerle sınırlıdır. *C. krusei*'de azalmış duyarlılık bildirilmiştir. Tedavi sırasında sekonder direnç gelişimi çok sık görüldüğü için genellikle amfoterisin B ve flukonazol ile kombine edilerek kullanılır. Suda iyi çözünür ve oral biyoyararlanımı yüksektir. BOS ve diğer vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Atılımı böbrek yoluyla olur (52,53,66).

Kemik iliği depresyonu ve hepatotoksisite gibi önemli yan etkileri olduğundan serum düzeyi iyi takip edilmelidir (53).

Flusitozine direnç, ilacın hücre içine alımında rol alan ve *FCy2* geni ile kodlanan pürin-sitozin permeaz enziminde, 5-FC'i, 5-FU'ya dönüştürür ve *FCy1* geni ile kodlanan sitozin deaminaz enziminde ya da 5-FU'yu, FUMP'a dönüştüren ve *FUR1* geniyle kodlanan urasil fosforibozil transferaz enzimlerinde değişim ile ortaya çıkmaktadır. Pürin-sitozin permeaz ve sitozin deaminaz enzimlerinde değişiklik intirensel ya da primer dirence neden olurken, urasil fosforibozil transferaz enziminde görülen değişim sekonder ya da kazanılmış dirence neden olmaktadır (7,8,67).

4.7.5. Alilaminler

Bu grupta terbinafin ve naftilin yer alır. Etkilerini, *ERG1* geni tarafından kodlanan skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu inhibisyon sonucunda hücre membranında yüksek konsantrasyonda skualen birikmekte, membran geçirgenliği aşırı artmakta ve mantar hücresi ölmektedir (52,64).

Naftilin sadece topikal olarak kullanılırken, terbinafinin oral preparatı mevcuttur. Terbinafin geniş etki spektrumu olan lipofilik bir antifungaldır ve deri, tırnak ve yağ dokuda yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Kısa tedavi süresi ve düşük toksisitesi nedeniyle özellikle dermatomikozların tedavisinde kullanılmaktadır. Flukonazole dirençli *Candida* infeksiyonlarında, flukonazol-terbinafin kombinasyonunun faydalı olabileceğine yönelik veriler vardır (52).

Alilaminlere direnç klinikte nadir görülen bir antite olmakla beraber, *Saccharomyces cerevisiae*'da *ERG1* mutasyonuna bağlı terbinafin direnci gelişebildiği gösterilmiştir. Bunun yanında cdr atılım pompalarının fazla ekspresyonu bu ilaca da dirence yol açmaktadır (12,13,68).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Suşlar

Çalışmaya 17 adet *C. albicans* suşu dahil edildi. Bunlar, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden soyutlanmış, biri flukonazole dirençli (960), dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı (348, 1978, 93-05, 813), altısı duyarlı (533, 565, 644, 1221, 1453, 2157) toplam 11 adet, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda soyutlanmış flukonazole dirençli üç adet (H1, H2, H3), Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda soyutlanan flukonazole dirençli bir adet (B), Prof. Dr. Dominique Sanglard'dan sağlanan, *MDR1* atılım pompasını fazla eksprese ettiği ve buna yol açan P683H mutasyonunu içerdiği bilinen flukonazole dirençli bir adet (DSY292) ve flukonazole duyarlı ATCC 14053 suşlarıdır.

Suşların daha önceki araştırmalar kapsamında CLSI M27-A2 standartlarına göre çalışılan mikrodilüsyon ve kısmi inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile yapılan 0.5µg/ml siklosporin A eklemiş ve eklenmemiş YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) agar besiyerinde uygulanan E test yöntemleri ile elde edilen flukonazol minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile duyarlılık kategorileri tablo-3'te gösterilmiştir. Suşların daha önceki bir araştırmada gerçek zamanlı PZT ile elde edilen *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* atılım pompa ekspresyon düzeyleri ATCC14053 suşuna oranlarına göre tablo-4'te gösterilmiştir.

Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) (Fluka 53286) stoklanarak, -80°C'de saklandı.

Tablo-3. Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının, flukonazole duyarlılık kategorileri ve flukonazol MİK değerleri

NO	Suş No	Kaynağı*	Flukonazole duyarlılık kategorisi**	Flukonazol MİK (µg/ml)		
				Mikrodilüsyon yöntemi ile	YEPD agar/E test yöntemi ile	0.5µg/ml siklosporin A içeren YEPD agar/E test yöntemi
1	ATCC 14053	Kontrol	Duyarlı	-	-	-
2	533	DEU	Duyarlı	0.500	-	-
3	565	DEU	Duyarlı	0.500	-	-
4	644	DEU	Duyarlı	0.250	-	-
5	1221	DEU	Duyarlı	0.125	-	-
6	1453	DEU	Duyarlı	0.250	-	-
7	2157	DEU	Duyarlı	0.250	-	-
8	348	DEU	Ki-Du	1024	0.500	0.500
9	1978	DEU	Ki-Du	1024	0.500	0.500
10	93-05	DEU	Ki-Du	1024	1.5	0.500
11	813	DEU	Ki-Du	>1024	2	1.5
12	960	DEU	Dirençli	8	-	-
13	H1	HU	Dirençli	64	>256	>256
14	H2	HU	Dirençli	16	48	64
15	H3	HU	Dirençli	32	96	128
16	B	UU	Dirençli	32	64	64
17	DSY292	DS	Dirençli	>64	-	-

*DEU: Dokuz Eylül Üniversitesi

HU: Hacettepe Üniversitesi

UU: Uludağ Üniversitesi

DS: Prof. Dr. Dominique Sanglard

**Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

Tablo-4. İncelenen *C. albicans* suşlarının ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları

NO	Suş No	Flukonazole duyarlılık kategorisi*	CDR1 ekspresyon oranı±SS	CDR2 ekspresyon oranı±SS	MDR1 ekspresyon oranı±SS
1	ATCC 14053	Duyarlı	1.0	1.0	1.0
2	533	Duyarlı	1.2 ± 0.3	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2
3	565	Duyarlı	2.2 ± 0.6	2.6 ± 0.3	8.8 ± 1.6
4	644	Duyarlı	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0	0.2 ± 0
5	1221	Duyarlı	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
6	1453	Duyarlı	4.2 ± 1.1	8.4 ± 0.6	4.7 ± 0.6
7	2157	Duyarlı	4.8 ± 0.8	7.1 ± 0.3	0.4 ± 0
8	348	Ki-Du	3.6 ± 1.5	2.7 ± 0.5	7.6 ± 0.7
9	1978	Ki-Du	2.9 ± 1.1	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.8
10	93-05	Ki-Du	1.8 ± 0.5	3.2 ± 0.8	5.7 ± 0.5
11	813	Ki-Du	5.0 ± 0.6	4.2 ± 0.1	103.9 ± 6.9
12	960	Dirençli	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1
13	H1	Dirençli	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.1	33.3 ± 4.9
14	H2	Dirençli	4.0 ± 0.5	3.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2
15	H3	Dirençli	28.4 ± 4.9	33.9 ± 2.3	1.0 ± 0.1
16	B	Dirençli	32.0 ± 5.7	47.2 ± 2.0	1.7 ± 0.3
17	DSY292	Dirençli	-	-	19.0 ± 1.5

*Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

5.2. PZT - Dizi Analizi İle Atılım Pompa Genlerinin Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Genlerdeki Nokta Mutasyonlarının Araştırılması

Cdr1-2 ve Mdr1 atılım pompalarının ekspresyonunda rol alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler olan *TAC1* ve *MRR1*'deki nokta mutasyonlarını saptamak için, önce çalışmaya alınan 17 *C. albicans* suşunun DNA'sı spin kolon yöntemi ile izole edildi. Daha sonra DNA üzerindeki *TAC1* ve *MRR1* gen bölgelerini tanıyan öncüller hazırlandı ve suşların her iki gen bölgesi PZT ile çoğaltıldı. PZT sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde görüntüledikten sonra dizi analizine gönderildi.

5.2.1. DNA İzolasyonu

Candida suşlarından DNA izolasyonu için "PureLink Genomic DNA Mini Kit" K1820-01(invitrogen) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı.

Çalışmanın öncesinde "PureLink Genomic Wash Buffer" 1 ve 2, üretici firmanın önerdiği şekilde %96 etanol ile sulandırıldı.

Gerekli santrifüj işlemleri, Hettich Zentrifugen Mikro 120 cihazı, karıştırma ve homojenizasyonlar, MS2 Minishaker IKA Works Inc. vorteks cihazı ile yapıldı.

Suşlar, ard arda iki defa SDA besiyerine pasajlanıp 37°C'de 48 saat inkübe edilerek canlandırıldı. İkinci pasaj 48 saate ulaşıncaya, tek düşmüş kolonilerden öze ile alınarak steril distile su içinde mililitrede 5×10^7 hücre olacak şekilde maya süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 1 ml, steril bir ependorf tüpüne alındı ve 500 x g'de 2 dakika santrifüjlenerek çökelti oluşturuldu. Süpernatant atıldı. Maya çökeltisinin üzerine 15 ünite zimolaz ve 500 µl 1 M sorbitol, 10 mM sodyum EDTA, 14mM β-merkaptotanol şeklinde hazırlanmış taze tampondan eklendi ve su banyosunda 37°C'de 60 dakika bekletildi. Daha sonra 3000 x g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 180 µl "PureLink Genomic Digestion Buffer" ve 20 µl Proteinase K eklendi ve kısaca vortekslenip su banyosunda 55°C'de 45 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, 20 µl RNase A eklenip kısaca vortekslenildi ve oda sıcaklığında iki dakika inkübe edildi. Daha sonra 200 µl "PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer" eklendi, kısaca vortekslenerek homojenizasyon sağlandıktan sonra 200 µl %96 etanol eklendi ve 5 sn vortekslenerek bir kez daha homojenize edildi ve hemen DNA bağlama aşamasına geçildi.

Bir adet spin kolon alındı ve bir önceki aşamada hazırlanan lizatin tamamı bunun içine aktarıldı. 10000 x g'de, oda sıcaklığında bir dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 500 µl "PureLink Genomic Wash Buffer" 1 eklendi, oda sıcaklığında, 10000 x g'de bir dakika santrifüj edildi. Kullanılmış toplama tüpü atıldı ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 500 µl "PureLink Genomic Wash Buffer" 2 eklendi, oda sıcaklığında 3 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Kullanılmış toplama tüpü atıldı ve spin kolon steril bir ependorf tüpünün içine koyuldu. 50 µl "PureLink Genomic Elution Buffer" eklenip oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında 1 dakika maksimum hızda santrifüjlendi ve sonuçta maya DNA'sı ependorf tüpünün içinde elde edildi. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı.

5.2.2. PZT İçin Gerekli Öncüllerin Tasarlanması ve Hazırlanması

PZT için hedeflenen *C. albicans* *TAC1* ve *MRR1* genlerine ait diziler gen bankasından indirildi. Bu diziler BioEdit sürüm 7.0.9.0 programı kullanılarak hizalandı ve genlerin başında ve sonunda bulunan korunmuş bölgelere uygun öncüller tasarlandı.

TAC1 için kullanılan öncüller:

Forward: 5' ATGGACACTTCACTGTCACT 3'

Reverse: 5' TTAAATCCCCAAATTATTGTCAA 3'

MRR1 için kullanılan öncüller:

Forward: 5' ATGTCRATTGCCACCACCC 3'

Reverse: 5' TTAATTGGTAAAAAGTTGATCAAA 3'

Liyofilize halde gelen öncüller, 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde, 1X TrisEDTA (TE) tampon ile sulandırılarak stok solüsyonlar oluşturuldu ve -20°C'de saklandı. Gerektikçe bu stok solüsyonlardan distile su ile 10pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde alikotlar hazırlanarak kullanıldı.

TE Tamponun hazırlanması:

TE tamponu için önce 1M Tris ve 0.5M Na₂EDTA çözeltileri hazırlandı: 1M Tris çözeltisi: 121.14 gr. tris (hidroksimetil) aminometan Trizma "base" (Sigma T 6066), 800 ml suda eritildi. 42ml HCl ilave edilerek pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, distile su ile 1 litreye tamamlanarak oda ısısında saklandı.

0.5M Na₂EDTA çözeltisi: 186.1gr disodyum etilen diamin tetra asetat-2 H₂O (Sigma E 5134), 800ml suda eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, distile su ile 1 litreye tamamlanıp oda ısısında saklandı.

Son olarak 2.5ml 1M Tris çözeltisi ve 0.5ml 0.5M Na₂EDTA çözeltisi karıştırılıp, hacim distile su ile 250ml'ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

5.2.3. Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)

Çoğaltılması planlanan her iki gen bölgesi için 50 µl total hacimde optimum protokoller belirlendi. Her iki grup öncül de en iyi sonucu aynı ısı döngülerinde verdi. *TAC1* protokolünde kalıp DNA sulandırılırken, *MRR1* protokolünde DNA sulandırılmadan kullanıldı.

