

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

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

ONUR IRMAK

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**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**

UZMANLIK TEZİ

ONUR IRMAK

Danışman Öğretim Üyesi

PROF. DR. MİNE DOLUCA

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2006. KB. SAG.014 sayı ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini ve çabasını benimle paylaŐan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine DOLUCA'ya, eğitimime katkılarından dolayı Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU'na ve tüm hocalarıma teŐekkür ederim.

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim arkadaŐlarım ve benim için çok değerli olan aileme teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Tarihçe	5
4.2. Genel Özellikler	5
4.3. Hücre Yapısı	6
4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri	8
4.4.1. Yapışma (Aderans)	9
4.4.2. Biyofilm ("Slime") Üretimi	10
4.4.3. Enzimler	10
4.4.4. Morfolojik ve Fenotip Değişimi	11
4.4.5. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi	12
4.4.6. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği	13
4.5. Candida Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar	13
4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz	13
4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz	14
4.5.3. Sistemik Kandidoz	15
4.6. Candida İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	15
4.6.1. Direkt Bakı ve Kültür	15
4.6.2. Serolojik Tanı	17
4.6.3. Deri testleri	19
4.6.4. Moleküler Tanı	19
4.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç	21
4.7.1. Polyenler	21
4.7.2. Azol Türevleri	22
4.7.3. 5 Flusitozin (Florositozin)	25
4.7.4. Hücre Duvarına Etkili Antifungaller	26
4.7.5. Allilaminler	26
4.8. Antifungal Duyarlılık Testleri	26
4.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler	27
4.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler	29
4.8.3. Diğer Yöntemler	30
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
5.1. Suşlar	31
5.2. Semi Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT)	33
5.2.1. RNA Eldesi	33
5.2.2. cDNA Eldesi	35
5.2.3. PZT Uygulanması	36
5.2.4. PZT Ürününün Görüntülenmesi	40
5.2.5. PZT Ürünlerinin Kantitasyonu	41
6. BULGULAR	42
6.1. CDR1 Ekspresyon Düzeyleri	42

6.2.CDR2 Ekspresyon Düzeyleri.....	46
6.3.MDR1 Ekspresyon Düzeyleri.....	50
6.4.ERG11 Ekspresyon Düzeyleri.....	52
7. TARTIŞMA.....	56
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	61
9. KAYNAKLAR.....	62

TABLO LİSTESİ

Tablo-1. Flukonazol, AmB, flusitozin, itrakonazol ve vorikonazol için duyarlılık kategorilerine göre belirlenen MİK değerleri.....	28
Tablo-2: Flukonazole Di/DBD/kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının MİK Değerleri (µg/ml).....	31
Tablo-3: Flukonazole Du <i>C. albicans</i> suşlarının MİK Değerleri (µg/ml).....	32
Tablo-4: Flukonazole Di /DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.....	32
Tablo-5: Flukonazole Du <i>C. albicans</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.....	33
Tablo-6. Çalışmaya alınan tüm suşların <i>ACT1</i> , <i>CDR1</i> genleri için belirlenen sayısal değerleri ve <i>ACT1</i> ile normalizasyon oranları.....	44
Tablo-7. Çalışmaya alınan <i>C. albicans</i> suşlarının <i>C. albicans</i> ATCC 14053 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler.....	45
Tablo-8. Çalışmaya alınan suşların <i>ACT1</i> , <i>CDR2</i> genleri için belirlenen sayısal değerler ve <i>ACT1</i> ile normalizasyon değerleri.....	48
Tablo-9. Araştırılan suşların <i>C. albicans</i> ATCC 14053 ile oranlanması sonucu elde edilen değerler.....	49
Tablo-10. İncelenen tüm suşların <i>ACT1</i> , <i>MDR1</i> genleri için belirlenen normalizasyon değerleri.....	51
Tablo-11. Çalışmaya alınan tüm suşların <i>ACT1</i> , <i>ERG11</i> genleri için belirlenen sayısal değerler ve <i>ACT1</i> ile normalizasyon değerleri.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil- 1. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>CDR1</i> genleri için elde edilen jel görüntüsü.....	42
Şekil- 2. Flukonazole Du <i>C.albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>CDR1</i> genleri için belirlenen jel görüntüleri.....	43
Şekil- 3. Çalışılan suşların <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrasında oluşturulan grafiği.....	44
Şekil- 4. Suşların <i>CDR1</i> ekspresyonu açısından <i>C. albicans</i> ATCC 14053 ile karşılaştırıldığı grafik.....	45
Şekil- 5. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>CDR2</i> genleri için saptanan jel görüntüsü.....	46
Şekil- 6. Flukonazole Du <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>CDR2</i> genleri için elde edilen jel görüntüsü.....	47
Şekil- 7. <i>C. albicans</i> suşlarının <i>CDR2</i> ekspresyonu açısından <i>ACT1</i> ile normalizasyonu ile elde edilen grafik.....	48
Şekil- 8. Suşların <i>C. albicans</i> ATCC 14053 ile oranlanması sonucu elde edilen grafik.....	49
Şekil- 9. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>MDR1</i> genleri için izlenen jel görüntüsü.....	50
Şekil- 10. Flukonazole Du <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>MDR1</i> genleri için yapılan iki çalışmanın bir jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüsü.....	51
Şekil-11. İncelenen suşların <i>MDR1</i> ekspresyonu açısından <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrasında oluşturulan grafiği.....	52
Şekil- 12. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>ERG11</i> genleri için belirlenen jel görüntüsü.....	53
Şekil- 13. Flukonazole Du <i>C. albicans</i> suşlarının <i>ACT1</i> ve <i>ERG11</i> genleri için izlenen jel görüntüsü.....	53
Şekil- 14. Tüm suşların <i>ERG11</i> ekspresyonu açısından <i>ACT1</i> ile normalizasyon yapılmış grafiği.....	54

KISALTMALAR

- Du: Duyarlı
Di: Dirençli
DBD: Doza Bağımlı Duyarlı
SDA: Sabouraud Dekstroz Agar
PNL: Polimorf Nüveli Lökosit
MPO: Myeloperoksidaz
IFN- γ : İnterferon γ
TNF- α : Tümör nekroz faktör α
ALS: ‘‘Agglutinin-Like Sequence’’
PAS: Periyodik Asit-Schiff
BHI: Beyin kalp infüzyon
SABHI: Sabouraud-BHI
Sap: Salgısal aspartik proteinaz
EIA: Enzim Immun Assay
RIA: Radio Immun Assay
LA: Lateks Aglütinasyon
PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi
rDNA: Ribozomal DNA
ITS: ‘‘Internal Transcribed Spacer’’
AmB: Amfoterisin B
MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon
ABC: ATP Bağlayan Kaset
MFs: Major-facilatator süper ailesi
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
MHA: Mueller-Hinton Agar
RT-PZT: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi

1.ÖZET

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

Flukonazolün yaygın ve tekrarlayan kullanımı *Candida albicans* suşlarında direnç gelişimine yol açmıştır. Bu çalışmada, flukonazole duyarlı (Du) /dirençli (Di) /doza bağımlı duyarlı (DBD) *C. albicans* izolatlarında atılım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ile lanosterol 14 α -demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* geninin ekspresyonu araştırılarak flukonazol direncinde bu iki mekanizmanın rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Türkiye’de üç üniversite hastanesinde çeşitli klinik örneklerden soyutlanan dört flukonazol Di/ DBD, yedi Du ve üç kısmi inhibisyon etkisi gösteren *C. albicans* suşu dahil edildi. *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve *ERG11* düzeylerinin göreceli ekspresyonu semi-kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ile belirlendikten sonra flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşu ile karşılaştırıldı. Bu genlerin ekspresyonu *ACT1* ekspresyon düzeyleri ile normalize edildi.

CDR1 ve *CDR2* düzeyleri *C. albicans* ATCC suşu ile karşılaştırıldığında, flukonazol Di/ DBD *C. albicans* izolatlarında sırasıyla 3,12-7,16 ve 1,83-18,0 kat daha fazla olarak belirlendi. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren izolatlar 0,64-2,06 ve 0,9-3,1 kat *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonu gösterirken, Du izolatlar bu genleri düşük düzeylerde eksprese etmişler veya hiç ekspresyon göstermemişlerdir. *MDR1* ve *ERG11* ekspresyonları incelendiğinde, Di/ DBD suşların üçünün ve tümünün sırasıyla *MDR1* ve *ERG11*; bunun yanında flukonazol Du suşların ise altı ve dördünün bu iki geni farklı düzeylerde eksprese ettiği saptandı.

Sonuç olarak, *C. albicans* izolatlarımızda flukonazol direncinde atılım pompalarının özellikle *CDR1* ve *CDR2*’nin fazla ekspresyonunun önemli bir mekanizma olabileceği sonucuna varılmıştır.