Kullanılan malzemeler:

- Taq DNA polimeraz enzimi 5U/µl : Fermentas EP0402
- 10x Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄ : Fermentas EP0402
- 25mM MgCl₂ : Fermentas EP0402
- dNTP Mix 10 mM each : Fermentas R0192
- Thermal cycler cihazı : Techne TC-412

5.2.3.1. TAC1 PZT

TAC1 için PZT karışımı:

Nükleaz içermeyen steril distile su	:	33.5 µl
(NH ₄) ₂ SO ₄ 'lı 10x "Taq Buffer"	:	5 µl
25 mM MgCl ₂	:	3 µl
dNTP karışımı her birinden 10 mM	:	1 µl
"Forward" öncül	:	1 µl
"Reverse" öncül	:	1 µl
Taq DNA polimeraz enzimi 5U/µl	:	0.5 µl
Kalıp DNA	:	5 µl (1/10 sulandırılmış)
Toplam hacim	:	50 µl

TAC1 için ısı döngüsü

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
54°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
52°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
50°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
72°C'de 10 dakika son uzama	

5.2.3.2. *MRR1* PZT

MRR1 için PZT karışımı:

Nükleaz içermeyen steril distile su	:	35.5 µl
(NH ₄) ₂ SO ₄ 'lı 10x "Taq Buffer"	:	5 µl
25 mM MgCl ₂	:	4 µl
dNTP karışımı her birinden 10 mM	:	1 µl
"Forward" öncül	:	1 µl
"Reverse" öncül	:	1 µl
Taq DNA polimeraz enzimi 5U/µl	:	0.5 µl
Kalıp DNA	:	2 µl
Toplam hacim	:	50 µl

MRR1 için ısı döngüsü

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
54°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
52°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
94°C'de 1 dakika denatürasyon	} 10 döngü
50°C'de 1 dakika birleşme	
72°C'de 6 dakika uzama	
72°C'de 10 dakika son uzama	

5.2.4. PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi

PZT ürünler, "DNA ladder" beraberinde agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu ve beklenen büyüklükte ürünlerin oluşup oluşmadığı UV ışık altında görüntülenerek kontrol edildi.

Kullanılan malzemeler:

- Agaroz: (Sigma A 5093)
- Etidyum bromür: (Applichem A 1152,0100) (%1'lik solüsyon)
- 500 bazlık DNA "ladder": O'Range Ruler 500 bp DNA Ladder Fermentas SM0643
- 6X Orange DNA Loading Dye Fermentas SM0643
- 1X TBE tampon

TBE tamponun hazırlanması:

Önce stok olarak 10X TBE tampon hazırlandı. Bunun için 108 gr Trizma "base" (Sigma T 6066) ve 55 gr borik asit (Sigma B 6768) 900 ml suda çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) eklendi ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı. Na₂EDTA'nın çözünebilmesi için hazırlanan solüsyon su banyosunda ısıtıldı. Hazırlan 10X tampon gerektiğinde distile su ile 1X olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

Jelin hazırlanması ve elektroforez:

Elektroforez tankının hacmine uygun olarak 40 ml 1X TBE tampon içerisinde 0.48 g (%1,2) agaroz eritildi. Tamamen erimiş agarın içine 2 µl (%5) etidyum bromür solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan karışım soğumadan, önceden hazırlanan ve 13'lü tarak yerleştirilen jel kalıbına döküldü ve katılaşması için 20 dk beklendi.

10 µl PZT ürünü, yükleme tamponu ile karıştırıldı. 3µl DNA "ladder" ve ürünlerin 10 µl'si jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile doldurularak, jelle bu tank içinde Thermo EC320 Minicell Primo Electricophoretic gel system ile 110 V'da 70 dakika elektroforez uygulandı.

Görüntüleme:

Elektroforezin sonunda jel, UV aydınlatıcıda incelenerek, bilgisayarlı görüntüleme cihazında (Vilbert Lourmat Infinity-1000/26MX) görüntülendi ve fotoğrafı çekildi.

5.2.5. PZT Ürünlerinin Dizi Analizi

Jel elektroforezi ve görüntüleme ile varlığı kanıtlanan PZT ürünlerinin kalan 40 ml'si, saflaştırılmak ve "Primer Walking" hizmeti ile dizi analizi yapılmak üzere Macrogen (Seul/Kore) firmasına gönderildi.

5.3. Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gelen sonuçların değerlendirilmesinde BioEdit sürüm 7.0.9.0 programı kullanıldı. Nükleotid dizileri hizalandı, amino asit dizilerine çevrildi ve referans dizilerle karşılaştırılarak mutasyonlar saptandı.

TAC1 geninde görülen mutasyonların saptanmasında flukonazole duyarlı ATCC14053 suşuna ait dizi referans dizi olarak kabul edildi.

MRR1 geninde görülen mutasyonların saptanmasında, flukonazole duyarlı ATCC14053 *C. albicans* suşunun dizisi ve bu suşun dizi analizinde belirlenemeyen bölgeler olması nedeniyle, flukonazol duyarlı yabanıl SC5314 *C. albicans*'a ait "Candida Genome Database"den sağlanan dizi referans olarak kabul edildi. Çalışılan suşların *MRR1* dizileri ayrıca *MDR1* pompasını fazla eksprese eden ve P683H mutasyonunu barındırdığı bilinen DSY292 no'lu suş ile de karşılaştırıldı.

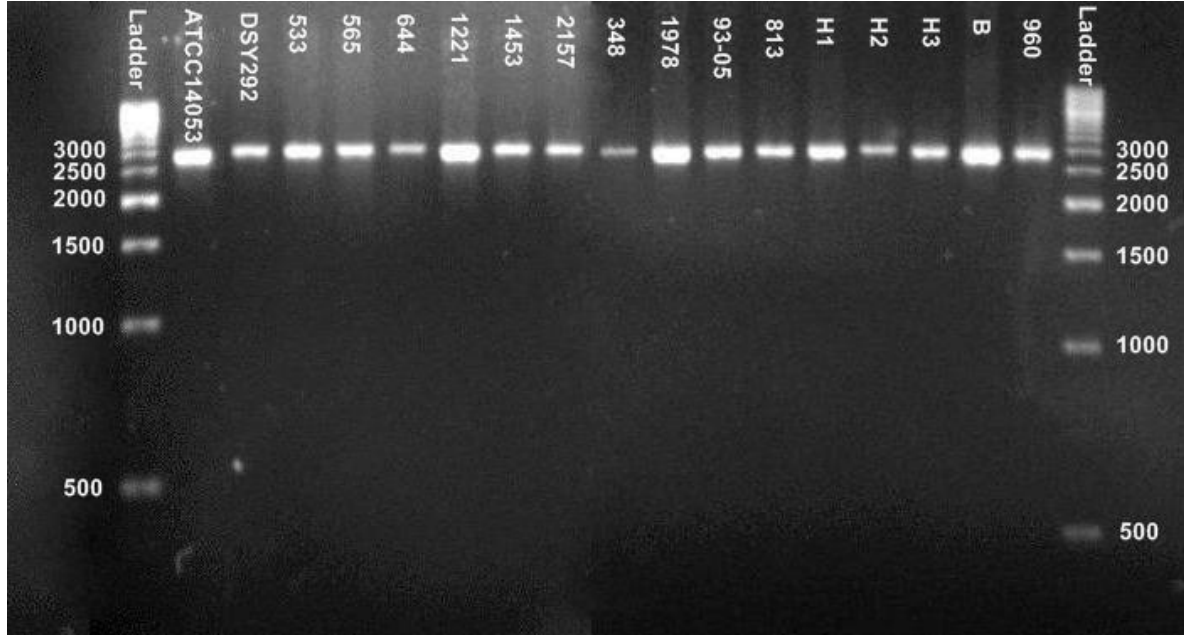
Belirlenen mutasyonlar, literatürde flukonazol dirençli suşlarda atılım pompalarının fazla ekspresyonuna neden olduğu gösterilen mutasyonlar ile karşılaştırıldı. Flukonazole duyarlı, kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı ve dirençli gruplardaki mutasyonlar birbirleriyle de karşılaştırıldı.

6. BULGULAR

6.1. TAC1 PZT - Dizi Analizi Sonuçları

6.1.1. TAC1 PZT Sonuçları

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının tümünde, PZT uygulaması sonucunda 2946 bazlık *TAC1* bölgesi çoğaltılarak dizi analizine gönderildi. Elde edilen PZT ürünlerinin jel görüntüsü, şekil-1'de izlenmektedir.



Şekil-1. Çalışılan *C.albicans* suşlarına ait 2946 baz uzunluğundaki *TAC1* gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri

6.1.2. TAC1 Dizi Analizi Sonuçları

PZT ile çoğaltılan ürünlerin dizi analizi sonucunda, çalışmaya alınan 17 suştan 14'ünün *TAC1* gen bölgesine ait dizilerin tamamı elde edildi, diğer üç suşun dizilerinin başında, sonunda ya da her iki tarafında kayıplar olduğu görüldü. Her suş için 2946 baz uzunluğundaki *TAC1* gen dizisinin elde edilen miktarı tablo-5'te gösterilmiştir.

Elde edilen nükleotid dizileri amino asit dizilerine çevirildi ve flukonazole duyarlı ATCC14053 *C. albicans* suşuna ait dizi referans alınarak nokta mutasyonlar saptandı. Amino asit değişikliğine neden olmayan sessiz mutasyonlar dikkate alınmadı.

Flukonazole duyarlı *C. albicans* suşlarının *TAC1* bölgelerinde K87N, S108N, M170V, M170I, N174D, F189S, S290C, A377V, N396S, I558V, N772K, D776N, S896N, P941L ve E945G mutasyonları saptanırken, kısmi inhibisyon etkisi gösteren

duyarlı suşlara ait dizilerde L5R, F189S, T353S, N396S, I558V, N772K, D776N, T782A, Q829E, R869Q, T885K, S896N ve P941L mutasyonları belirlendi.

Flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarının *TAC1* dizilerinde ise F104V, S108N, L149I, M170V, N174D, F189S, N396S, A411V, I558V, R673Q, A736V, D776N, A790V, Q829E, S896N ve P941L mutasyonlarının bulunduğu görüldü. Bu mutasyonlardan F104V(n=1), L149I(n=1), A411V(n=1), R673Q(n=1), A736V(n=1) ve A790V(n=3) mutasyonları çalışmaya alınan suşlardan yalnızca flukonazole dirençli olanlarda saptandı. ATCC14053 *C. albicans* suşuna ait *TAC1* dizisi referans olarak alındığında incelenen suşlarda gözlenen mutasyonlar, tablo-6'da gösterilmiştir.

Araştırılan 17 *C. albicans* suşunun *TAC1* bölgelerinde dizi analiziyle belirlenen nükleotid değişiklikleri şekil-2'de, amino asit değişiklikleri ise şekil-3'te izlenmektedir.

Tablo-5. Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının *TAC1* gen dizilerinin elde edilebilme oranı

Suş No	Dizi analizi ile saptanan	Dizinin başından kayıp	Dizinin sonundan kayıp	Elde edilen nükleotid dizisi oranı*
Nükleotid Sayısı				%
ATCC14053	2946	-	-	100,00
533	2946	-	-	100,00
565	2946	-	-	100,00
644	2823	123	-	95,82
1221	2946	-	-	100,00
1453	2832	114	-	96,13
2157	2946	-	-	100,00
348	2946	-	-	100,00
1978	2946	-	-	100,00
93-05	2736	135	75	92,87
813	2946	-	-	100,00
DSY292	2946	-	-	100,00
H1	2946	-	-	100,00
H2	2946	-	-	100,00
H3	2946	-	-	100,00
B	2946	-	-	100,00
960	2946	-	-	100,00

**TAC1* gen uzunluğu 2946 nükleotid

Tablo-6. ATCC14053 *C. albicans*'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen *TAC1* mutasyonları

Suş No	Flukonazole Duyarlılık Kategorisi*	Amino Asit Değişimi**
ATCC14053	Duyarlı	- (Referans dizi)
533	Duyarlı	N396S D776N S896N
565	Duyarlı	S108N N396S D776N S896N E945G
644	Duyarlı	S108N M170V N396S D776N P941L
1221	Duyarlı	K87N M170I N174D F189S N396S D776N S896N
1453	Duyarlı	F189S N396S I558V D776N P941L
2157	Duyarlı	K87N N174D F189S S290C A377V N396S N772K D776N S896N
348	Ki-Du	L5R F189S T353S N396S N772K D776N T782A Q829E T885K S896N
1978	Ki-Du	N396S D776N
93-05	Ki-Du	N396S D776N
813	Ki-Du	F189S N396S I558V N772K D776N Q829E R869Q S896N P941L
DSY292	Dirençli	L149I N174D F189S N396S A411V I558V A790V Q829E S896N P941L
H1	Dirençli	S108N N396S D776N A790V S896N
H2	Dirençli	S108N M170V N396S D776N A790V S896N
H3	Dirençli	F104V N396S A736V D776N
B	Dirençli	S108N M170V N396S R673Q D776N S896N P941L
960	Dirençli	N396S D776N Q829E

*Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

**Koyu yazılan mutasyonlar sadece dirençli suşlarda görülmüştür.

```

10      20      30      40      50      60
ATCC14053 ATGGACACTTCACTGTCACTGGGAACTCACCCCTTCAACTTTTAACAACCTTGACAAAAGCAA
533      .....
565      .....
644      ~~~~~
1221     .....
1453     ~~~~~
2157     .....
348      .....G.....
1978     .....
9305     ~~~~~
813      .....
DSY292   .....
H1       .....
H2       .....
H3       .....
B        .....
960      .....