2. SUMMARY

Investigation of the expression levels of efflux pumps encoding genes *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* and 14 alfa lanosterol demethylase enzyme encoding gene, *ERG11* in fluconazole resistant *Candida albicans* isolates by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Widespread and repeated use of fluconazole resulted in resistance problem in *Candida albicans* strains. In this study, investigation of the expression of efflux pump encoding genes, *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* and lanosterol 14 α - demethylase enzyme encoding gene, *ERG11* in fluconazole susceptible (S)/resistant(R)/dose dependent susceptible (DDS) *C. albicans* isolates was aimed in order to determine the role of these two mechanisms in fluconazole resistance.

Four fluconazole R/DDS, seven fluconazole S and three tailing effect showing *C. albicans* strains which were isolated from various clinical specimens in three University hospitals in Turkey were included. Relative expression of *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* and *ERG11* transcripts were determined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and compared with drug susceptible *C. albicans* ATCC 14053 strain. The expression of these genes was normalized with their *ACT1* expression levels.

CDR1 and *CDR2* transcripts were 3,12-7,16 and 1,83-18,0 fold upregulated, respectively in fluconazole R/DDS *C. albicans* isolates when compared to *C. albicans* ATCC strain. Trailing isolates showed 0,64-2,06 and 0,9-3,1 fold *CDR1* and *CDR2* expression while the sensitive isolates expressed low levels of these genes or didn't seem to express at all. When *MDR1* and *ERG11* expressions were examined, it was observed that three and all fluconazole R/DDS as well as six and four fluconazole S isolates expressed these two genes at various levels, respectively.

As a result, it can be concluded that overexpression of efflux pumps especially *CDR1* and *CDR2* can be considered as important mechanisms of fluconazole resistance in our *C. albicans* isolates.

3. GİRİŞ VE AMAC

Son yıllarda modern tıptaki gelişmelerle birlikte organ nakli, kanser kemoterapisi, parenteral beslenme, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı artmış ve bu da sistemik fungal infeksiyonların sıklığında artışa neden olmuştur (1). Bunun yanında solit organ ve hematopoetik kök hücre alıcısı olan, AIDS'li, hematolojik maligniteli, yanıklı hastalar da sistemik fungal infeksiyonların sık görüldüğü hasta gruplarıdır (2).

Sistemik *Candida* infeksiyonları özellikle hastanede yatan hastalar açısından önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak görülmektedir. Uygun sağaltımı yapılmayan sistemik kandidoz olgularında mortalite hızının %40 dolayında olduğu saptanmıştır (3). Öte yandan bu infeksiyonların tanı ve sağaltımlarının güç ve uzun olması nedeni ile ülkeye ve hastaya ciddi bir ekonomik yük söz konusu olmaktadır. Yapılan bir araştırmada hastane kökenli kandidemi tablosunun hastanın yatış süresini 30 gün daha uzattığı ve bu infeksiyona bağlı mortalitenin de %35 olduğu bildirilmiştir (4).

Kanser hastaları ve yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda en sık rastlanan ve en önemli fungal patojenlerin mayalar olduğu; bunlar arasında da en sık *Candida* türlerine rastlandığı bildirilmektedir (5). Yapılan çalışmalarda son on yılda hastane kökenli dolaşım sistemi infeksiyonları arasında kandidemi insidansının beş kat arttığı ve *Candida*'ların en sık saptanan dördüncü etken olduğu belirtilmektedir (6,7).

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının sağaltımı önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Antifungal ilaçların pahalı olması, bu ilaçların kısıtlı olması, bunların kullanımlarını sınırlayan faktörler yanında antifungal direnç, bu sorunu daha da ciddi bir hale getirmiştir. Yapılan çalışmalarda kandidemilerin en sık ve en önemli nedenin *C. albicans* olduğu bulunmuş, *C. albicans* infeksiyonlarının sağaltımında azol türevlerinin özellikle flukonazolün uzun süre ve aşırı kullanımı dirençli *C. albicans* suşları ile sonuçlanmıştır. Azol dirençli *C. albicans* izolatları myelofibrozis, lösemi, kronik mukokutanöz kandidoz ve AIDS olgularındaki infeksiyonlarda etken olarak bildirilmiştir (8,9).

C. albicans suşlarında azol direncinden sorumlu birçok mekanizma bildirilmiş, flukonazol dirençli suşlarda tek bir mekanizmadan çok, birçok mekanizmanın birlikte rol aldığı ileri sürülmüştür (9). Bu mekanizmalar 1) İlacın hücre içinde birikiminde azalma a) İlacın hücre içine alımında bozukluk b) Aktif pompalarla ilacın hücre dışına atılması

2) İlacın hedefi olan lanosterol demetilazda değişiklik a) *ERG11* geninin ekspresyonunda artma b) *ERG11* genindeki mutasyonlar 3) Ergosterol biyosentezinde değişiklik şeklinde özetlenebilir (10-13).

Araştırmamızda hastanemizde ve ülkemizdeki bazı merkezlerde klinik örneklerden soyutlanan flukonazol dirençli *C. albicans* suşlarında flukonazol direncinden sorumlu bir mekanizma olan atılım (efluks) pompalarının incelenmesi ve bu pompaları kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* ile 14 alfa lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* gen düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Mantarları ve mantar hastalıklarını inceleyen bilim olan mikoloji terimi eski Yunan dilinde mantar anlamında kullanılan “mykes” sözcüğünden türetilmiştir. Hippocrates ve Galen’in yaşadığı M.Ö. dördüncü yüzyıldan beri ağızdaki pamukçuk lezyonları bilinmektedir (14).

1771’de Rosen von Rosenstein bu etkenin akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini bildirmiştir (15).

1842’de Gruby, Langenbeck’in tifolu bir hastanın ağızındaki afttan soyutladığı organizmanın *Sporotrichum* türü olduğunu bildirmiştir. 1842’de deneysel olarak Berg oral aft modeli, 1862’de ise Mayer genital aft modeli oluşturmuştur (15).

Robin 1847’de mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmış, Roth Berkhout 1923’te pamukçuk etkeni olan mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirerek jenerik isim olarak *Candida*’yı önermiştir (15).

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

17. Yüzyılın sonlarında Sabouraud, mantarların morfolojilerini belirlemeye olanak sağlayan besiyerini geliştirmiş ve bunların üreme özellikleri üzerine çalışmalar yapmıştır.

Antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940’lı yıllardan itibaren ise *Candida* infeksiyonlarının sıklığı ve konuyla ilgili çalışmalar artmıştır (14,15).

4.2. Genel Özellikler

Mayalar; ökaryot, tomurcuklanan, tek hücreli organizmalar olup, genellikle yuvarlaktan ovale kadar değişebilen ve daha ender olarak da uzunca ve düzensiz şekil gösterirler. Üç ile altı µm büyüklüğünde olup, genellikle bakteri hücresinden büyüktürler (16).

Mayalar katı besiyerinde aerop koşullarda 25-30⁰C’de iyi üreme gösterirler ve 2-3 günde opak, beyaz ya da çoğu krem renginde, yumuşak, bakteri kolonisine benzer görünümde 0-5 mm çaplı koloniler oluştururlar. Koloniler başlangıçta krema görünümünde olup zamanla zarımsı veya girintili çıkıntılı hal alır. Bazen *Candida albicans* kolonileri Sabouraud dekstroz

agar (SDA)'da ilk izolasyonda buruşuk veya pürüzlü olabilirse de daha sonraki pasajlarda düzgün kolonilere dönüşürler (16).

Candida türleri yaygın görülen mayalar olup, memelilerin sindirim kanalı normal florasında ve de insan mukoza ve derisinde bulunurlar. İnsan gastrointestinal kanalından en sık soyutlanan tür *C. albicans* olup, bunu *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izler (16).

Normal florada bulunan *Candida* türleri, bir hastalık veya sağaltım girişimleri nedeniyle bağışıklık savunması bozulmuş hastalarda, dokulara yayılarak yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilirler (16).

Candida türleri tomurcuklanma ile çoğalır. Tomurcuklanma ile çoğalmada hücre duvarının bir noktası lizise uğrar, bu noktadan duvar dışarıya doğru balonlaşma yapar. Bu kısım şişerek genişler, ana hücrede mitoz yolu ile çoğalan kromozomlar ve diğer hücre elemanları yeni hücreye taşınır, sonra iki hücre arasında bölme (septa) gelişerek hücre çoğalması gerçekleşir. *Candida* türlerinin blastokonidyum yapıları yuvarlak, oval veya uzamış şekildedir. Ender olarak bazı kökenler, özellikle antimikrobiyal ilaç kullanan hastalardan soyutlananlar, ilk izolasyonlarında ileri derecede pleomorfik olabilirler (16-17).

Doğrusal bir şekilde birbirinden ardı ardına oluşan ve ayrılmayan blastokonidyumlar yalancı hif adı verilen yapıyı oluştururlar. Gerçek hiften farklı olarak, birbirine komşu yalancı hifler arasında belirgin bir daralma görülür. Yalancı hiflerin duvarı birbirine paralel olmayıp, hücreler arasında daralmalar nedeniyle boğumsal görünümü mevcuttur. Uzama gösteren uçtaki bir öncekinden daha kısadır. *Candida* cinsi mantarlarda hem gerçek hem yalancı hif bulunabilmektedir. *Candida albicans* gerçek hif oluşturmakta olup, ana hücreden boğum oluşturmada borucuk uzar ve çimlenme borusu adı verilen yapıyı oluşturur (18). Yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidyumların bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli özelliklerdir.