```

```

70      80      90      100     110     120
ATCC14053 CAAGAACTCACAGGGAATGACCCTAACGATACTAATAGGAAAAGAATAAGAGTGGCATGT
533      .....
565      .....
644      ~~~~~
1221     .....C.....
1453     ~~~~~
2157     .....C.....
348      .....
1978     .....
9305     ~~~~~
813      .....
DSY292   .....
H1       .....
H2       .....
H3       .....
B        .....
960      .....

```

```

130     140     150     160     170     180
ATCC14053 GATAGTTGTCGGAGAAAGAAAATTAATGCAATGGGTCTTATCCATGTGGGAATTGTATT
533      .....C.....
565      .....C.....
644      ~~~
1221     .....
1453     .....
2157     .....
348      .....C.....
1978     .....C.....
9305     ~~~~~
813      .....C.....
DSY292   .....
H1       .....C.....
H2       .....C.....
H3       .....
B        .....C.....
960      .....

```

	190	200	210	220	230	240	

ATCC14053	CAAGCTAAAAACACTAGTAATTGTCATTTCACTGAACGACCTGTGAGAAAAGAAATTGAAA						
533						
565						
644						
1221A.....						
1453						
2157A.....						
348						
1978						
9305						
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3						
B						
960						

	250	260	270	280	290	300	

ATCC14053	CCAAGCTAAACAAGACAATAAATCAACCGCCAATAGCAACGGAGTTTCGAAAAGGAAATAC						
533T.....						
565T.....						
644T.....						
1221C.....						
1453G..T.....						
2157C.....						
348A.....						
1978T.....						
9305G..T.....						
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3G..T.....						
B						
960G..T.....						

	310	320	330	340	350	360	

ATCC14053	AACGATACATTTAGTGGGAATAGCATTAAATATCAAGACTGAAAAACAAGAGAATACTACT						
533C.....						
565C.....A.....						
644C.....A.....						
1221						
1453C.....						
2157						
348C.....A.....						
1978C.....						
9305C.....						
813C.....A.....						
DSY292A.....						
H1C.....A.....						
H2C.....A.....						
H3G..C.....						
BC.....A.....						
960C.....						


```

370      380      390      400      410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 TTCGGCATAAATGACAACAAATCAAGTGATCTAGAATCGAGATTGAGTCGTATTGAAAAAT
533      .....
565      .....
644      .....
1221     .....
1453     .....
2157     .....
348      .....
1978     .....
9305     .....
813      .....
DSY292   .....
H1       .....
H2       .....
H3       .....
B        .....
960     .....

```

```

430      440      450      460      470      480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 TCAATGTCGAGAATGATGCATACTTTAGAGAACTTCTTGCAAACTTTATGACACAAGCA
533      .....
565      .....
644      .....
1221     .....
1453     .....
2157     .....
348      .....
1978     .....
9305     .....
813      .....
DSY292   .....
H1       .....
H2       .....
H3       .....
B        .....
960     .....

```

```

490      500      510      520      530      540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 ATAAGAAATAACCATTCCTCAACTCTTCCATGTTCAATAATAATTCACTATCGCCCACTCCT
533      .....
565      .....
644      .....
1221     .....
1453     .....
2157     .....
348      .....
1978     .....
9305     .....
813      .....
DSY292   .....
H1       .....
H2       .....
H3       .....
B        .....
960     .....

```

```

550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 TCAGAAGATTTTAATAAAAAGTGCATTTTGATAGTGAAGAACAACAAACTTCACATAATTAC
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....C.....
1453 .....C.....
2157 .....C.....
348 .....C.....G.....
1978 .....
9305 .....
813 .....C.....
DSY292 .....C.....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

610      620      630      640      650      660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AAAAAATTTGAAAGATCACGCTAAGGATGCCAATGAATTATTGAAATTGAGAAATTGGGAT
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....A.....
1453 .....A.....
2157 .....A.....
348 .....A.....
1978 .....
9305 .....
813 .....A.....
DSY292 .....A.....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 GAATTTGTTGGTACTCATTCAATTACTTGCATTTTCTCTCGGGAATCATTAGATTGGATG
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....T.....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

          730      740      750      760      770      780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 GAAAAAAGCTTTAGGTTTCATACGGTGAAGAATATTTGACCCCCATAAGGAATTTACCTTTA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

          790      800      810      820      830      840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 GTGTTTCATTTCAGAGTTAAAACCATATATCATGAAATGGATTGATCCTCCCGTAGTGGAT
533 .....C.....
565 .....C.....
644 .....C.....
1221 .....C.....A.....
1453 .....C.....
2157 .....C.....
348 .....C.....
1978 .....C.....
9305 .....C.....
813 .....C.....
DSY292 .....C.....A.....
H1 .....C.....
H2 .....C.....
H3 .....C.....
B .....C.....
960 .....C.....

```

```

          850      860      870      880      890      900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AAATTGCAAAGGAAAAAATTATTAGAAAGTCCATTCCCTACTGATTCAAAATTAATTTCA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....T.....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

	910	920	930	940	950	960
					
ATCC14053	AAATTGATTGATTTATATTATGAAGAAACAAGTATGATCAATATTTTAGTTGATGAATCA					
533G.....					
565G.....					
644					
1221A.....					
1453					
2157A.....					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292A.....					
H1G.....					
H2G.....					
H3					
BG.....					
960					

	970	980	990	1000	1010	1020
					
ATCC14053	AGAGTGAGAAGTTTATTTGCTGCCTACTATAACAATTTTGCTGAACCAATTGCTACCAAG					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157				A.....	
348					
1978C.....					
9305					
813C.....				A.....	
DSY292				A.....	
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
					
ATCC14053	CGAAGGAGATTCAAACCTATCGGAATTACTTTTAATGACATCTATATTATTAATTTCTTTG					
533A.....T.....					
565A.....T.....					
644A.....T.....					
1221	T.....	G.....		G.....	
1453A.....	T.....				
2157	T.....	G.....		G.....	
348A.....	T.....		T.....		
1978A.....	T.....	G.....		G.....	
9305A.....	T.....				
813	T.....	G.....		G.....	
DSY292	T.....	G.....		G.....	
H1A.....	T.....				
H2A.....	T.....				
H3A.....	T.....				
BA.....	T.....				
960A.....	T.....				


```

                1450      1460      1470      1480      1490      1500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AGACGTAAGATTTGGTGGTTTTGTTATTTTTTCGATATTGAATTTCTTTTAAATCCGGT
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                1510      1520      1530      1540      1550      1560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AAACCTCCAGTAATCAATACCAACGATGTCACCTACCAATAGTGATGAAGACTTATTACGA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                1570      1580      1590      1600      1610      1620
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 GTTATTACTCAATTAAAACAGTATGGACCACTATCACCAAAGGACAGAATGTATAGTCCT
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

	1630	1640	1650	1660	1670	1680
					
ATCC14053	GTTTGCCACACAATATCTACTAGTTTGTTAGATTTGAGTGGATCTGACTCTATTTGTTTA					
533T.....					
565T.....					
644					
1221					
1453G.....					
2157T.....					
348T.....					
1978					
9305					
813T.....G.....					
DSY292G.....					
H1T.....					
H2T.....					
H3					
BT.....					
960					

	1690	1700	1710	1720	1730	1740
					
ATCC14053	GATATTTTGAAAATCATTCAACTGGGGGATATACTTGATGATCCATTTTATTTCCAATTT					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
					
ATCC14053	TGTGCCTTGTTACAATCAAGAATAAGGTCAAATTCCTTATCATGATTTATTTATTGCATCC					
533					
565					
644	..C.....G.....G.....					
1221					
1453	..C.....					
2157					
348					
1978G.....					
9305	..C.....					
813G.....					
DSY292					
H1					
H2					
H3	..C.....					
B					
960	..C.....					

	1810	1820	1830	1840	1850	1860

ATCC14053	GCTGAAAAACGCGATTTTCAGTTCCATATCCAATACTTTAGAAAAATTGAATGCTGACATG					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1870	1880	1890	1900	1910	1920

ATCC14053	TTTGAGTTGGCAATGTATTTAGCAGATGAGGCCAAACCTCGATTTTACAATGATCCAAAA					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1930	1940	1950	1960	1970	1980

ATCC14053	TTCACCTCAGTTCAAGCAAGTACTGGCACGTCAATTAGGCGAGACACGATTCTTGCTATG					
533					
565					
644					
1221C..					
1453C..					
2157C..					
348					
1978					
9305					
813C..					
DSY292C..					
H1					
H2					
H3					
B					
960					


```

                2350      2360      2370      2380      2390      2400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AGTACAATATGTGTGAACAAAATTGTTGCCATTGAATTGATTGTTAGATTAATGTTGAGA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....A.....
1453 .....
2157 .....A.....
348 ...G.....
1978 .....A.....
9305 .....
813 .....A.....
DSY292 .....T.....
H1 .....T.....
H2 .....T.....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                2410      2420      2430      2440      2450      2460
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 GTAGTGATCAAAGTTTATGAACTTCATAATAATGTGGAAATCTTGGCCAATAATCCAGCT
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....T.....
1453 .....
2157 .....T.....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....T.....
DSY292 .....T.....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                2470      2480      2490      2500      2510      2520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 TTACAAAATCATTTACAAGAAGCTCAAGAGAAATTCCTGATATTTCCAAAACCATGCG
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....G.....
1978 .....
9305 .....
813 .....G.....
DSY292 .....G.....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....G.....

```



```

                2710      2720      2730      2740      2750      2760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 TCAACTGGAGAGCCTCAAGTTTGGCTATGCTCAGTCACCAAGTTATAATGCTTCGTTGTCA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                2770      2780      2790      2800      2810      2820
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 AATATAATCAACAATGAAAGCACAGGTCGTTCCACCAGCAACATCAACATCGATAAATCAA
533 .....
565 .....
644 .....
1221 .....
1453 .....
2157 .....
348 .....
1978 .....
9305 .....
813 .....
DSY292 .....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .....
960 .....

```

```

                2830      2840      2850      2860      2870      2880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATCC14053 CCGATGATGAATGAAAATTATGATTTGTTCAATGACTATTTGATTGATAATTCAGCTGTA
533 .....
565 .....G.....
644 .T.....
1221 .....G.....
1453 .T.....
2157 .....
348 .....G.....
1978 .....
9305 .....~~~~~
813 .T.....G.....
DSY292 .T.....
H1 .....
H2 .....
H3 .....
B .T.....G.....
960 .....

```

	2890	2900	2910	2920	2930	2940
					
ATCC14053	AATTTGCCATTTAGTCAATTTAATAATTTACCCAATTTTTCTTTGACAATAATTTGGGG					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157					
348					
1978					
9305	~~~~~					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					
					
ATCC14053	ATTTAA					
533					
565					
644					
1221					
1453					
2157					
348					
1978					
9305	~~~~~					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

Şekil-2. İncelenen *C. albicans* suşlarının *TAC1* gen bölgelerinde dizi analizi sonucunda saptanan nükleotid değişiklikleri

	10	20	30	40	50	60
ATCC14053	MDTSLSLGTHPSTFNNLTKQ	QELTGNDPNDTNRKRIRVACD	SCRRKKIKCN	GSYPCGNCI		
533					
565					
644	~~~~~					
1221					
1453	~~~~~					
2157					
348	...R				
1978					
9305	~~~~~					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	70	80	90	100	110	120
ATCC14053	QAKNTSNCHFTERPVRK	KLKPTKQDNKSTANSNGV	SKRKYNDTFSGNSINIK	TEKQENTT		
533					
565N					
644N					
1221N					
1453					
2157N					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1N					
H2N					
H3V					
BN					
960					

	130	140	150	160	170	180
ATCC14053	FGINDNKSSDLESRLSRI	ENSMRMMHTLENFLQN	FMTQAIRNNHSNSSM	FNNNSLSPTP		
533					
565					
644V					
1221I..D					
1453					
2157D					
348					
1978					
9305					
813					
DSY292I.....D					
H1					
H2V					
H3					
BV					
960					

190	200	210	220	230	240	
ATCC14053	SED	FNK	S	A	F
533	Q	T	S	H	N
565	Y	K	N	L	K
644	D	H	A	K	D
1221	A	N	E	L	L
1453	K	L	R	N	W
2157	D	E	F	V	G
348	T	H	S	I	T
1978	C	I	F	S	R
9305	E	S	L	D	W
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					
	250	260	270	280	290	300
ATCC14053	E	K	T	L	G
533	S	Y	G	E	E
565	Y	L	T	P	I
644	R	N	L	P	L
1221	V	F	H	S	E
1453	L	K	P	Y	I
2157	M	K	W	I	D
348	P	P	V	V	D
1978	K	L	Q	R	K
9305	K	L	L	E	S
813	P	F	F	P	T
DSY292	D	S	K	L	I
H1					
H2					
H3					
B					
960					
	310	320	330	340	350	360
ATCC14053	K	L	I	D	L
533	Y	E	E	T	S
565	M	I	N	I	L
644	V	D	E	S	R
1221	V	R	S	L	F
1453	A	A	Y	N	N
2157	F	A	E	P	I
348	A	T	K	R	R
1978	R	R	R	F	K
9305	L	S	E	L	L
813	L	M	T	S	I
DSY292	L	L	I	S	L
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	550	560	570	580	590	600
					