Bütün türler glukozu fermente eder, hiçbiri nitratı asimile edemez. Kültürlerinde etanol, aseton, ve asetik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, pirüvik asit, suksinik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşur. Çoğalma hızları ortama göre değişmekle birlikte *C. albicans* ve *C. tropicalis* için bir saatten daha kısa bir süredir (19).

4.3. Hücre Yapısı

Fungus hücresi ökaryot yapıda olup; nukleolus, nukleus, nukleus membranı, endoplazmik retikulum, vakuoller, mitokondriya, sitoplazma ve bazılarında amorf

polisakkaritlerden yapılmış olan ya “slime” (glikokaliks) ya da tam bir kapsül bulundurur (17).

Hücre duvarı sert bir yapıda olup hücreye şekil verir. Ozmotik basınca bağlı hücre patlamasına karşı koyar. Ayrıca çeşitli moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde rolü vardır. Hücre duvarı maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) doğrudan görev alır (19).

Mantar hücre duvarının kitin içermesi, hücre zarında kolesterol yerine ergosterol bulunması mantarı diğer canlı hücrelerinden ayıran önemli özelliklerindedir. Duvar komponentlerinin %80-90'ı karbonhidratlar, %5-15'i protein ve %2-5'i lipitlerden oluşur. Karbonhidratların ise %20-30'u mannoprotein, %50-60'ı β glukanlar ve %0,6-9'u kitin yapısındadır. *Candida albicans*'ın maya ve hif formlarında glukan ve mannan içeriği benzerdir fakat hif hücrelerinde kitin miktarı maya hücresine göre üç kat fazladır. Bu maddeler mantarın patogenezinde rol oynadığı gibi ayrıca antijenik özellikleri nedeniyle hastalık tanısında da yardımcı olmaktadır. Ancak insan dokusunun duvar polisakkaritlerini parçalayacak enzimleri yoktur (19).

Elektron mikroskopik çalışmalara göre *Candidaların* hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşüm sürecinde bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein katman kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar (19).

Hücre zarı iki tabakalı olup fosfolipid, sfingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. *Candidaların* hücre membranında; fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inozitol gibi fosfolipitler bulunur. Tüm mantarlarda olduğu gibi *Candida* türlerinin hücre membranında bulunan sterol, membran lipitlerinin %20'sini oluşturur. Sterolün %95'i ergosterol formundadır. Ergosterol antifungal ilaçlar için en önemli hedeftir (19).

Hücre membranı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde rol alır. Kitin sentetaz gibi duvar komponentlerinin sentezinde rolü olan enzimler de membranda bulunur. Ayrıca *C. albicans*'ın morfogenezi (maya-hif dönüşümü ve hifin ucundan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alırlar (19).

Nukleus membranı ile çevrili çok sayıda nukleusları vardır. Nukleolus RNA'dan zengindir. Nukleus DNA'sı lineer yapıdadır. Sitoplazmada bulunan mitokondri sayıları solunumsal etkinlik ile ilişkilidir. Hücrenin tomurcuklanması için enerji gereksinimi artışına paralel olarak mitokondri sayısında artma olur. Hücrelerde endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, 80 S ribozom, mikrotübül ve mikroveziküller, lipit glikojen granülleri, çok sayıda vakuoller bulunur (17).

Fungal iskelet, turgor basıncına karşı koruyacak dinamik bir sistemdir. İskelet, hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılıdır. İskelet komponentlerinden olan mikrotübüller, membranın hareketliliğinde rol alır. İskeletin bir diğer bileşeni olan aktin sitoplazmik akışkanlıktan sorumludur. Miyozin ise aktinle birlikte organellerin hareketliliğini sağlar (19).

İskelet komponentlerinin birbiriyle ilişkileri açısından Ca^{++} , Mg^{++} ve H^+ iyonlarının yoğunlukları önemlidir. Bu iyonların hücre içine giriş, çıkışları ile organellerin hareketliliği ve hifin uzaması düzenlenir. İyonlar ek olarak mitoz, mayoz, tomurcuklanma, septum oluşumu yani morfogenez ve de protein kinaz gibi bazı enzimlerin düzenlenmesinde rol alırlar (19).

4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Konak ile *Candida* arasındaki etkileşimin sonuçları, mantarın infeksiyon oluşturma yeteneğine, konağın infeksiyona karşı yanıtına ve konakta predispozan faktörlerin varlığına bağlı olarak değişkenlik gösterir (19).

Konağa ait predispozan faktörler diabetes mellitus, alkolizm, malign hastalıklar, malnutrisyon, yanıklar, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, kortikosteroid kullanımı, total parenteral beslenme, yoğun cerrahi girişimler, üriner katater şeklinde sıralanabilir (20-21).

Konağın *Candida* türlerine karşı direnç faktörleri arasında sağlam deri dokusu, silier hareketler, sekresyonlar, normal mikrobiyolojik florayı içeren mukokutanöz engeller, kompleman sistemi, sitokinler, B-lenfositleri içeren humoral mekanizmalar, nötrofiller, mononükleer fagositler, doğal öldürücü hücreler, T-lenfositleri içeren hücrel mekanizmalar sayılabilir (19-20).

Polimorf nüveli lökositler (PNL) *C. albicans*'ın oluşturduğu infeksiyonlara karşı çok önemli bir savunma faktörüdür. İn vitro deneylerde insan kanının *Candida*'yı öldüren bir aktivitesinin olduğu ve bunun doğrudan doğruya lökositlerden kaynaklandığı bulunmuştur. PNL'lerin fungisidal mekanizmaları oksidatif ve non-oksidatif olmak üzere iki tiptedir. Oksidatif mekanizma nötrofilin bazı potent oksidanları sentez etmesiyle karakterizedir. Bu oksidanlar arasında hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklorik asitler ve kloraminler sayılabilir. PNL'lerin hipoklorik asit ve kloramin sentezi yine PNL'lerin azurofilik granüllerinde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığı ile olur. Özellikle MPO ve hidrojen peroksit gibi fungisidal moleküller PNL'lerin *C. albicans*'ı eradike edebilmesi için gereklidir. Buna karşın diğer *Candida* türleri non-oksidatif mekanizmalarla yok

edilebilmektedir. Ayrıca PNL'lerin azurofilik granüllerinde bulunan *defensin* ve *katepsin G*'nin antifungal aktivitesi mevcuttur (19).

Candida'ların PNL'lerce yok edilmesinde IgG sınıfından opsonizasyon yapan antikörlerin de rolü vardır. C3b, opsonin olarak *C.albicans* blastosporlarına bağlanabilir (19).

PNL'lerin, fungusidal aktiviteleri için interferon γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi sitokinlere ihtiyacı vardır. *Candida* infeksiyonlarında T lenfositler ve IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 gibi sitokinler görev alır, Th1 ile Th2 arasındaki denge önemlidir. *Candida*'ların pulmoner dokudan eliminasyonunda ise PNL'ler kadar alveolar makrofajların da önemli görevler üstlendiği görülmüştür (22-23)

Candida türlerinin virulans faktörleri ise adezyon, biyofilm yapımı, toksinler, enzimler, morfolojik ve fenotip değişimi, hidrofobisite, moleküler benzeme, hücre duvarı yapısı ve çeşitli sideroforları kullanma yeteneği şeklinde sıralanabilir (19-20).

4.4.1. Yapışma (Aderans)

Mayanın konak ile ilişkisinde ilk basamağı oluşturup kolonizasyon ile infeksiyon oluşumunda önemli role sahiptir. *C. albicans*, diğer *Candida* türlerine göre kan damarları, epidermal korneositler, endotel hücreleri, epidermal keratinositler gibi konak hücrelerine daha fazla aderans yeteneğine sahiptir (24).

C. albicans'ın, konağın epitel ve endotel hücrelerine aderansında iC₃b, C₃d, fibronektin ve östrojen reseptörleri, mannoprotein, salgısal aspartik proteinaz, faktör 6 (antijen 6), laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinler gibi moleküllerin rolü bulunmaktadır (19).

C. albicans'ta birçok patojenite ile ilgili faktör "*Agglutinin-Like Sequence*" (*ALS*) gen ailesini de içeren bir dizi gen ailesi tarafından kodlanır. Adezinler, glikoprotein yapıda olup ALS, Ala 1 ("agglutinin-like adhesin"), INT 1 ve Hwp 1'i içermekte ve 8 gen ile kodlanmaktadır. Hwp 1, yanak epitel hücrelerine bağlanmayı sağlar. Bu genin inaktivasyonu büyük ölçüde virulansı azaltır. INT 1 ise adezyonun yanında filamentöz şeklin çoğalmasını da sağlayan gen bölgesidir ve önemli ölçüde virulanstan sorumludur (25-26).

Candida hücrelerinin hücre veya dokuya aderansı için konak epitel ve endotel hücreleri, serum proteinleri ve hücre dışı proteinler reseptör görevi görür (27).

4.4.2. Biyofilm (“Slime”) Üretimi

Biofilm, birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş mikroorganizma topluluğudur. Kalp kapak protezi, eklem protezi, üriner ve vasküler katater gibi tıbbi cihazların yüzeylerine yapışarak kolonizasyon ve infeksiyon oluşturan *Candida* türleri antifungal direnç ve kandidemi artışına yol açarlar. Biofilm oluşturabilme yeteneği ile virülans derecesi arasında pozitif bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir (28-29).

Biyofilmlerdeki hücreler ana (planktonik) hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellikler gösterir ve antifungal ilaçlara planktonik hücrelere göre daha dirençlidir (29).

Candida hücrelerinin biyomateryale tutunup biofilm oluşturabilmesi için mantara ait hücre yüzey hidrofobisitesi, elektrostatik kuvvet gibi faktörler yanında konağa ait fibrinojen ve fibronektin gibi serum proteinlerine ihtiyaç vardır (29).

4.4.3. Enzimler

Proteinaz, fosfolipaz, lipaz gibi hidrolitik enzimlerin yapım ve salgılanması dokulara penetrasyon, beslenme ve konak immün sisteminden kaçışı sağlayarak virulansta önemli rol oynar (27).

4.4.3.1. Proteinazlar

C. albicans tarafından en sık üretilen hidrolitik enzim salgısal aspartik proteinazdır. Bu enzimleri kodlayan *SAP* gen ailesinde birbirinden farklı 10 kadar gen mevcuttur. *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* genleri yalnızca maya hücrelerinde, *SAP4*, *SAP5*, *SAP6* ise hif yapılarında bulunmaktadır. *SAP9*, *SAP10* hem maya hem hif yapılarında bulunup fungal hücre duvarına bağlıdır (27).

Salgısal aspartik proteinazlar kollojen, laminin, fibronektin, mürin, salgısal laktoferrin, α 2-makroglobulin, immünglobulinlerin tamamına yakını, interlökin-1 β , laktoperoksidaz, katepsin D, kompleman, çeşitli kan koagülasyon öncüllerini hidrolize eder. Bu özellikler mantarın virülansını ve dokulara invazyonunu sağlar (27).

4.4.3.2. Fosfolipazlar

C. albicans başta olmak üzere diğer *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* gibi fungal patojenlerde fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi ile virulansı arasında ciddi bir korelasyon bulunmuştur (28-32).

Fosfolipaz aktivitesinin mantarın doku invazyonunda önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Bu enzimler hücre membran yapısında bulunan gliserofosfolipitlerin ester bağlarını hidrolize ederek doku invazyonuna yol açar. *C. albicans*larda fosfolipaz aktivitesi non-*albicans*lara göre çok daha yüksektir. *C. albicans*'ta fosfolipaz A, B1, B2, C ve D tanımlanmıştır (31).

Fosfolipaz B, lizofosfolipaz-transaçilaz ve hidrolaz aktiviteleri nedeniyle *C. albicans*'ın virulansında çok önemlidir (27).

4.4.3.3. Lipazlar

Ekstrasellüler olarak salınan hidrolitik enzim olan lipazlar mono-di-triaçilgliserol ve diğer fosfolipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalize ederler. Bu enzimler on üyeli bir gen ailesi tarafından kodlanırlar (*LIP 1-10*). *C. albicans* dışında *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi diğer patojen *Candida* türlerinin lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiş ancak *C. glabrata*'da bu özellik izlenmemiştir (33).

4.4.4. Morfolojik ve Fenotip Değişimi

Morfogenez, bir morfotipten diğerine geçiş anlamı taşıyıp, mantarın gelişimi sırasında geçirdiği değişimleri ifade eder. Bir morfotipten diğerine geçiş mantarın yaşaması için şart olmayıp, mantarın farklı ortam koşullarına uyum sağlayabilmesi ve üreyebilmesi için geliştirdiği bir mekanizmadır (19).

C. albicans'ın patojen olmayan morfotipi tomurcuklanan maya hücreleridir. Konağa ait; deri bütünlüğünün bozulması, bağışıklık sisteminin baskılanması, antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle patojen morfotipe değişim gerçekleşebilir. *C. albicans* maya formundan invaziv hif formuna geçerek hastalık oluşturur. Mukozadaki koşullara benzerlik gösteren 37°C'nin altındaki sıcaklık, asit pH ve serumun olmadığı bir ortam maya şeklindeki üremeyi desteklerken; 37°C sıcaklık, nötr pH ve ortamda serumun bulunması hif formunun gelişimini

destekler. Maya hücre membranındaki reseptörler tarafından algılanan sinyaller (CO₂, pH (7.5-8.0), ısı, N-asetil glukoz, prolin ve aminoasitler) hücre içine iletilmekte ve hücre içinde cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Oluşan iyon akımı sonucunda hif şeklinde uzama gerçekleşmekte olup, bu forma dönüşümün ilk basamağını çimlenme borusu oluşturur. Sinyal zayıf, ısı ve pH düşük ise septum yapımı gecikir, iyon akımı olmaz ve buradan dışarı doğru balonlaşma sonucu tomurcuk şekillenir. İnfeksiyon sırasında maya hücreleri hife göre kana ve vücut sıvılarına daha kolay yayılırken hiflerin lokal invazyon yapabilme yeteneği daha fazladır (19-34).

C. albicans izolatlarında bazı genlerin morfogenezi ve virülansı etkilediği ve bu genlerin sinyal ileti yollarında görev aldığı gösterilmiştir. Bu genlerden yoksun mutantların hif oluşumu için uygun ortamda bile maya-hif dönüşümünü gerçekleştirmediği ve virülanslarının azaldığı bildirilmiştir (34).

Fenotip değişimi, *C. albicans* suşlarında 10⁻⁴ - 10⁻¹ gibi yüksek sıklıkla, kendiliğinden gelişen, geri dönüşümlü bir olaydır. Bu değişim sonucunda düzgün, tüylü, düzensiz, yıldız, halka, noktalı ve şapka, koloni fenotiplerinin ortaya çıktığı saptanmıştır (33).

Yuvarlak-ovalimsi, beyaz (“white”) faz hücrelerinin; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürtüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük opak (“opaque”) faz hücrelerine dönüşümü “W-O” değişimi (beyaz-opak dönüşümü) olarak adlandırılmaktadır. Bu dönüşüm sırasında sadece koloni fenotipinde değil, hücre fenotipinde de değişim olmaktadır. Düşük doz UV ve sıcaklık değişimi gibi dış faktörlerin beyaz-opak dönüşümü indüklediği bilinmektedir (34).

C. albicans dışında *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* suşlarında da bu dönüşüm izlenmekte olup fenotipik değişimine uğramış suşların antifungallere daha yüksek düzeyde direnç gösterdiği belirlenmiştir (35-36).

4.4.5. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Mayaların, patogenezi esnasında hidrofobik proteinlerini hücre duvar yüzeyinde eksprese ettikleri ve konak hücresi ile hidrofobik ilişkiye girdikleri saptanmıştır (37).

4.4.6. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği

Sideroforlar, bağlı veya serbest haldeki demire yüksek afinitesi olan, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve salınan düşük moleköl ağırlıklı bileşiklerdir. *C. albicans*'ın bu molekülleri sentez etme yeteneği olmadığı için ve üreme fonksiyonları için de demire ihtiyaçları olduğundan gerekli olan demiri diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedir (38).

4.5. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Candida'lar, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan infeksiyonlara yol açabilir. İnfeksiyonlar klinik olarak kutanöz ve mukozal, kronik mukokutanöz ve sistemik kandidoz olmak üzere başlıca 3 tipte incelenmektedir (19).

4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Yüzeyel kandidozlarda etken sıklıkla kişilerin kendi ağız ve intestinal rezervuarlarından endojen kaynaklıdır. İnfeksiyonların oluşumunda konağa ait; gebelik, steroid kullanımı, diabetes mellitus gibi endokrin bozukluklar, uzun süre antibiyotik kullanımı, travma, yanık kesiler sonucu deri bütünlüğünün bozulması gibi predispozan faktörler rol alır (20).

4.5.1.1. Ağız Kandidozu

Yanak mukozası, dişeti ve dilde beyaz yama tarzı plaklar şeklinde ve ağrısız lezyonlarla karakterizedir. Bu bölgeden yapılan histopatolojik incelemede nekrotik materyal, bakteri, lökosit, yalancı hif ve maya hücreleri görülür. Membran kaldırıldığında eritemli, kanamalı zemin görülür. Orofaringeal kandidoz özellikle HIV ile infekte bireylerde sık gelişmektedir. AIDS gelişen hastaların tamamına yakınında bir dönem oral kandidoz atağı gelişmektedir. Oral kandidoz; akut pseudomembranöz, akut atrofik, kronik atrofik, kronik hiperplastik kandidoz şeklinde dört farklı klinik formda gelişebilmektedir (20).