ATCC14053	V	C	H	T	I	S
533	T	S	L	L	D	L
565	S	G	S	D	S	I
644	C	L	D	I	L	K
1221	I	I	Q	L	G	D
1453	I	L	D	D	P	F
2157	F	Y	F	Q	F	C
348	A	L	L	Q	S	R
1978	I	R	S	N	S	Y
9305	H	D	L	F	I	A
813	S					
DSY292		V				
H1						
H2						
H3						
B						
960						

	610	620	630	640	650	660
					
ATCC14053	A	E	K	R	D	F
533	S	S	I	S	N	T
565	L	E	K	L	N	A
644	D	M	F	E	L	A
1221	M	Y	L	A	D	E
1453	A	K	P	R	F	Y
2157	N	D	P	K	F	T
348	S	V	Q	A	S	T
1978	G	T	S	I	R	R
9305	D	I	L	A	M	
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3						
B						
960						

	670	680	690	700	710	720
					
ATCC14053	K	L	T	F	F	S
533	H	L	M	I	I	N
565	R	Y	P	L	M	I
644	A	T	E	D	S	K
1221	F	D	D	R	V	I
1453	K	F	R	N	L	S
2157	L	D	S	A	R	T
348	I	L	M	L	I	K
1978	G	W	H	R	E	S
9305	A	S	A	L	F	Y
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3						
B		Q				
960						

	730	740	750	760	770	780
ATCC14053	NWAIYFPVAA	YLVLVAAI	INHPQLPES	GTNLNLLI	ETSLSFFK	SSKQWNSS
533						NDSDKQQN
565						N
644						N
1221						N
1453						N
2157						K
348						N
1978						N
9305						N
813						K
DSY292						N
H1						N
H2						N
H3	V					N
B						N
960						N

	790	800	810	820	830	840
ATCC14053	STICV NKIV	AIELIVRL	MMLRVV	IKVYELH	NNVEILAN	NPALQNH
533						LQEAQEK
565						FPDIFQ
644						NHA
1221						
1453						
2157						
348	A					E
1978						
9305						
813						E
DSY292	V					E
H1	V					
H2	V					
H3						
B						
960						E

	850	860	870	880	890	900
ATCC14053	EFTSKMIAL	VGASPF	GGCGSR	NTSSCN	LRDNST	NHGO
533						QNNMNP
565						SPTITN
644						NNTYNS
1221						NI
1453						ISTGSN
2157						N
348						K
1978						N
9305						
813						Q
DSY292						N
H1						N
H2						N
H3						
B						N
960						

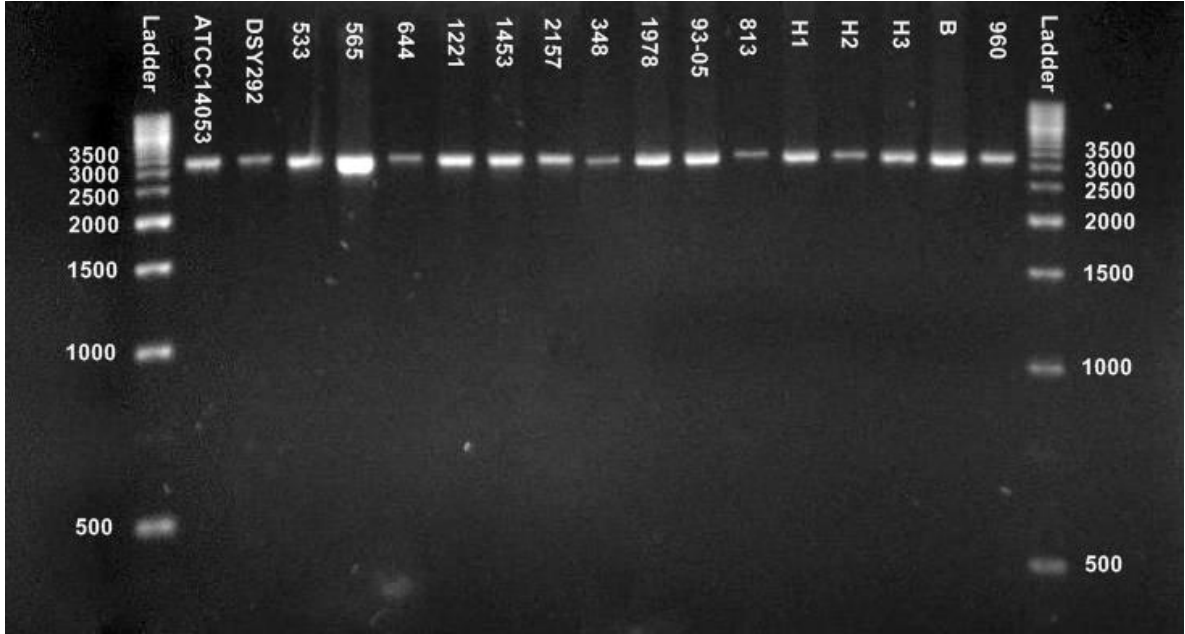
	910	920	930	940	950	960
					
ATCC14053	STGEPQVCYAQSPSYNASLSNIINNESTGRSPATSTSINQPMNENYDLFNDYLIDNSAV					
533					
565G.....					
644L.....					
1221					
1453L.....					
2157					
348					
1978					
9305					~~~
813L.....					
DSY292L.....					
H1					
H2					
H3					
BL.....					
960					
	970	980				
					
ATCC14053	NLPFSQFNNLPNFFFDNNLGI*					
533*					
565*					
644*					
1221*					
1453*					
2157*					
348*					
1978*					
9305	~~~~~					
813*					
DSY292*					
H1*					
H2*					
H3*					
B*					
960*					

Şekil-3. İncelenen *C. albicans* suşlarının *TAC1* gen bölgelerinde dizi analizi sonucunda saptanan amino asit değişiklikleri

6.2. *MRR1* PZT - Dizi Analizi Sonuçları

6.2.1. *MRR1* PZT Sonuçları

Çalışılan *C. albicans* suşlarının tümünde, PZT ile 3327 bazlık *MRR1* bölgesi çoğaltıldı ve dizi analizi yapılmak üzere gönderildi. Yapılan PZT sonrası elde edilen ürünlerin jel görüntüleri, şekil-4'de izlenmektedir.



Şekil-4. Çalışılan *C.albicans* suşlarına ait 3227 baz uzunluğundaki *MRR1* gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri

6.2.2. *MRR1* Dizi Analizi Sonuçları

Dizi analizi sonucunda incelenen 17 *C. albicans* suşundan yalnızca ikisine ait *MRR1* dizilerinin tamamı elde edilebildi. 13 suşa ait dizilerin başında, sonunda ya da her iki tarafında kayıplar olduğu görüldü. Diğer iki suşa ait *MRR1* gen dizisi ise, dizi analizi yapılmak üzere iki defa PZT ürünü gönderildiği halde belirlenemedi. Gelen sonuçlar incelendiğinde, 491. nükleotidden sonra 1221 no'lu suşta 24 nükleotidlik, 533, 565, 2157, 1978, 813, H1, H2, H3 ve B suşlarında ise 12 nükleotidlik insersiyon dizileri olduğu görüldü. Her suşa ait *MRR1* gen dizisinin elde edilebilen miktarı tablo-7'de gösterilmiştir.

Dizi analiziyle elde edilen nükleotid dizileri amino asit dizilerine çevrildi. Amino asit dizileri, flukonazole duyarlı ATCC14053 *C. albicans* suşuna ait dizi ve dizi analizi sonucunda bu dizinin tamamının elde edilememesi nedeniyle, flukonazol duyarlı yabancı *C. albicans* olan SC5314'ün "Candida Genome Database"den sağlanan *MRR1* dizisinin amino asit dizisine çevrilmesiyle elde edilen dizi ile karşılaştırıldı.

Nokta mutasyonlar belirlendi. Nükleotid dizilerinde görülen ancak amino asit değişikliğine neden olmayan sessiz mutasyonlar dikkate alınmadı.

Tablo-7. Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının *MRR1* gen dizilerinin elde edilebilme oranı

Suş No	Dizi analizi ile saptanan	Dizinin başından kayıp	Dizinin sonundan kayıp	Elde edilen nükleotid dizisi oranı*
Nükleotid Sayısı				%
ATCC14053	2667	648	12	80,16
533	3165	81	93	94,79
565	3318	12	9	99,37
644	-			0,00
1221	3225	117	9	96,24
1453	3327	-	-	100,00
2157	2856	483	-	85,53
348	-			0,00
1978	3252	87	-	97,39
93-05	3327	-	-	100,00
813	3315	15	9	99,28
DSY292	2655	672	-	79,80
H1	3261	78	-	97,66
H2	3207	132	-	96,05
H3	2712	615	-	81,51
B	3216	123	-	96,32
960	3236	15	76	97,26

**MRR1* gen bölgesinin uzunluğu 491. nükleotidden sonra görülen insersiyon dizisinin varlığına ya da yokluğuna göre değişmektedir. Yüzdeler bu durum dikkate alınarak hesaplanmıştır.

6.2.2.1. SC5314 *C. albicans* Suşu Referans Alındığında *MRR1* Dizi Analizi Sonuçları

Çalışılan suşlara ait *MRR1* dizi analizi sonuçları, flukonazol duyarlı yabancı *C. albicans* SC5314'e ait dizi ile karşılaştırıldığında, flukonazole duyarlı *C. albicans* suşlarının *MRR1* bölgelerinde I3M, P19L, G75R, V127A, S168P, L171P, V341E, N514I, K531I, Y532N, I538M, L592F, N937K, E1020Q, F1032L, S10S7L mutasyonları ve flukonazole kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı *C. albicans* suşlarının bu bölgelerinde S16I, T73K, L171P, L592F, E1020Q mutasyonları saptandı.

Flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarının *MRR1* dizileri aynı dizi ile karşılaştırıldığında ise, G75R, S168P, L248V, H574V, P683H, N937K, E1020Q, F1032L, S1037L, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları belirlendi. Bu mutasyonlardan H574R(n=2), P683H(n=1), S1039F(n=1),

S1041L(n=1), T1065R(n=1), P1066A(n=1), A1068D(n=1), L1069F(n=1) ve N1071K (n=1) mutasyonları çalışmaya alınan suşlardan yalnızca flukonazole dirençli olanlarda görüldü.

SC5314 *C. albicans* suşunun *MRR1* dizisi referans olarak alındığında diğer suşlarda gözlenen mutasyonlar, tablo-8'de gösterilmiştir.

Tablo-8. SC5314 *C. albicans*'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen *MRR1* mutasyonları

Suş No	Flukonazole Duyarlılık Kategorisi*	Amino Asit Değişimi**
ATCC14053	Duyarlı	L248V V341E N746S E1020Q
533	Duyarlı	G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
565	Duyarlı	P19L G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
1221	Duyarlı	V127A L171P V341E N514I K531I Y532N I538M E1020Q
1453	Duyarlı	I3M L248V V341E E1020Q
2157	Duyarlı	L171P L248V L592F E1020Q
1978	Ki-Du	T73K E1020Q
93-05	Ki-Du	L171P L592F
813	Ki-Du	S16I T73K L171P E1020Q
DSY292	Dirençli	P683H
H1	Dirençli	G75R S168P H574R N937K E1020Q F1032L S1037L
H2	Dirençli	G75R S168P H574R N937K E1020Q F1032L S1037L
H3	Dirençli	L248V E1020Q
B	Dirençli	G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
960	Dirençli	S1039F S1041L T1065R P1066A A1068D L1069F N1071K

*Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

**Koyu yazılan mutasyonlar sadece dirençli suşlarda görülmüştür.

6.2.2.2. ATCC14053 *C. albicans* Suşu Referans Alındığında *MRR1* Dizi Analizi Sonuçları

Araştırılan suşların dizi analizi sonucunda elde edilen *MRR1* dizileri, araştırmanın planlanma aşamasında ön görüldüğü şekilde flukonazole duyarlı suş olan ATCC14053'ün dizisi ile karşılaştırıldığında, söz konusu suşa ait nükleotid dizisindeki eksikliğe bağlı olarak, baştan ilk 216 amino asit ve sondan dört amino asit değerlendirilemedi. Bununla beraber elde edilen kısım referans olarak alındığında, çalışılan suşların *MRR1* bölgelerinde aşağıda belirtilen amino asit değişiklikleri bulundu:

ATCC14053 ile karşılaştırıldığında flukonazole duyarlı *C. albicans* suşlarında görülen mutasyonlar sırasıyla V248L, E341V, N514I, K531I, Y532N, I538M, L592F, S746N, N937K, Q1020E, F1032L, S1037L şeklinde oldu. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı *C. albicans* suşlarında görülen mutasyonlar ise V248L, E341V, L592F, S746N ve Q1020E idi.