Klinik bulgular ve alınan sürüntü örneğinin gram boyama ile incelenmesinde maya veya yalancı hif görülmesi tanı koydurucudur (39).

4.5.1.2. Özefagus Kandidozu

Özefagusta darlık, disfaji, odinofaji ve ağrı semptomları ile karakterize olup AIDS hastaları ve immün sistemi zayıflamış kişilerde en sık görülen fırsatçı infeksiyonlardan biridir. Kesin tanısı endoskopik görünüm ve alınan biopsi materyali ile konur (40).

4.5.1.3. Sindirim Sistemi Kandidozu

Ülser veya erozyon gibi mukozal lezyonlarda meydana gelir (40).

4.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz

Vulva ve vajinada kaşıntı, yanma, kızarıklık temel bulguları olup, predispozan faktörler olarak gebelik, diabetes mellitus, antibiyotik sağaltımı ve oral kontraseptif kullanımı sıralanabilir. Vulvovajinal kandidozların en sık etkeni %80 sıklıkla *C. albicans* olarak bildirilmiştir (20).

4.5.1.5. Deri Kandidozu

Bu klinik formda en sık etken *C. albicans* olup diabetes mellitus, obezite, metabolik hastalıklar *candida* kolonizasyonuna yol açar. Nem ve sürekli su ile temas predispozan faktörlerdir. Lezyonlar genellikle derinin kıvrım yerleri, intergluteal alan, inguinal bölge, koltuk altı, meme altı, parmak aralarında olup veziküler, püstüler ve düzensiz sınırlı eritamatoz alanlar şeklinde görülür (20).

4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Konjenital, immünolojik ve endokrin bozukluklar ile birlikte bulunan tekrarlayıcı mukoza, deri ve tırnak infeksiyonlarıdır. Sıklıkla yaşamın ilk üç yılında görülür. Kişilerde T lenfosit aktivasyonu bozulmuştur. Lökosit fonksiyon bozukluğu, timus disgenezi ve agamaglobulinemi ile birlikte bulunabilir (20).

4.5.3. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz, *Candida* türlerinin hematojen yayılımından kaynaklanmakta olup kandidemiyi izleyen bir tablodur. Kandidemi, kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir yada daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi anlamına gelmektedir (19-41).

Sistemik kandidoz; uzun süre kortikosteroid ilaç kullanan, lösemi, lenfoma, aplastik anemi gibi hematolojik hastalıkları olan ve kronik granülatöz hastalıklı kişilerde sıklıkla görülür (42).

4.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), doku biyopsileri, idrar, yüzeysel lezyonlardan kazıntı ve sürüntüler, ağız ve vajen sürüntü örnekleri sayılabilir (43).

Candida infeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için;

- i) Klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesi
- ii) Kan, vücut sıvıları, dokular veya diğer bölgelerden alınan örneklerden *Candida* türlerinin soyutlanması
- iii) *Candida* türünün belirlenmesi
- iv) Doku örneklerinde *Candida* benzeri mikroorganizma saptandığında bunun doğrulanması gerekmektedir (44).

4.6.1. Direkt Bakı ve Kültür

Tanı için alınan klinik örneklere uygulanacak ilk işlem direkt bakıdır. Bu işlem için yaş preparat veya Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi, kalkoflor beyazı, periyodik asit-schiff (PAS) ve methenamin gümüş boyası gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar kullanılabilir. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve methenamin gümüş boyası ile gösterilmektedir (45).

Candida türlerinin soyutlanması için önerilen primer izolasyon besiyeri SDA olup, koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, inhibitör mold agar gibi besiyerleri de kullanılabilir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi antimikotikler ilave edilerek kontaminant saprofit mantarların; kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilerek de bakterilerin üremesi engellenmektedir. Kültür plakları 25 °C'de ve 37°C'de en fazla bir hafta inkübe edilir (46-47).

Kültürde üremiş olan maya kolonilerinin tanımlanması için en hızlı, basit ve değerli testlerden biri çimlenme borusu testidir (16). Test ön tanımlamayı sağlar, klinik örneklerden soyutlanan *C.albicans* ve *C. dubliniensis*'in çimlenme borusu testi %95-97 sıklıkla pozitifdir (44).

Tanımlama için ikinci önemli basamak mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü-tween 80 agar gibi besin açısından fakir besiyerlerine inoküle edilerek lam kültürü yapılmasıdır (48). Blastokonidyumların özelliklerine, yalancı hif boyunca dizilimlerine göre gösterdikleri farka ve besiyerindeki morfolojilerine göre birbirlerinden ayırt edilebilirler (42).

Mısır unu-tween 80 agar 25°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra hiflerin uçlarından geniş, kalın duvarlı, genellikle tekli terminal klamidosporeler, gerçek ve yalancı hifler, yalancı hiflerin çevresinde kümeler oluşturmuş blastokonidyaların görülmesi *C. albicans* olarak tanımlanır. Yalancı hifler boyunca, tekli veya küçük düzensiz kümeler halinde az sayıda blastokonidya üretimi, bunun yanı sıra gerçek hif oluşumu gözlenebilmesi, nadiren yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, göz yaşı damlası şeklindeki hücrelerin varlığı *C. tropicalis*'i gösterir (49).

C. guilliermondii az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri oluşturur, gerçek hif üretmez. *C. parapsilosis* eğri görünümdeki kısa yalancı hifler boyunca tekli veya küçük kümeler halinde dizilmiş blastokonidyalar ve nadiren dev hücreler olarak isimlendirilen büyük hifler üretir. *C. krusei* çapraz konulmuş odun kütükleri veya ağaç benzeri görünüm veren uzun blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturur. *C. glabrata* ise terminal tomurcuklanma ile küçük oval maya hücreleri üretir, yalancı hif oluşturmaz. *C. kefyr* tipik olarak bir dereye yüzen kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturur (49).

Candida türleri kromojenik besiyerlerinde de soyutlanabilmekte ve aynı zamanda tanımlanabilmektedir. Bu besiyerlerinin çalışma prensibi ekzoenzim aktivitesi ile parçalanan çeşitli substratlardan farklı kromojenik yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu temeline dayanmaktadır (16-50).

Candida türlerinin tanımlanması için kullanılan metabolik testler arasında karbonhidrat asimilasyon, karbonhidrat fermentasyon testleri ve üreaz testi gibi testler bulunmaktadır.

Mayaların tür düzeyine kadar soyutlanmasında esas dayanak noktası karbonhidrat asimilasyon testidir. Bu test mayanın oksijen varlığında belirli bir karbohidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer (16).

4.6.2. Serolojik Tanı

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında tanıya yardımcı olmak amacıyla *Candida* türlerine özgü antijen, antikor veya metabolitlerin saptanması temeline dayanan çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir (51-52).

4.6.2.1. Antijen Saptayan Testler:

Sistemik kandidoz tanısı için dolaşımda bulunan *Candida*'ya ait pek çok antijen kullanılabilir. *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türleri tarafından üretilen indüklenebilir bir enzim olan salgısal aspartik proteinaz (Sap), bu antijenlerden biridir. Sap'ın aktif doku invazyonu süresince üretildiği ve invaziv hastalık ile korele olduğu bildirilmiştir (50). Bir çalışmada Sap'ın enzim immün assay (EIA) ile incelenmesinin sistemik kandidozu kolonizasyondan ayırdığı saptanmıştır (53).

Tanı amacıyla sitoplazmik antijenler de aranabilmektedir. Bunlardan en fazla kullanılanı 48 kDa'luk sitoplazmik bir protein olan enolazdır. Bu antijenin kolonizasyon ve invaziv infeksiyonu ayırabileceği düşünülmektedir (51-52).

Tanımlayıcı diğer bir antijen mannan olup, invaziv kandidoz tanısında en fazla kullanılan antijendir (11). Sağlıklı bireyde anti-mannan antikorları mannanı hızla uzaklaştırmaktadır. Bu nedenle immün sistemi sağlam kişilerde tanı değeri sınırlıdır. Ancak immün sistemi zayıflamış kişilerde yeterli antikor yanıtı olmadığından mannan antijeninin aranması yararlıdır (51).

Dolaşımdaki mannanı saptamak için radioimmünassay (RIA), EIA, lateks aglütinasyon (LA) gibi testler kullanılmaktadır. Bu antijen ısıya dayanıklı, kaynatmaya, proteinaz ile işlemlenmeye ve asit pH'a dirençlidir. Bu nedenle antijen-antikor kompleksleri enzimatik işleme veya EDTA varlığında kaynatma ile ayrılabilir. Mannanemi örnekleme sıklığına, altta yatan hastalığa, immün yetmezliğin derecesine, ilgili *Candida* türlerine, sistemik kandidozun tanımlanmasına, bağlayıcı antikorların titresine, özgüllüğüne ve kullanılan test yöntemine göre sistemik kandidozlu hastaların yaklaşık %31 ile %90'ında belirlenebilmektedir (50).

Kandidoz tanısında aranan bir diğer antijen glukan'dır. Glukan, (1-3)- β -D- glukoz polimerlerinden oluşmuş *Zygomycetes* dışındaki mantarların polisakarit yapıdaki hücre duvar

elemanıdır. Ayrıca aktif olarak da salgılanmaktadır. Denizde yaşayan ve at nalı yengecinden elde edilen faktör G, beta glukan ile temas ettiğinde kimyasal bir tepkime verir. Beta glukan testi bu kimyasal etkileşim temeline dayanan bir testtir. Glukan, prokaryotlarda, virüslerde ve insanlarda bulunmaz. Test bir mantar infeksiyonuna özgün olmayıp, hastada genel olarak sistemik bir mantar infeksiyonu varlığını gösterir (50-52).

4.6.2.2. Antikor saptayan testler

Sistemik kandidoz tanısı için antikor saptanması yüzeysel kolonizasyonlu hastalarda antikor titrelerinin yüksekliği nedeni ile yalancı pozitif sonuçlara yol açabilirken, immun yetmezlikli hastalarda antikor seviyesinin düşük veya saptanamayacak kadar az olması nedeniyle yalancı negatif sonuçlara neden olabildiğinden tanı değeri sınırlıdır (50).

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tanısında mannan, 54 kDa, 52 kDa'luk sitoplazmik protein antijenleri, Sap gibi çeşitli *Candida* antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar araştırılmaktadır (50).

4.6.2.3. Kombine Testler

Yapılan çalışmalarda invaziv kandidoz tanısı için antijen veya antikor saptayan testleri tek başına kullanmaktansa kombine uygulanan antijen-antikor testlerinin daha yararlı olduğu görülmüştür (50).

Antijen-antikor testlerinin birlikte kullanıldığı retrospektif bir çalışmada 43 hastadan alınan 162 serum örneğinde, tek başına kullanılan *C. albicans* mannan serum antijenini saptayan test ile duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %40 ile % 98, yalnızca antikor saptayan test ile bu değerler sırasıyla %53 ve 94 bulunurken, antijen ile antikor testi kombine edildiğinde duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %80 ve %93 olarak belirlenmiştir (50).

4.6.2.4. Metabolit saptayan testler

C. krusei ve *C. glabrata* hariç, birçok *Candida* türü tarafından oluşturulmakta olan mantara özgül polialkol olan D-arabinitol'ün idrar ve serumda saptanması ile invaziv kandidoz tanımlanabilir (54).

İnsan serumu veya idrarında, D-arabinitol varlığının veya D-arabinitol / L-arabinitol oranının belirlenmesinde gaz-likit kromatografisi, gaz kromatografisi-kitle spektrometrisi ve enzimatik yöntemler gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (54).

4.6.3. Deri testleri

Candida ekstrelerinin (örneğin, kandidin) deri-içi injeksiyonu ile gerçekleştirilir. Normal sağlıklı kişilerin %94'ünde, 48 saat sonra 10 mm çapında bir endürasyon ortaya çıkar. Bu tip reaksiyonlar geçirilmiş ya da subklinik infeksiyonları gösterir. Reaksiyon yokluğu hücrel bağışıklık sisteminde bozukluğu veya mantar ile karşılaşmamış olmayı düşündürür (55).

4.6.4. Moleküler Tanı

Özellikle bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda kandidozun hızlı tanısı ve sağaltımın erken dönemde gerçekleşmesi yüksek mortalite hızını düşürmek açısından önemlidir (56). Moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce ve/veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır. Bunun yanında epidemiyolojik amaçlarla izolatlar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya konması, antifungal direnç ve virulans faktörlerinin varlığının genotipik olarak saptanması, genom baz dizisi ve mutasyon analizleri, filogenetik (taksonomik) incelemeler için kullanılmaktadır (56).

Kullanılan moleküler yöntemler, hibridizasyon “probe”larının kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki gruptur.

4.6.4.1. Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri

4.6.4.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde patojen mantarı saptamak veya tanımlamak için polimeraz zincir tepkimesi (PZT) veya benzeri yöntemler kullanılır. PZT, özgül bir DNA parçasının kopyalarının öncüller tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan bir yöntemdir (57-58).

Candida türlerinin tanısında kullanılan hedef bölgeler iki gruba ayrılabilir. Bunlar ön amplifikasyon ve tür düzeyinde tanımlama için kullanılan hedef bölgelerdir. Ön amplifikasyon için genellikle genom içerisinde kopya sayısının çok olması nedeniyle ribozomal DNA (rDNA) (40-80 kopya) ve kopya sayısı rDNA genlerinden daha az olan mitokondriyal DNA (yaklaşık 30 kopya) genleri tercih edilir. Bu amaçla; tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri kullanılır. Korunmuş olan bu bölgeler türler arasında yeterince farklılık göstermemeleri nedeniyle identifikasyon için uygun değildir. Bu sebeple *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasında; ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan "internal transcribed spacer" (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P-450 lanosterol- alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef bölge olarak kullanılmaktadır. rRNA genleri bunun yanında içerdikleri korunmuş ve değişken bölgeleri ile filogenetik analizler için de uygun hedef bölgelerdir.

Çoğunlukla başvurulan moleküler yöntem, genomik olarak korunmuş gen bölgelerinin bir çift özgül öncül kullanılarak ön ampifikasyonu ile başlar. Böylece ilk basamakta hastanın bir fungus ile infekte olup olmadığı saptanmış olur. İkinci basamakta ise, ikinci bir moleküler ve genetik yöntem uygulanarak tür düzeyinde tanımlamaya gidilir (56).

Amplifikasyon temeline dayalı bir yöntem ile 100 mikrolitre kan, idrar veya balgam gibi örneklerde on civarında maya hücresinin saptanması mümkün olmaktadır. Hedef bölgenin genom içerisinde çoklu kopyasının taşınması durumunda bir-beş maya hücresi bile saptanabilmektedir (56).

Moleküler yöntemler, geleneksel tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında, artmış duyarlılığa ve kısalmış uygulama süresine sahiptir. İnvaziv fungal infeksiyonlara kısa sürede, özgül tanı konabilmesi ve uygun sağaltıma başlanabilmesi açısından moleküler yöntemlerin önemi artmakta ve gelişmesi gerekmektedir (57).

4.6.4.1.2. Sekanslama (Dizi Analizi)

Mantarları tanımlamak için bir alternatif de nükleik asit dizi analizi yapılmasıdır. Geniş kapsamlı PZT ve dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi, veri tabanından bilinen diziyile karşılaştırılır ve tanımlama iki dizi arasındaki benzerliğe dayanarak yapılır (57).

Gen dizi bilgileri, kültürde üremiş mantarların tanımlanması için veya kan, doku gibi örneklerde etken mantarın gösterilmesi ve tanımlanması amacıyla kullanılabilir.

Yine bu verilere göre mantarın, diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi bulunabilir ve sağaltımında kullanılacak antifungal ilaçlar akılcı olarak seçilebilir (59).

4.6.4.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri

Etkene ait genetik yapının hedef olarak alındığı, nükleik asit hibridizasyon “probe”lerinin kullanıldığı yöntemlerdir.

4.7. Antifungal İlaçlar ve Direnç

Mantar infeksiyonlarında son 20 yıl içinde gözlenen artış ile birlikte hem sistemik hem de bölgesel mantar infeksiyonlarının sağaltımı için antifungal ilaçların kullanımının artması bu bileşiklere direnç gelişimini hızlandırmıştır (60).

Sistemik mantar infeksiyonlarının sağaltımında kullanılan farklı kimyasal yapıda olan antifungal ilaçlar; polyenler, azol türevleri, antimetabolitler, allilaminler, hücre duvar inhibitörleri ve yeni antifungaller olarak sıralanabilir (61).

4.7.1. Polyenler

4.7.1.1. Amfoterisin B

Streptomyces nodosus'dan elde edilmiştir. Suda iyi çözünmez. Ticari olarak mevcut olan parenteral formülasyon, amfoterisin B (AmB) deoksikolattır. AmB'nin nefrotoksik bir bileşik olması nedeniyle, lipid formülasyonları geliştirilmiştir. Klinik kullanımda olan bu formülasyonlar, lipozomal AmB, AmB lipid kompleks ve AmB kolloidal dispersiyondur. Lipid AmB bileşiklerinin daha iyi tolere edilmeleri ve lipidli AmB'nin infeksiyon bölgesine konvansiyonel formülasyona göre daha yüksek düzeylerde ulaşması sebebiyle lipid AmB bileşiklerinin invivo aktivitesi, konvansiyonel AmB'ye göre daha iyidir (61).

Fungisidal etkisini mantar hücre membranında bulunan başlıca sterol olan ergosterole bağlanarak gösterir. Bu bağlanma, hücre duvarında porlar oluşturup hücrenin geçirgenliğinin artmasına neden olur, membranın ozmotik bütünlüğünü bozar ve ardından bu olay hücre içi

potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin hücre dışına kaçıışı ve mantar hücresinin ölümü ile sonuçlanır (61-62).