Flukonazole dirençli grupta belirlenen mutasyonlar V248L, E341V, H574R, P83H, S746N, N937K, Q1020E, F1032L, F1037L, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F, N1071K olarak sıralandı.

Sadece dirençli suşlarda gözlenen mutasyonlar açısından, referans dizi olarak SC5314'e ait dizinin kullanılması ile ATCC14053'e ait dizinin kullanılması arasında bir fark olmadığı görüldü. Her iki durumda da sadece dirençli suşlarda gözlenen mutasyonlar H574V, P683H, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K şeklinde belirlendi.

Çalışılan suşların *MRR1* dizilerinin ATCC14053 suşuna ait dizi ile karşılaştırıldığında bulunan mutasyonlar tablo-9'da gösterilmiştir.

Tablo-9. ATCC14053 *C. albicans* suşuna ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen *MRR1* mutasyonları

Suş No	Flukonazole Duyarlılık Kategorisi*	Amino Asit Değişimi**
ATCC14053	Duyarlı	- (Referans dizi)
533	Duyarlı	V248L E341V S746N N937K F1032L S1037L
565	Duyarlı	V248L E341V S746N N937K F1032L S1037L
1221	Duyarlı	V248L N514I K531I Y532N I538M S746N
1453	Duyarlı	S746N
2157	Duyarlı	E341V L592F S746N
1978	Ki-Du	V248L E341V S746N
93-05	Ki-Du	V248L E341V L592F S746N Q1020E
813	Ki-Du	V248L E341V S746N
DSY292	Dirençli	V248L E341V P683H S746N Q1020E
H1	Dirençli	V248L E341V H574R S746N N937K F1032L S1037L
H2	Dirençli	V248L E341V H574R S746N N937K F1032L S1037L
H3	Dirençli	E341V S746N
B	Dirençli	V248L E341V S746N N937K F1032L S1037L
960	Dirençli	V248L E341V S746N Q1020E S1039F S1041L T1065R P1066A A1068D L1069F N1071K

*Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

*Koyu yazılan mutasyonlar sadece dirençli suşlarda görülmüştür.

6.2.2.3. DSY292 *C. albicans* Suşu Referans Alındığında *MRR1* Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmaya alınan flukonazole dirençli suşlardan DSY292'nin daha önceki yayınlarda *MRR1* gen bölgesinde P683H mutasyonuna sahip olduğu ve *MDR1* atılım pompasını fazla eksprese ettiği bildirilmiş olması nedeniyle, bu suş da referans olarak alındı. Ancak söz konusu suşa ait dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisindeki eksikliklerden dolayı, ilk 224 amino asit değerlendirilemedi. DSY292 suşuna ait

MRR1 dizisi referans olarak alındığında, çalışmaya alınan suşlarda belirlenen mutasyonlar tablo-10'da gösterilmiştir.

Tablo-10. Flukonazole dirençli DSY292 *C. albicans*'a ait dizi referans alındığında çalışılan suşlarda görülen *MRR1* mutasyonları

Suş No	Flukonazole Duyarlılık Kategorisi*	Amino Asit Değişimi**
ATCC14053	Duyarlı	L248V V341E N746S E1020Q
533	Duyarlı	G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
565	Duyarlı	P19L G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
1221	Duyarlı	V127A L171P V341E N514I K531I Y532N I538M E1020Q
1453	Duyarlı	I3M L248V V341E E1020Q
2157	Duyarlı	L171P L248V L592F E1020Q
1978	Ki-Du	T73K E1020Q
93-05	Ki-Du	L171P L592F
813	Ki-Du	S16I T73K L171P E1020Q
DSY292	Dirençli	- (Referans dizi)
H1	Dirençli	G75R S168P H574R N937K E1020Q F1032L S1037L
H2	Dirençli	G75R S168P H574R N937K E1020Q F1032L S1037L
H3	Dirençli	L248V E1020Q
B	Dirençli	G75R S168P N937K E1020Q F1032L S1037L
960	Dirençli	S1039F S1041L T1065R P1066A A1068D L1069F N1071K

*Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı

**Koyu yazılan mutasyonlar sadece dirençli suşlarda görülmüştür.

Çalışmaya alınan 15 *C. albicans* suşunun *MRR1* bölgelerinin dizi analiziyle saptanan nükleotid dizileri şekil-5'te, amino asit dizileri ise şekil-6'da SC5314'e ait dizi beraberinde izlenmektedir.

	10	20	30	40	50	60
					
SC5314	ATGTCAATTGCCACCACCCCTATAGAAACACCTAAAAGTCCTAAAAGTACAGAACCCCAA					
ATCC14053	~~~~~					
533	~~~~~					
565	~~~~~.....T.....					
1221	~~~~~					
1453G..G.....					
2157	~~~~~					
1978	~~~~~					
9305G.....					
813	~~~~~.....T.....					
DSY292	~~~~~					
H1	~~~~~					
H2	~~~~~					
H3	~~~~~					
B	~~~~~					
960	~~~~~.....					

	70	80	90	100	110	120
					
SC5314	GTTTCGGAAAAGAAAAAAGTCAGTACAGTATGCACAAATTGTCGAAAAAGAAAAGATAAGA					
ATCC14053	~~~~~					
533	~~~~~.....					
565					
1221	~~~~~.....					
1453					
2157	~~~~~					
1978	~~~~~.....					
9305					
813					
DSY292	~~~~~					
H1	~~~~~.....					
H2	~~~~~					
H3	~~~~~					
B	~~~~~					
960					

	130	140	150	160	170	180
					
SC5314	TGTGATCGTCAACATCCTTGTAATAATTGTATCAAAAAGCAAAAAACACAATGCCTGTGTT					
ATCC14053	~~~~~					
533					
565					
1221					
1453					
2157	~~~~~					
1978					
9305					
813					
DSY292	~~~~~					
H1					
H2	~~~~~.....					
H3	~~~~~					
B	~~~.....					
960					

```

          190          200          210          220          230          240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      TACGATGATGGACAAGTTAGTCCTGCAAATTTCTTGACCAATGGATCATCACACGGAAAC
ATCC14053  ~~~~~
533        .....A.....T...
565        .....A.....T...
1221       .....
1453       .....
2157       ~~~~~
1978       .....AA.....
9305       .....
813        .....AA.....
DSY292     ~~~~~
H1         .....A.....T...
H2         .....A.....T...
H3         ~~~~~
B          .....A.....T...
960        .....

```

```

          250          260          270          280          290          300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      ACTGTCCCAGAATCACGTCCATATGAAGAAAGTGCAAGAATCCCAATTCGGTTTGATGCC
ATCC14053  ~~~~~
533        .....
565        .....
1221       .....G.....T
1453       .....
2157       ~~~~~
1978       .....
9305       .....G.....
813        .....
DSY292     ~~~~~
H1         .....
H2         .....
H3         ~~~~~
B          .....
960        .....

```

```

          310          320          330          340          350          360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      GAAGCTCCTCGAAAGAACTGAAGCCGAATACACCAAATAATGAACGTAAAAATTCAAAG
ATCC14053  ~~~~~
533        .....
565        .....
1221       .....
1453       .....
2157       ~~~~~
1978       .....
9305       .....
813        .....
DSY292     ~~~~~
H1         .....
H2         .....
H3         ~~~~~
B          .....
960        .....

```

```

          370      380      390      400      410      420
SC5314      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053    AAATCACCAGACAATACTGTTGCCAATAATCAACAAACAGCTTCTGAAAATGAAGTCACT
533          .....
565          .....
1221          .....CC.....
1453          .....
2157          ~~~~~
1978          .....
9305          .....
813          .....
DSY292       ~~~~~
H1           .....
H2           .....
H3           ~~~~~
B            .....
960          .....

```

```

          430      440      450      460      470      480
SC5314      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053    ATTACGTTGAGTGAATTGAATATGTTGAAACAAAGACTACAAAATATAGAAGCTAATATC
533          .....T...G.....
565          .....T...G.....
1221          .....T...G.....
1453          .....
2157          ~~~~~
1978          .....T...G.....
9305          .....T...G.....
813          .....T...G.....
DSY292       ~~~~~
H1           .....T...G.....
H2           .....T...G.....
H3           ~~~~~
B            .....T...G.....
960          .....T...G.....

```

```

          490      500      510      520      530      540
SC5314      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053    AATGCTCAATC-----CAACCCTCAATCCAACCCTCTGTAT
533          .....-----CAACCCTCAATC.....C.....
565          .....-----CAACCCTCAATC.....C.....
1221          .....TAACCCTCAATCCAACCCTCAATC.....C.....
1453          .....-----
2157          ~~~.....-----TAACCCTCAGTC.....C.....
1978          .....-----TAACCCTCAATC.....C.....
9305          .....-----T.....
813          .....-----TAACCCTCAATC.....C.....
DSY292       ~~~~~
H1           .....-----CAACCCTCAATC.....C.....
H2           .....-----CAACCCTCAATC.....C.....
H3           ~~~~~
B            .....-----CAACCCTCAATC.....C.....
960          .....-----

```

```

          550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      GTTCCACAAACTCCGGCTTATCCTACTCAACCAAACATTTTACCTCCACCAGTCCTGTTC
ATCC14053  ~~~~~
533          .....A..A.....G..G....G.....
565          .....A..A.....G..G....G.....
1221         .....C..A..A....C.....
1453         .....
2157         .....C.....
1978         .....C.....
9305         .....
813          .....C.....
DSY292     ~~~~~
H1         .....A..A.....G..G....G.....
H2         .....A..A.....G..G....G.....
H3         ~~~~~
B          .....A..A.....G..G....G.....
960         .....

```

```

          610      620      630      640      650      660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      AATTCCTGGAGTCCTAAGCAAAGTAATGAAAGGGTCATGTTTAGTCCTCAACAGAGATTG
ATCC14053  ~~~~~
533          .....A.....
565          .....A.....
1221         .....
1453         .....
2157         .....
1978         .....A.....
9305         .....
813          .....A.....
DSY292     ~~~~~
H1         .....A.....
H2         .....A.....
H3         ~~~~~
B          .....A.....
960         .....

```

```

          670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SC5314      ACTACCAATTACAATGTGTCCCACACACGAGGGCAATCTCCTTCAATTCAACTACCTCCA
ATCC14053  ~~~~~
533          .....
565          .....
1221         .....T.....
1453         .....
2157         .....T.....
1978         .....
9305         .....A.....
813          .....
DSY292     ~~~~~
H1         .....
H2         .....
H3         .....T.....
B          .....
960         .....A.....

```

	730	740	750	760	770	780
SC5314
ATCC14053	CTTTCTTTTAAAGACACACCCAGGGCTAGTATAGACTCAGCTCCCTTATATAGTGAAATG					
533						G
565						G
1221	T					
1453						G
2157					G	G
1978					G	
9305	T					
813						G
DSY292						
H1						G
H2						G
H3					G	
B						G
960	T					

	790	800	810	820	830	840
SC5314
ATCC14053	TCACCGCCACGAAGTGACTTGATTGCTTCAAGTTTGACTTCCCCGGAATCGATCCAAATG					
533					A	
565	A					A
1221						A
1453						
2157						
1978						A
9305						
813						A
DSY292						A
H1	A					A
H2	A					A
H3						A
B	A					A
960						

	850	860	870	880	890	900
SC5314
ATCC14053	TCTGTTTCTGGAGATGTCGTCGGGGTTAACCATATTTGAACGAGACAGAGACTATCAAT					
533						A
565	C	T				A
1221	C	T				
1453						
2157						A
1978						A
9305						A
813						A
DSY292						A
H1	C	T				A
H2	C	T				A
H3						A
B	C	T				A
960						

	910	920	930	940	950	960
SC5314					
ATCC14053	TTTTATGATGGATACACATCTATCTGTGTCAGAGACTTTAGAAAGAGTGAATCATGGACCG					
533C..T.....					
565C..T.....					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1C..T.....					
H2C..T.....					
H3					
BC..T.....					
960					

	970	980	990	1000	1010	1020
SC5314					
ATCC14053	TTTGCATGGTCTTCATTAATGAGAAAAGATAAAGCCTTGAGTTCATTATGGAATCATATA					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
SC5314					
ATCC14053	CTTAAGAAAAAGGAAAAAAGAATGTAGCTTCACAAACGTTTGTTCGGTCAAGATGTT					
533	..C.....A.....					
565	..C.....					
1221	..C.....A.....					
1453	..C.....A.....					
2157	..C.....					
1978	..C.....					
9305	..C.....					
813	..C.....					
DSY292	..C.....					
H1	..C.....					
H2	..C.....					
H3	..C.....					
B	..C.....					
960	..C.....					