AmB, patojen mantarların birçoğuna etkili, geniş spektrumlu bir ilaçtır. Bu etki spektrumu, *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, *Mucor* türleri, *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* ve *Paracoccidioides brasiliensis*'in birçok kökenini kapsar. Buna karşın *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Aspergillus terreus* AmB'ye intrensek dirençlidir. Sekonder direnç ise *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türlerinde bildirilmiş olmasına karşın nadirdir (61-63).

AmB'ye karşı sekonder direnç, hedef membran lipidlerinin özellikle sterolün değişimi ile veya plasmalemmadaki ergosterol miktarında azalma nedeniyle AmB'nin bağlanmasında bir azalma sonucu meydana gelmektedir. Bu durum ergosterol biyosentez basamağında yer alan $\Delta 5-6$ desaturaz enzim sisteminde oluşan bir bozukluk nedeniyle, mantarın ergosterol yerine ergosterol benzeri bileşikler yapmasından kaynaklanır. Diğer direnç mekanizmaları ise fosfolipidlerin yapısının bozulması, değişimi ve katalaz aktivitesinin artmasıdır (63).

AmB'nin başlıca yan etkisi nefrotoksitedir. Bunun dışında, AmB ile sağaltım sırasında akut yan etkiler (ateş, titreme, myalji, hipotansiyon, bronkospazm) ve tromboflebit gelişebilir (61).

4.7.1.2. Nistatin

Streptomyces albidus, *Streptomyces noersei*'den sentez edilmiştir. Topikal kullanılan bir polyendir. Sistemik kullanım için lipozomal formu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (61).

4.7.2. Azol Türevleri

1970'li yıllarda yeni bir sınıf antimikotik ilaç olarak azoller geliştirilmiştir (64). Azol sınıfı antifungal ilaçlar azol halkasındaki nitrojen sayısına göre sınıflandırılırlar. Azol halkasında iki yada üç azot bulunmasına göre sırasıyla imidazoller (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol) veya triazoller (itrakonazol, flukonazol, vorikonazol) olarak sınıflandırılır (65). Triazoller sınıfından posakonazol, ravukonazol ve albakonazol geliştirilmekte olan yeni kuşak azollerdir (61-66).

Azoller genel anlamda fungistatik etki gösteren ve kısmen üreme inhibisyonu yapan bileşiklerdir. Ancak bazı yeni triazollerin, bazı mantarlara fungisidal etki gösterdiği gözlenmektedir (61).

Tüm azol bileşikleri, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzim olan sitokrom P-450 bağımlı C14 α -demetilazı inhibe ederek antifungal etki gösterir (61). Azollerin antifungal etkisi sonucunda sitoplazmik membranın bütünlüğü ve fonksiyonları, besin geçişi ve kitin sentezi kaybolur ve mantarın büyümesi inhibe olur .

Ketokonazol, sistemik mikoz, dermatofitoz ve kutanöz kandidoz tedavisinde kullanılan lipofilik bir antifungaldir. Ketokonazolün hem oral hem de topikal formları mevcuttur. Mantarlara etkinlik düzeyi, klinik kullanımda olan triazolere kıyaslandığında sınırlıdır. Sağaltım sırasında hepatotoksisite, testesteron ve kortizol düzeylerinde düşme, bulantı, kusma, fotosensitivite, kaşıntı ve döküntü gözlenebilir (61).

Itrakonazol, flukonazole dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* suşlarının pek çoğu da dahil geniş bir mantar topluluğuna etkilidir. Itrakonazolün ticari olarak oral kapsül, siklodekstrin içinde oral solüsyon ve hidroksipropil- beta-siklodekstrin içinde intravenöz formları vardır. Lipofilik olması nedeniyle pürülan eksüdalarda, yağ dokusunda ve bronşiyal sekresyonlarda konsantrasyonu serumdan daha yüksektir. BOS'a yeterli düzeyde geçmez. Oküler düzeyi düşüktür. Yan etki olarak özellikle yüksek dozlarda, hipokalemi, ödem ve hipertansiyon gözlenebilir (61-62).

Flukonazol, kandidoz sağaltımında yaygın olarak kullanılan bir antifungaldir. Hem oral hem de parenteral formu mevcuttur ve suda çözünen bir bileşiktir. Hepatik, gastrik ve endokrinolojik yan etkilere düşük oranda yol açması ve suda çözünür olması nedeniyle BOS'a kolayca geçmesi başlıca avantajlarıdır.

Flukonazol, birçok *Candida* türüne etkilidir. *C. krusei*, flukonazole doğal dirençlidir. *C. glabrata* izolatlarının flukonazole duyarlılığı farklılık gösterir. Bazı *C. glabrata* izolatları flukonazole doza bağımlı duyarlı iken, %15 kadarı gerçek direnç göstermektedir. *C. tropicalis*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis* ve *C. inconspicua* izolatlarında genellikle yüksek flukonazol minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmaktadır. Flukonazole kazanılmış direnç başta *C. albicans* olmak üzere çeşitli *Candida* türlerinde gözlenmiştir (61).

Vorikonazol, yapısal olarak flukonazole benzeyen ve flukonazolden türetilmiş olan sentetik bir triazoldür. Oral ve parenteral formları mevcuttur. Flukonazole dirençli bazı *C. albicans* suşları da dahil olmak üzere geniş bir antifungal spektrumuna sahiptir. Vorikonazol, *C. krusei*'ye fungisidal etki gösterirken, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı bu etki çok düşük seviyede veya hiç yoktur. En önemli ve vorikonazole özgü yan etki geçici görme

bozukluğudur (61-62). Kimyasal yapısındaki değişiklikten dolayı hedef enzim olan 14 α -demetilaza daha fazla ilgiye sahip olup, diğer antifungallere oranla daha etkili olduğu görülmüştür (66).

Posakonazol, yapısal olarak itrakonazole benzer. *Candida* türleri başta olmak üzere pek çok mantar türüne etkilidir. Oral ve parenteral formları mevcuttur (12).

Ravukonazol, geliştirilmekte olan yeni antifungal ilaçlardan olup, sadece oral formu vardır. Posakonazol ve vorikonazole benzer etkinlik yelpazesine sahip olup insanlarda 100 saat gibi uzun yarılanma ömrüne sahiptir (67).

Başta *C. albicans* olmak üzere *Candida* türlerinde azol direncinden sorumlu birçok mekanizma bildirilmiş, flukonazol dirençli suşlarda tek bir mekanizmadan çok, birçok mekanizmanın birlikte rol aldığı ileri sürülmüştür (9).

Bu mekanizmalar:

- i) İlacın hücre içinde birikiminde azalma
- ii) İlacın hedefi olan lanesterol demetilazda değişiklik
- iii) Ergosterol biyosentezinde değişiklik şeklinde özetlenebilir (10-13).

i) İlacın hücre içinde birikiminde azalma: Azol direnci, bazen ilacın düşük hücre içi konsantrasyonuna bağlı olarak da gelişebilir. Bir mantar hücresinde ilaç birikimi; ilacın alımı, ilacın atılımı ve ilacın metabolizması arasında oluşan bir dengenin sonucunda meydana gelir. (76). İlacın alımında bozukluk ya da ilacın pompa sistemleriyle atılımının artması sonucu ilacın hücre içinde birikiminde azalma ortaya çıkmaktadır. Membran sterollerindeki ve/veya fosfolipidlerindeki değişim nedeniyle membran geçirgenliğinde ve buna bağlı olarak hücre içine ilaç alımında azalma olabilmektedir (63).

Candida türlerinde, küçük moleküllerin, hücrenin plazma membranının her iki yönüne doğru hareketinde, iki sınıfa ayrılan atım pompaları işlev görür. Bunlar ATP bağlayan kaset, ("ATP binding cassette" (ABC)) süper ailesi ve "major facilitator" süper ailesi (MFs) olmak üzere iki tiptir. ABC süper ailesi ATP'ye bağlanır ve enerji kaynağı olarak kullanır. *C. albicans* suşlarındaki azol direnci ile ABC taşıyıcılarını kodlayan *CDR* (*Candida* "drug resistance") genlerinin ilişkili olduğu belirtilmiş, dirençli suşlarda *CDR1* ve *CDR2*'nin fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (60-63). Bu pompaların fazla ekspresyonu durumunun sadece flukonazol direncine yol açmadığı flukonazol ile birlikte itrakonazol, ketokonazol, terbinafin, amorolfen ve birçok metabolite de dirence neden olduğu saptanmıştır (68).

MFs proteinleri ise çeşitli yapısal bileşiklerin transportu ile ilişkili olup, membrandaki proton farkı ile taşımayı sağlar. *C. albicans*'da iki MFs pompa geni tanımlanmıştır. Bunlar *MDR1* veya *BEN-R* geni ve *FLU-1* genidir. *MDR* geninin mRNA düzeylerindeki artışının,

azol direnci ile paralellik gösterdiği ve bunun flukonazol için özgül olduğu saptanmıştır. İkinci MFs geni olan *FLU-1* geninin aşırı ekspresyonu hiçbir dirençli klinik izolatta ortaya konamamıştır (60-63).