	1270	1280	1290	1300	1310	1320

SC5314	TATGAGGAACAAGTCAACATGGAGTTGCAATTGGTTCGATAGAATTCATCAACAATTACCG					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1330	1340	1350	1360	1370	1380

SC5314	AAAAAGAAAGTTTTATGGAAATTGATTGATAGGTTTTTCAGTTTACTTTATCCATTTATG					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1390	1400	1410	1420	1430	1440

SC5314	CCATTTTTAGATGAAATTGATTTTCAGAGAAAGTGTTACAAAAATCATTGGTGAAACGGAA					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
					
SC5314	TACAAGGATGAAAAAATAAAGGAGTTAAAAGTAGAAAAACGATTAGATTTGGCCGTGATT					
ATCC14053A.....					
533A.....					
565A.....					
1221					
1453					
2157A.....					
1978A.....					
9305					
813A.....					
DSY292					
H1A.....					
H2A.....					
H3A.....					
BA.....					
960					

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
					
SC5314	GGTGTTTTACTTATTATACTTCGAATGAGTTATTTATCCTTGTTTTGCAATAAAGAAAAGT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
					
SC5314	GTAAATGAAATGAGATTGAAAACCACTGATCCATCCCCTGAAGCACAAAGACATGAAATAT					
ATCC14053					
533					
565					
1221T.....A.....T.A..					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	1810	1820	1830	1840	1850	1860	
						
SC5314	AACTCTATGGTTGTCAGAATGGCTTATTCTATGGGTCTAAATAGAGAACCAGATAATTTT						
ATCC14053C.....T.....A.....A.....G.....	
533AT.....G.....						
565AT.....G.....						
1221C.....						
1453C.....				G.....	
2157C.....						
1978C.....						
9305C.....				G.....	
813C.....						
DSY292C.....						
H1			AT.....G.....	
H2			AT.....G.....	
H3C.....				G.....	
B			AT.....G.....	
960C.....T.....				G.....

	1870	1880	1890	1900	1910	1920	
						
SC5314	AAGGATGTTTTAAATGACAAAAGACAAAACCATTTAGGGAGAAAAGATATGGCATTTTTTT						
ATCC14053C.....T.....G.....				
533						
565						
1221						
1453			T.....			
2157		T.....G.....			
1978						
9305		T.....G.....			
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3			T.....			
B						
960			T.....			

	1930	1940	1950	1960	1970	1980
					
SC5314	GTTATTGGAGATGTACATAATTCTTACGCTTTCGGAAC TCCAAAATTAATTGGTGATGAT					
ATCC14053					
533G.....					
565G.....					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1G.....					
H2G.....					
H3					
BG.....					
960					

	1990	2000	2010	2020	2030	2040

SC5314	TTTTATGACACAAAAGTTCCATTTATAGAAGAAGGCAATGAAAACCTTGATTGATAAGAGT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2050	2060	2070	2080	2090	2100

SC5314	TTGGATCAATATGTAACCAAACCTGGTGTTCCTGGGTATTTTCTGATTTACAACCTCGGTA					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292 A					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2110	2120	2130	2140	2150	2160

SC5314	GATCAAATATTGAAATTGATTCTTAGCGTATCGAGACGACTGAAAGTTTCAGAGATTGT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2170	2180	2190	2200	2210	2220
					
SC5314	AAAATATTGAACCAATTTGAGATTGGTATAGCTGAACAATATGGAACCTTTGAGTGATTGT					
ATCC14053A.....					
533					
565					
1221					
1453					
2157A.....					
1978A.....					
9305					
813A.....					
DSY292					
H1					
H2					
H3A.....					
B					
960					

	2230	2240	2250	2260	2270	2280
					
SC5314	TTAAAGCCAAAAGAGAATTTAATCCATATTTTTGCTCGTAATATGCCAGTGAAAATGTAT					
ATCC14053G.....					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2290	2300	2310	2320	2330	2340
					
SC5314	ATTTTCATTGAAATCATTCTTGGTGTTCAGTATACTTTCATTTGTTTTTGTATTATGAACAC					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2530	2540	2550	2560	2570	2580
SC5314					
	CGAGTGAATATGAGCATTACAGAATGAAGAATCTGCAACACCATGCTGAAAATTGTAAA					
ATCC14053C.....		C.....T.....	
533C.....					
565C.....					
1221				T.....	
1453				T.....	
2157C.....		C.....T.....	
1978C.....		C.....T.....	
9305				T.....	
813C.....		C.....T.....	
DSY292				T.....	
H1C.....					
H2C.....					
H3C.....		C.....T.....	
BC.....					
960C.....			T.....	

	2590	2600	2610	2620	2630	2640
SC5314					
	AAAGATGATTTTTACTATTTCGTATTACAAGGAATTGTGCAAATTTCTTCTTGTGTTGACA					
ATCC14053	A.....G.....T.....		
533	A.....G.....T.....		
565	A.....G.....T.....		
1221		G.....			
1453		G.....			
2157	A.....G.....T.....		
1978	A.....G.....T.....		
9305	A.....G.....			
813	A.....G.....T.....		
DSY292		G.....T.....		
H1	A.....G.....T.....		
H2	A.....G.....T.....		
H3	A.....G.....T.....		
B	A.....G.....T.....		
960	A.....G.....			

	2650	2660	2670	2680	2690	2700
SC5314					
	AGATGTGCCGAAGTTGGAATTGCAGCTGTATCCAAATTAAGTACTAGATACTATTATGCG					
ATCC14053						
533T.....					
565T.....					
1221						
1453						
2157						
1978						
9305						
813						
DSY292						
H1T.....					
H2T.....					
H3						
BT.....					
960						

	2710	2720	2730	2740	2750	2760

SC5314	TGGAAAGATTACCAAGGGTCACAACCTTTTGTGAAAACCATTACCAGTATGGAGTTTAT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2770	2780	2790	2800	2810	2820

SC5314	GAAAAAGAGTCAACGAATGCTCAAGAAATTACATTGCCAAAGTACAAGTTGGAACAAATT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	2830	2840	2850	2860	2870	2880

SC5314	GCTGATTTGGAAAACATTTGTGAAGTGGCATTGAATAAATTGGGTAAAACGCTGGTTATG					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	3070	3080	3090	3100	3110	3120
SC5314					
ATCC14053	ATGTTATCTTTGAAAAGTGAAGAAGCCCAACAGCAAAGGCAACAGGAACTGCAGCCGTTT					
533	C.....				A
565	C.....				A
1221	C.....				
1453	C.....				
2157	C.....				
1978	C.....				
9305					
813	C.....				
DSY292					
H1	C.....				A
H2	C.....				A
H3	C.....				
B	C.....				A
960					

	3130	3140	3150	3160	3170	3180
SC5314					
ATCC14053	ACAAGTTCGCAGTCACAATCTCAATCGCCTTTAACTGGCCAATCAAGGTTACATGCCA					
533	A.T.....	A.....			
565	A.T.....	A.....			
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1	A.T.....	A.....			
H2	A.T.....	A.....			
H3					
B	A.T.....	A.....			
960		T.....	T.....		

	3190	3200	3210	3220	3230	3240
SC5314					
ATCC14053	CGACCAGAACTGAGGAGAGGCAGTTACTATGGCAATACACCTTTTGCTCTTGAGAACTTG					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960	A.....		A.....	G.G.....	A.T.....	G.....

	3250	3260	3270	3280	3290	3300
					
SC5314	AATTTTGGATGGATTTGGTGGACAAAGTAAAAGTTCTAACAATGGAGAAGCTGATCTTAGT					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					
	3310	3320	3330	3340	3350	
					
SC5314	TCATTTGATTTCTTTGTTGATTTACCATTTGATCAACTTTTTACCAATTAA					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

Şekil-5. Çalışmaya alınan 15 *C. albicans* suşunun *MRR1* gen bölgesinde dizi analizi sonucunda saptanan nükleotid değişiklikleri

1221 suşunda 492. pozisyonunda bulunan 24 nükleotid uzunluğundaki insersiyon dizisi, diğer suşlara ait dizilerde şekil üstünde gösterilen cetvele göre kaymaya neden olmaktadır.

```

          10          20          30          40          50          60
SC5314    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053 MSIATTPPIETPKSPKSTEPQVRKRKKVSTVCTNCRKRKIRCDRQHPCNNCIKSKKHACV
533       ~~~~~
565       ~~~~.....L.....
1221      ~~~~~
1453      ..M.....
2157      ~~~~~
1978      ~~~~~
9305      .....
813       ~~~~.....I.....
DSY292    ~~~~~
H1        ~~~~~
H2        ~~~~~
H3        ~~~~~
B         ~~~~~
960       ~~~~~

```

```

          70          80          90          100         110         120
SC5314    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053 YDDGQVSPANFLTNGSSHGNTVPESRPYEEESARIPIRFDAEAPRKKLKPNTPNNERKNSK
533       .....R.....
565       .....R.....
1221      .....
1453      .....
2157      ~~~~~
1978      .....K.....
9305      .....
813       .....K.....
DSY292    ~~~~~
H1        .....R.....
H2        .....R.....
H3        ~~~~~
B         .....R.....
960       .....

```

```

          130         140         150         160         170         180
SC5314    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCC14053 KSPDNTVANNQOTASENEVTITLSELNMLKORLQNI EANINAQX~~~~~XNPQSNPLY
533       .....XNPQS...P...
565       .....XNPQS...P...
1221      .....A.....SNPQSNPQS...P...
1453      .....
2157      ~~~~~XNPQS...P...
1978      .....XNPQS...P...
9305      .....
813       .....XNPQS...P...
DSY292    ~~~~~
H1        .....XNPQS...P...
H2        .....XNPQS...P...
H3        ~~~~~
B         .....XNPQS...P...
960       ~~~~~

```

	190	200	210	220	230	240
					
SC5314	VPQTPAYPTQPNILPPPVLFNWSWSPKQSNERVMSFPQQRLTTNYNVSHTRGQSPSIQLPP					
ATCC14053	~~~~~.....					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292	~~~~~.....					
H1					
H2					
H3	~~~~~.....					
B					
960					

	250	260	270	280	290	300
					
SC5314	LSFKDTPRASIDSAPLYSEMSPPRSDLIASSLTSPESIQMSVSGDVVGVNPNYLNETETIN					
ATCC14053V.....					
533					
565					
1221					
1453V.....					
2157V.....					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3V.....					
B					
960					

	310	320	330	340	350	360
					
SC5314	FYDGYTSICVRDFRRVNHGPFPAWSSLMRKDKALSSLWNHILKKKEKKNVASQTFVFGQDV					
ATCC14053E.....					
533					
565					
1221E.....					
1453E.....					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	730	740	750	760	770	780
					
SC5314	KILNQFEIGIAEQYGTLS DCLKPKENLIHIFARNMPVKMYISLKSFLVSVYFHLFLYYEH					
ATCC14053S.....					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	790	800	810	820	830	840
					
SC5314	KNDSLSFFYLRLKILKTGAGDIMPHYFELGNSEVVCDMVINPKLIQIIHKANQINIALII					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	850	860	870	880	890	900
					
SC5314	RVNMSIYRMKNLQHHAENCKKDDFYYSYYKELCKFSSCLTRCAEVGIAAVSKLSTRYYA					
ATCC14053					
533					
565					
1221					
1453					
2157					
1978					
9305					
813					
DSY292					
H1					
H2					
H3					
B					
960					

	910	920	930	940	950	960	
SC5314	WKITKGNHFLKLTITSMEFYEKESTNAQEITLPKYKLEQIADLENICEVALNKLGLKTLVM					
ATCC14053						
533K.....						
565K.....						
1221						
1453						
2157						
1978						
9305						
813						
DSY292						
H1K.....						
H2K.....						
H3						
BK.....						
960						

	970	980	990	1000	1010	1020	
SC5314	GDEFCSNVNYKKYKGDQTYSTSSSSSTPNKDSPLDSRKYTNDFGLDLVNNQEIDKIWLQ					
ATCC14053						
533						
565						
1221						
1453						
2157						
1978						
9305						
813						
DSY292						
H1						
H2						
H3						
B						
960						

	1030	1040	1050	1060	1070	1080	
SC5314	MLSLKSEEAAQQQRQOELQPFTSSQSOSQSPLTLANQGYMPRPELRRGSYYGNTPFALENL					
ATCC14053Q.....						
533Q.....L..L.....						
565Q.....L..L.....						
1221Q.....						
1453Q.....						
2157Q.....						
1978Q.....						
9305						
813Q.....						
DSY292						
H1Q.....L..L.....						
H2Q.....L..L.....						
H3Q.....						
BQ.....L..L.....						
960F.L.....RA.DF.K.....						

	1090	1100	1110
		
SC5314	NFDGFGGQSKSSNNGEADLSSFDFVLDLPFDQLFTN*		
ATCC14053~::~		
533~::~		
565~::~		
1221~::~		
1453*		
2157*		
1978*		
9305*		
813~::~		
DSY292*		
H1*		
H2*		
H3*		
B*		
960X~::~		

Şekil-6. Çalışmaya alınan 15 *C. albicans* suşunun *MRR1* gen bölgesinde dizi analizi sonucunda saptanan amino asit değişiklikleri

1221 no'lu suшта bulunan 8 aminoasit uzunluğundaki insersiyon dizisi, diğer suşlara ait dizilerde şekil üstünde gösterilen cetvele göre kaymaya neden olmaktadır. 164. amino asitten sonraki mutasyonlar, literatürde bildirilen mutasyonlar ile karşılaştırılırken, cetvele göre belirlenen amino asit sayısından 8 çıkartılmalıdır.

7. TARTIŞMA

Son birkaç on yılda, kanser kemoterapisi, organ transplantasyonu gibi nedenlerle bağışık yanıtı baskılayıcı tedavi alan hastaların ve AIDS hastalarının sayısının artmasına paralel olarak, fırsatçı mantar infeksiyonlarının sıklığının arttığı bildirilmektedir. Bu infeksiyonlardan en sık sorumlu olan mantarlar *Candida* türleri olup, maya benzeri bu mantarlar hastane kökenli KDI'nın ABD'de dördüncü, Avrupa ülkelerinde ise altıncı en sık nedeni olarak rapor edilmektedir. Farklı çalışmalarda *Candida* türleri ile oluşan KDI ve invazif infeksiyonların mortalitesinin %30-50 olduğu gösterilmiştir (2–6,69,70).

Candida türleri tarafından oluşturulan infeksiyonlardan en sık sorumlu tür olarak karşımıza *C. albicans* çıkmaktadır. *C. albicans* günümüzde, diğer türlerle meydana gelen infeksiyonların sayısında görülen artışa rağmen, her türlü *Candida* infeksiyonundan en sık soyutlanan tür olmaya ve en önemli insan patojeni mantar olmaya devam etmektedir (1,21,23,69,70).

C. albicans'ın neden olduğu infeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan sınırlı sayıda antifungal ilaç bulunmakta olup, bunlardan flukonazol, oral kullanılabilmesi, yan etkilerinin az olması, genellikle iyi tolere edilmesi gibi nedenlerle halen ilk ve en sık tercih edilen ajanlardan biridir. *C.albicans*'da flukonazole direnç genel olarak nadir (%1-2.3) görülmekle beraber, yukarıda belirtilen nedenlerle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, uzun süreli ve sık kullanım sonrasında direnç gelişebildiği bildirilmiştir (3,8,9,56).

C.albicans'da flukonazole direnç gelişimi dört farklı mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 pompaları ile antifungal moleküllerinin hücre dışına atılması, ilacın hedefi olan lanosterol demetilaz enziminde değişim, bu enzimi sentezleyen *ERG11* geninin fazla ekspresyonu ve ilacın bloke ettiği metabolik yollara alternatif metabolik yolların kullanılması olarak sıralanabilir. Bu mekanizmalardan bir ya da fazlası beraber çalışabilmekte ve basamak tarzı bir direnç paterni göstermektedir (8–11).

Flukonazole dirençli *C. albicans* suşları ile yapılan çalışmalar, flukonazol direncine en sık rol oynayan mekanizmanın atılım pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda ilacın hücre dışına taşınması olduğunu göstermiştir (10).

Dirençli suşlarda atılım pompalarının fazla ekspresyonunun mekanizmaları araştırıldığında, bu pompaları kodlayan genlerin promoter bölgeleri ve bu promoter

bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri ön plana çıkmıştır. Promoter bölgelerdeki mutasyonların fonksiyon kaybına yol açtığı bununla beraber promoter bölgeler üzerinde saptanan DRE, BRE gibi çeşitli yanıt elemanlarının transkripsiyon faktörleri ile uyarılmasının ise pompaların aşırı ekspresyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu elemanları tanıyan ve atılım pompa genlerinin regülasyonunu düzenleyen Tac1p, Mrr1p, Mcm1p, Cap1p ve NDT80 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bunlardan Tac1p *CDR1* ve *CDR2* genlerine özgün iken Mrr1p, Mcm1p ve Cap1p *MDR1* genine özgündür. NDT80'in ise başlıca *CDR1* "promoter"ine bağlanmakla beraber *CDR2* ve *MDR1*'in "promoter" bölgelerine de bağlanabildiği gösterilmiştir. Cap1p, oksidatif strese yanıtta önemli olmaktadır, *CAP1* geninin delesyonu flukonazol direncinin kaybına sebep olmamıştır. NDT80 üzerine çalışan araştırmacılar, flukonazol direncine katkıda bulunduğuna dair kanıta ulaşamamıştır. Mcm1p, *C. albicans* metabolizmasında birden fazla fonksiyonu bulunan MADS Box ailesinden bir transkripsiyon faktörüdür. *MDR1* üzerinde etkisi olduğundan kuşku duyulmamakla beraber, yaşamsal nitelikli olduğu için eksikliğinin net sonucu değerlendirilememektedir ve flukonazol direncindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Tanımlanan transkripsiyon faktörlerinden, atılım pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda ve flukonazol direncinde doğrudan rol oynadığı net olarak gösterilenler *CDR1* ve *CDR2* için Tac1p, *MDR1* için ise Mrr1p'dir. Atılım pompalarının fazla ekspresyonu ile ortaya çıkan flukonazol direncinde, bu transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerde heterozigotluğun kaybı beraberinde fonksiyon kazandırıcı tipteki nokta mutasyonlarının rol oynadığı gösterilmiştir (58–62,71–77).

Coste ve arkadaşları yaptıkları çeşitli araştırmalarda *TAC1* genini incelemiş ve ardışık yayınlarda 12 farklı pozisyonda 17 adet fonksiyon kazandırıcı nitelikte nokta mutasyon tanımlamıştır (58,59,71,72). Buna ek olarak Siikala ve arkadaşları, *TAC1* geninde beş pozisyonda altı tane daha benzer özellikte mutasyon bildirmiştir (60). *MRR1* geni üzerine çalışan Dunkel ve arkadaşları, yaptıkları araştırmalarda bu gen üzerinde 13 pozisyonda 14 fonksiyon kazandırıcı nokta mutasyon tanımlamıştır (62). Her iki gende tanımlanan fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar tablo-11'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 atılım pompalarını eksprese etme düzeyleri önceki çalışmalarda belirlenmiş, yedisi flukonazole duyarlı, dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı, altısı dirençli olmak üzere toplam 17 *C.albicans*

suşuna ait *TAC1* ve *MRR1* gen bölgeleri, PZT ve dizi analizi yöntemi ile incelenmiş, flukonazol direncine neden olabilecek nokta mutasyonları araştırılmıştır.

Tablo-11. *TAC1* ve *MRR1* genlerinde literatürde bildirilen fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar ve amino asit değişimleri (59,60,62)

<i>TAC1</i>	Mutasyon	Pozisyon	Değişim	
1	S108N	108	Serin	Asparajin
2	T225A	225	Treonin	Alanin
3	W239L	239	Triptofan	Lösin
4	P276L	276	Prolin	Lösin
5	S290C	290	Serin	Sistein
6	E461K	461	Glutamat	Lizin
7	R673Q	673	Arjinin	Glutamin
8	R693K	693	Arjinin	Lizin
9	A736C	736	Alanin	Sistein
10	A736V	736	Alanin	Valin
11	A736T	736	Alanin	Treonin
12	N740D	740	Asparajin	Aspartat
13	N740S	740	Asparajin	Serin
14	H741Y	741	Histidin	Tirozin
15	I794V	794	İzolösin	Valin
16	E841G	841	Glutamat	Glisin
17	N972D	972	Asparajin	Aspartat
18	N972S	972	Asparajin	Serin
19	N972I	972	Asparajin	İzolösin
20	F973S	973	Fenilalanin	Serin
21	N977D	977	Asparajin	Aspartat
22	G980E	980	Glisin	Glutamat
23	G980W	980	Glisin	Triptofan
<i>MRR1</i>	Mutasyon	Pozisyon	Değişim	
1	K335N	335	Lizin	Asparajin
2	Q350L	350	Glutamin	Lösin
3	T360I	360	Treonin	İzolösin
4	T381I	381	Treonin	İzolösin
5	P683H	683	Prolin	Histidin
6	P683S	683	Prolin	Serin
7	N803D	803	Asparajin	Aspartat
8	R873T	873	Arjinin	Treonin
9	G878E	878	Glisin	Glutamat
10	A880E	880	Alanin	Glutamat
11	W893R	893	Triptofan	Arjinin
12	T896I	896	Treonin	İzolösin
13	G997V	997	Glisin	Valin
14	L998F	998	Lösin	Fenilalanin

Dizi analizi sonucunda, *TAC1* geninde belirlenen mutasyonlardan F104V, L149I, A411V, R673Q, A736V ve A790V mutasyonları, sadece çalışmaya alınan flukonazole dirençli suşlar olan DSY292, H1, H2, H3, B ve 960 suşlarında gösterilmiş ve flukonazol direncindeki rolleri tartışılmıştır. Dirençli suşların flukonazol MİK değerleri, ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları ve sadece bu suşlarda saptanan mutasyonlar Tablo-12’de gösterilmiştir.

F104V ve A736V mutasyonları, mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol MİK değeri 32 µg/ml olarak belirlenen ve sırasıyla *CDR1*, *CDR2* ve *MRR1* genlerini ATCC14053 suşuna göre 28.4, 33.9 ve 1.0 kat eksprese eden H3 suşunda belirlenmiştir. Bu değerler, görülen flukonazol direncinden *Mdr1* pompasından ziyade *Cdr1-2* pompalarının aşırı ekspresyonunun sorumlu olduğunu işaret etmektedir, bu

Tablo-12. Flukonazol dirençli suşların MİK değerleri, ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları ve saptanan mutasyonlar

Suş No	Flukonazol MİK değeri (Mikrodilüsyon yöntemi ile) µg/ml	<i>CDR1</i> ekspresyon oranı±SS	<i>CDR2</i> ekspresyon oranı±SS	<i>MDR1</i> ekspresyon oranı±SS	Saptanan <i>TAC1</i> mutasyonu*	Saptanan <i>MRR1</i> mutasyonu*
DSY292	>64	-	-	19.0 ± 1.5	L149I A411V A790V	P683H
H1	64	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.1	33.3 ± 4.9	A790V	H574R
H2	16	4.0 ± 0.5	3.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2	A790V	H574R
H3	32	28.4 ± 4.9	33.9 ± 2.3	1.0 ± 0.1	F104V A736V	-
B	32	32.0 ± 5.7	47.2 ± 2.0	1.7 ± 0.3	R673Q	-
960	8	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	-	S1039F S1041L T1065R P1066A A1068D L1069F N1071K

*Daha önce literatürde flukonazol direncine neden olduğu bildirilen mutasyonlar koyu yazılmıştır

nedenle *CDR1* ve *CDR2* genlerinin transkripsiyon faktörü olan *TAC1* geninde görülen F104V ve A736V mutasyonlarının önemli olduğu düşünülmüştür. Bu mutasyonlardan A736V, Coste ve arkadaşları tarafından *TAC1* geninde hiperaktiviteye ve flukonazol direncine neden olduğu gösterilmiş bir mutasyondur (72). Diğer taraftan F104V

mutasyonu, yine aynı araştırmacıların daha önceki bir yayınında belirlenmiş bir varyasyon olup, flukonazol direnci ile ilişkilendirilmemiştir (71).

Dunkel ve arkadaşları (62) tarafından *MRR1* gen bölgesinde P683H mutasyonuna sahip olduğu ve Mdr1 atılım pompasını fazla eksprese ettiği bildirilen DSY292 suşunun *TAC1* geninde L149I, A411V ve A790V mutasyonları saptanmıştır. Bu suşta görölen flukonazol direncine *MRR1* genindeki P683H mutasyonunun neden olduğu bilindiğinden, bulunan *TAC1* mutasyonlarının hiperaktiviteye neden olan fonksiyon kazandırıcı tipte mutasyonlar olma olasılığı zayıf olarak değerlendirilmiştir.

A790V mutasyonu, DSY292'nin yanı sıra, H1 ve H2 suşlarında da görölmüştür. H1 suşunun flukonazol MİK değeri 64 µg/ml ve *CDR1*, *CDR2* ile *MDR1* genlerini ekspresyon düzeyleri ATCC14053 suşuna göre sırasıyla 4.6, 4.0 ve 33.3 kat fazla olarak belirlenmiştir (78). Aynı çalışmada (78) duyarlı suşlardaki *CDR1* ve *CDR2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin dahi ATCC14053 suşuna göre 4.8 ve 8.4 kat fazla olabildiği gösterildiğinden, bu suşta flukonazol direncinden Mdr1 atılım pompasının fazla ekspresyonunun sorumlu olduğu düşünölmüştür.

A790V mutasyonunun göröldüğü diğer flukonazole dirençli suş olan H2'nin önceki çalışmada elde edilen MİK ve atılım pompa ekspresyon değerleri incelendiğinde (MİK = 16 µg/ml, *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* ekspresyonu sırasıyla 4.0, 3.7 ve 1.7) bu suşun atılım pompalarını ekspresyon düzeylerinin, flukonazol duyarlı ve kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı gruplardan çok yüksek olmadığı görölmüş, bu suşta olasılıkla atılım pompalarının aşırı ekspresyonu dışında bir mekanizmanın dirençten sorumlu olabileceği düşünölmüştür. A790V mutasyonu, göröldüğü üç suş dikkate alındığında, aşırı ekspresyona neden olan bir *TAC1* mutasyonu olarak değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda, yalnızca flukonazole dirençli suşlarda belirlenen diğer *TAC1* mutasyonu R673Q olup, B suşunda gösterilmiştir. B suşunun flukonazol MİK değerleri 32 µg/ml, ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları ise 32.0 (*CDR1*), 47.2 (*CDR2*) ve 1.7 (*MDR1*) şeklindedir (78). Bu suşta her iki *CDR* geninin diğer suşlara göre önemli miktarda fazla eksprese edilmesi, ortak transkripsiyon faktörleri olan *TAC1*'de olası bir hiperaktivasyona işaret etmekte olup, görölen R673Q mutasyonunun buna neden olabileceği düşünölmüştür. Bu bulgumuz, söz konusu mutasyonun fonksiyon kazandırıcı nokta mutasyonu olarak bildirildiği makalelerin verileri ile uyumludur (59,60).

Çalışmaya alınan flukonazol dirençli suşların *MRR1* bölgeleri incelendiğinde ise duyarlı suşlardan farklı olarak, H574V, P683H, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları saptanmıştır.

Bu mutasyonlardan sadece DSY292 suşunda görülen P683H mutasyonu daha önce literatürde *MRR1*'de hiperaktivasyona ve *MRR1* geninin aşırı ekspresyonu sonucunda flukonazol direncine neden olduğu bildirilmiş bir mutasyondur (62). Bu mutasyonun çalışmamızda saptanması, uygulanan yöntemin doğruluğunu göstermesi açısından önemlidir.

Çalışmaya alınan dirençli suşlardan *MDR1* ekspresyon oranı diğer suşlara göre oldukça yüksek olan H1 suşunda (MİK = 64 µg/ml, *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* ekspresyon oranları sırasıyla 4.6, 4.0 ve 33.3), H574R mutasyonu belirlenmiş ancak aynı mutasyonun, atılım pompa ekspresyon oranları fazla yüksek olmayan H2 (MİK = 16 µg/ml, *CDR1* ekspresyon oranı = 4.0, *CDR2* ekspresyon oranı = 3.7, *MDR1* ekspresyon oranı = 1.7) suşunda da bulunması nedeniyle bu mutasyonun, *MRR1* için fonksiyon kazandırıcı mutasyon olmadığı düşünülmüştür. Bu suшта amino asit dizisinin ilk 26'sı değerlendirilememiş, ancak bugüne kadar *MRR1* geninin bu kısmında tanımlanmış fonksiyon kazandırıcı bir mutasyon bildirilmemiştir. Bu bilgiler ışığında söz konusu suшта flukonazol direncinden, izlenemeyen 26 amino asitlik bölgede görülen bir mutasyonun sorumlu olma olasılığı düşük olarak değerlendirilmiştir. Bu suшта görülen *MDR1* aşırı ekspresyonuna, söz konusu gene ait henüz tanımlanmamış *Mrr1* dışındaki transkripsiyon faktörlerinin ya da pompa geninin transkripsiyon faktörüne gerek duymaksızın aşırı eksprese olmasının neden olabileceği düşünülmüştür.

S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları arka arkaya pozisyonlarda 960 no'lu suшта gözlenmiştir. İncelenen yayınlarda ve bu çalışmada değerlendirilen diğer suşlarda *MRR1* gen bölgesinde bu şekilde aşırı değişken bir bölge görülmemesi nedeniyle bu mutasyonlara kuşku ile yaklaşılmıştır. Özellikle söz konusu suşun MİK değeri ve *CDR1-2/MDR1* ekspresyon oranlarına bakıldığında (Tablo-12), gözlenen flukonazol direncinin başka mekanizmalar ile ortaya çıkmış olma olasılığı ağırlık kazanmıştır. Söz konusu mutasyonların, genin aşırı ekspresyonuna neden olup olmadığının kesin olarak belirlenmesi ancak klonlama çalışmaları ile mümkündür.

Çalışmaya alınan flukonazol dirençli klinik izolatların *ERG11* genleri daha önce iki farklı araştırmaya ile incelenmiştir. *ERG11* ekspresyon düzeylerinin belirlendiği

araştırma sonucunda (79) flukonazol direnci gösteren suşların hiç birinde *ERG11* aşırı ekspresyonu bulunmamıştır. Söz konusu suşların *ERG11* bölgelerinin incelendiği çalışmada (80) ise, literatürde flukonazol direncine neden olduğu gösterilmiş çeşitli *ERG11* mutasyonları saptanmıştır (H1, H2 ve B suşlarında K143V, V488I; H3 suşunda G464S, G465S). Bu mutasyonlar, bizim bulgularımızla beraber değerlendirildiğinde, *CDR1* ve *CDR2* genlerinin aşırı ekspresyonuna neden olan *TAC1* mutasyonları içeren H3 ve B suşlarında, *ERG11* geninde bağlanmayı veya üç boyutlu yapıyı değiştiren mutasyonların da eř zamanlı olarak bulunduğu grlmştir. Bu durum literatürde bildirilen, aynı suşta birden fazla flukonazol direnç mekanizmasının birlikte aktif olabileceği yönündeki bulguyu desteklemektedir (10,11). Ayrıca bizim araştırmamız ile *TAC1* ve *MRR1* bölgelerinde mutasyon saptanmayan H1 ve H2 suşlarında görülen flukonazol direncinden, bu çalışmayla *ERG11* bölgelerinde saptanan K143V, V488I mutasyonlarının sorumlu olabileceği dşnlmştir. Ancak *ERG11* geninde görülen bu mutasyonlar, H1 ve H2'de görülen flukonazol direncini aıklaıa da, H1 suşunda görülen *MDR1* aşırı ekspresyonunu açıklanamamaktadır. Yapılan araştırmalar ile, *TAC1*, *MRR1* ve *ERG11* genlerinin hiç birinde mutasyon saptanmayan ve *ERG11* genini aşırı eksprese etmediği gösterilen 960 no'lu suşta izlenen flukonazol direncinin mekanizması aydınlatılamamış, bu suşta flukonazol ile bloke edilen yollara alternatif metabolik yolların aktif olabileceği dşnlmştir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulguların ışığında, çalışmaya alınan flukonazol dirençli klinik izolatlarımızdan *CDR1* ve *CDR2* genlerini diğerlerine göre büyük ölçüde fazla eksprese ettiği saptanmış H3 ve B'de, görülen aşırı ekspresyona *TAC1* genlerinde saptanan A736V ve R673Q mutasyonlarının neden olduğu sonucuna varılmıştır.

MDR1 genini aşırı eksprese ettiği bilinen H1 suşumuzda, bu durumu açıklayan özgün bir nokta mutasyonu saptanmamıştır. Bu suшта görülen Mdr1 pompasının aşırı ekspresyonunun açıklanabilmesi için, transkripsiyon faktörü Mrr1'i kodlayan gende görülen fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar dışındaki nedenler veya diğer *MDR1* transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlar araştırılmalıdır.

Atılım pompa genlerini ekspresyon düzeyleri, flukonazol duyarlı ve kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı suşlarla yakın olan H2 ve 960 suşlarında, gen ekspresyon düzeyleriyle paralel olarak, aşırı ekspresyona neden olduğu bildirilen herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. H2 suşunda görülen direnç *ERG11* geninde var olduğu bilinen mutasyonlara bağlanabilir ancak 960 no'lu suшта görülen direncin nedenini aydınlatmak için flukonazol direncine neden olduğu bilinen diğer mekanizmaların araştırılması uygun olacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Howell SA HK. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML WD, editor. Man. Clin. Microbiol. 10th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2011. p. 1762–88.
2. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect. Dis. 2011;11(2):142–51.
3. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. Crit. Care. 2008;12(1):204.
4. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007;48(1):1–12.
5. 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(11):e954–66.
6. Ruan S-Y, Hsueh P-R. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. J. Formos. Med. Assoc. 2009;108(6):443–51.
7. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1998;11(2):382–402.
8. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2009;7(4):453–60.
9. Kanafani Z, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin. Infect. Dis. 2008;46(1):120–8.
10. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, 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(10):2676–84.
11. MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. Antimicrob. Agents Chemother. 2010;54(4):1476–83.
12. 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.1961–71.

13. 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(7):1029–50.
14. Barnett JA, Borg F, Robin C, Benham R. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast.* 2008;385–417.
15. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996;25(2):136–44.
16. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, (ed). *Candida and Candidiasis*. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press;2002:3-13.
17. Bradbury S. Landmarks in biological light microscopy. *J. Microsc.* 1989;155(3):281–305.
18. Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses.* 2006;49(4):283–7.
19. 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.2656–74.
20. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. Fourth edition. Singapore, Mc Graw-Hill Companies; 1999 p.818–20.
21. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An Introduction to the Medically Important *Candida* Species. In: Calderone RA and Clancy CJ, eds. *Candida and Candidiasis*. Second edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2012 p.11-25.
22. 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.115-54.
23. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20(1):133–63.
24. Yuluğ N. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Matbaacılık; 2002 p.1777-85.
25. Mishra P, Prasad R. An overview of lipids of *Candida albicans*. *Prog Lipid Res* 1990; 29: 65-85.

26. Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.* Elsevier Ltd; 2012;15(4):406–12.
27. Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 2001;39 Suppl 1:1–8.
28. Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara J-P. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 2008;46(8):749–72.
29. Yang Y-L. Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2003;36(4):223–8.
30. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119–28.
31. Yücesoy M. Fungal virülans faktörlerinin moleküler temelleri. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji kongresi. 24-28 Haziran 2008, Ankara.
32. Calderone R, Fonzi W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327–35.
33. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008;72(3):495–544.
34. Jacobsen I, Wilson D. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012;10(1):85–93.
35. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167–93.
36. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001;18(4):163–70.
37. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2000;14:405-408.
38. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.* 2011;49(2):171–7.
39. 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.751–74.
40. Mitchell Thomas G. Mycology. In: Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S, editors. *Med. Microbiol.* 24th ed. McGraw-Hill Medical; 2007. p. 621–55.

41. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2012;54(9):1240–8.
42. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns.* 2011;37(2):181–95.
43. Bille J, Edson RS, Roberts GD. Clinical evaluation of the lysis-centrifugation blood culture system for the detection of fungemia and comparison with a conventional biphasic broth blood culture system. *J. Clin. Microbiol.* 1984;19(2):126–8.
44. 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. 1151-242.
45. 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.
46. Laín A, Elguezabal N, Amutio E, Fernández de Larrinoa I, Moragues MD, Pontón J. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin. Dev. Immunol.* 2008;2008:721950.
47. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. 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(6):R222.
48. Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2009;7(10):1201–21.
49. McMullan R, Metwally L, Coyle P V, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin. Infect. Dis.* 2008;46(6):890–6.
50. 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.1745–61.
51. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(2):665–70.

52. Arikan 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.1949–60.
53. 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.701–13.
54. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov A V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. J. Clin. Microbiol. 2005;43(12):5848–59.
55. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J. Clin. Microbiol. 2010;48(4):1366–77.
56. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. 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(11):3435–42.
57. Pfaller M. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am. J. Med. Elsevier Inc.; 2012;125(1 Suppl):S3–13.
58. 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(6):1639–52.
59. 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(8):1250–67.
60. Siikala E, Rautemaa R, Richardson M, Saxen H, Bowyer P, Sanglard D. Persistent *Candida albicans* colonization and molecular mechanisms of azole resistance in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. J. Antimicrob. Chemother. 2010;65(12):2505–13.
61. 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(11):e164.

62. 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(4):827–40.
63. Sanglard D, Ischer F. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(8):2404–12.
64. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* 2012;2012:713687.
65. Sandherr M, Maschmeyer G. Pharmacology and metabolism of voriconazole and posaconazole in the treatment of invasive aspergillosis-review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 2011;(16):139–44.
66. Pfaller M a, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell V a, Nagy E, Dobiásova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(2):515–21.
67. Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 1998;36 Suppl 1:119–28.
68. Leber R, Fuchsbichler S, Klobucnikova V, Schweighofer N, Pitters E, Wohlfarter K, et al. Molecular Mechanism of Terbinafine Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(12):3890–900.
69. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56 Suppl 1:i5–i11.
70. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr. Drug Targets.* 2006;7(4):495–504.
71. Coste A, Turner V, Ischer F, Morschhäuser J, Forche A, Selmecki A, 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(4):2139–56.
72. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bounoux M-E, D'Enfert C, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell.* 2007;6(10):1889–904.
73. Mogavero S, Tavanti A, Senesi S, Rogers PD, Morschhäuser J. Differential requirement of the transcription factor Mcm1 for activation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump *MDR1* by its regulators Mrr1 and Cap1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55(5):2061–6.

74. Shore P, Sharrocks AD. The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 1995;229(1):1–13.
75. Sasse C, Schillig R, Dierolf F, Weyler M, Schneider S, Mogavero S, et al. The transcription factor Ndt80 does not contribute to Mrr1-, Tac1-, and Upc2-mediated fluconazole resistance in *Candida albicans*. *PLoS One.* 2011;6(9):e25623.
76. Alarco a M, Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 1999;181(3):700–8.
77. 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.
78. Gülat S. Flukonazol dirençli *Candia albicans* suşlarında atılım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinin “real-time” polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi - Doktora tezi, 2012.
79. 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.
80. Manastır L. Flukonazole dirençli *Candida albicans* izolatlarında sitokrom p450 14 α -demetilaz enziminde değişikliklere yol açan mutasyonların araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi - Doktora tezi, 2007.