Sonuç olarak, *Candida* türlerinde hem *CDR* hem de *MDR* pompalarının fazla ekspresyonu ile hücre içindeki ilaç miktarında azalmaya bağlı direnç izlenebilmektedir (60).

ii) İlacın hedefi olan lanosterol demetilazda değişiklik: Hedef lanosterol demetilaz enziminin azollere afinitesinde azalma ve lanosterol demetilaz enzimini kodlayan *ERG11* geninin aşırı ekspresyonu şeklinde gelişir. Lanosterol demetilaz enziminin kalitatif ve kantitatif değişiklikleri ve dolayısıyla ilacın hücre içi konsantrasyonunda azalma azol direncinde rol oynayabilir. Enzimdeki kantitatif değişiklik sıklıkla kodlanan gendeki spontan mutasyondan köken almaktadır ve azoller için enzimin bağlanma afinitesinde azalma ile sonuçlanır (69-70). *ERG11* geninin aşırı ekspresyonu da, artan protein miktarının yüksek miktarda ilaç gerektirmesi nedeniyle, dirence katkıda bulunur (60).

iii) Ergosterol biyosentezinde değişiklik: Ergosterol biyosentez yolunda bulunan *ERG3* geni ile kodlanan $\Delta 5-6$ desaturaz enziminin inaktivasyonu ile biyosentez yolunun değişmesi veya sterol $\Delta 5-6$ desaturaz enzimidaki mutasyonlara bağlı olarak membran sterolünün yapısında değişikliğe yani ergosterol yerine, 14α metil fekosterolün birikimine yol açarak azol direncine neden olmaktadır (63).

Sonuç olarak *C. albicans* suşlarında azol türevlerine karşı birden fazla direnç mekanizmasının olduğu ve bunların basamak tarzı bir direnç gelişimine neden olduğu saptanmıştır (9).

4.7.3. 5 Flusitozin (Florositozin)

Florlanmış bir primidin olup antimetabolit olarak etki gösteren tek antifungal ilaçtır. Flusitozin, serum ve vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlara ulaşır. BOS ve diğer vücut sıvılarına kolayca geçer. Oral formu mevcuttur (61). Flusitozin, pirimidin metabolizmasını bozarak ve böylece de mantar hücresindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir (61). *C. krusei* dışındaki *Candida* türlerine etkilidir (62).

Flusitozine primer direnç ya da azalmış duyarlılık *Candida* kökenleri dahil olmak üzere birçok mantar türünde gözlenmektedir (61). Hem primer direnç olasılığı, hem de monoterapi sırasında sıklıkla direnç ortaya çıktığı için tek başına kullanılmamalı, mutlaka kombine sağaltım uygulanmalıdır (61-62).

4.7.4. Hücre Duvarına Etkili Antifungaller

Hücre duvarında bulunan glukan, kitin ve mannanı hedef alırlar. Bu yapılar insan hücrelerinde bulunmadığı için bu grup ilaçların selektif toksisite avantajları bulunmaktadır.

Ekinokandinler geniş bir etki spektrumuna sahip lipopeptit yapısındaki bileşiklerdir. Ekinokandin ve pnömokandin, β -(1,3)-glukan sentazın inhibitörü olup, glukan sentezini inhibe ederek mantarın hücre duvarı sentezini durdururlar.

Fungisidal olan bu grup, esas olarak diğer antifungallere dirençli olan suşlar dahil olmak üzere *Candida*lara etkilidir. Ekinokandinlerin, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*'ye karşı etkisinin, diğer mayalara etkisine oranla daha sınırlı olduğu görülmektedir (61-62).

İn vitro olarak, direnç genellikle hedef enzim olan glukan sentazı kodlayan *FSK1* genindeki ve hedef ile etkileşimde bulunan proteinlerdeki bozukluklar veya mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır (60-63).

4.7.5. Alilaminler

Bu grupta, klinik kullanımda olan tek sistemik alilamin terbinafin olup, sadece oral ve topikal formları mevcuttur. Terbinafin, deri, tırnak ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşır (61).

Alilaminler, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini engellerler. Ergosterol eksikliği ve skualenin yüksek konsantrasyonlarda birikmesine bağlı olarak membran yapı ve fonksiyonunun değişimi sonucu mantar hücresinin ölümü gerçekleşir. Terbinafin, azollerle kombine edildiğinde bazı *Candida* kökenlerine karşı sinerjistik etki gösterebileceği gözlemlenmiştir (61).

4.8. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son yıllarda fungal infeksiyonların artması ve buna paralel olarak antifungal ilaç kullanımının yaygınlaşması, antifungal direncin izlenmesi antifungal duyarlılık testlerinin kullanımı ve önemi artmıştır.

İn vitro antifungal duyarlılık testleri ; i) İki ya da daha fazla antifungal ilacın göreceli etkinliklerinin güvenilir bir ölçümünü sağlar. ii) İn vivo etkinlik ile paralellik gösterir ve sağaltımın muhtemel sonucunu öngörür. iii) Normalde duyarlı olan bir organizma popülasyonu içindeki direnç gelişimini izlemede kullanılan bir araçtır iv) Yeni bulunmuş deneysel ilaçların sağaltıcı potansiyelini öngörür.

“Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) tarafından M27-A3 referans yönteminin geliştirilmesi, elde edilen in vitro antifungal duyarlılık verilerinin tekrarlanabilirliğinde ilerleme sağlamış; kullanılmakta olan antifungaller için duyarlılık ve direnç sınırları belirtilerek mayalar için standardize edilmiştir (71).

En sık kullanılan antifungal duyarlılık testlerinin; makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E test yöntemleri olduğu bildirilmiştir (72).

4.8.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler

4.8.1.1. Makrodilüsyon yöntemi

Antifungal sıvı makrodilüsyon yöntemi, CLSI alt komitesi tarafından önerilen ilk yöntem olmasına rağmen, bu testin klinik laboratuvarlarda uygulanması yüksek maliyetli olmaktadır.

CLSI tarafından testte kullanılması önerilen besiyeri, L-glutamin ile bir pH indikatörü içeren ve sodyum bikarbonatsız olan RPMI 1640 sıvı besiyeridir. Besiyeri, final molaritesi 0,165 olan morfolinepropanesulfonik asit (MOPS) ile 25°C’de pH’sı 7,0 olacak şekilde tamponlanmalıdır. RPMI besiyeri, çoğu mantar için uygun olmasına karşın AmB için MİK değerlerinin saptanmasında yetersiz kalabilir.

Değerlendirme 48 saatlik 35°C de çalkalamadan inkübe ettikten sonra yapılır. Her bir tüpte oluşan bulanıklık ya da üreme, görsel olarak derecelendirilir. AmB için, görülebilir herhangi bir üreme oluşumunu engelleyen en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kabul edilir. Azoller ve 5-FC için, üreme kontrolüne göre, üremeyi %80 oranında azaltan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak tanımlanır (71-72).

4.8.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi, makrodilüsyon yöntemine benzer ve antifungal duyarlılık testleri içinde en yaygın kullanılan yöntemdir.

Mikrodilüsyon yöntemiyle tutarlı MİK sonuçları elde edilebilmektedir ve bazı ilaçlar için elde edilen MİK değerlerinin laboratuvarlar arası uyumu, makrodilüsyon ile elde edilen değerlerinininkine göre daha yüksek olabilmektedir.

Mikrodilüsyon testi, steril, tek kullanımlık ve 96 kuyucuklu U tabanlı mikrodilüsyon plaklarında uygulanır. RPMI 1640 besiyeri, iki kat yoğunlukta hazırlanmış ilaç çözeltisi ve maya süspansiyonları kullanılır. CLSI, 24. ve 48. saatlerde gözle ve azoller için spektrofotometrik olarak değerlendirme önermektedir. Buna göre AmB için; üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon, 5 flusitozin ve azoller için ise gözle okumada üreme kontrole göre bulanıklığın belirgin olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon ve de spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %50 oranında azaldığı kuyucuktaki değer MİK değeri olarak kabul edilmektedir (71-72).

Tablo-1. Flukonazol, AmB, flusitozin, itrakonazol ve vorikonazol için duyarlılık kategorilerine göre belirlenen MİK değerleri

	Minimal İnhibitör Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)		
	Duyarlı (Du)	Doza Bağımlı Duyarlı (DBD)	Dirençli (Di)
Flukonazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Amfoterisin B			≥ 2
Flusitozin	≤ 4	8-16	32
Itrakonazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1
Vorikonazol	≤ 1	2	≥ 4

4.8.1.3. Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi

Kolorimetrik indikatörlerin veya floresan boyaların kullanılması ile MİK değerlerinin daha kolay okunmasını ve daha objektif son nokta elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir.

Yapılan çalışmalarda kolorimetrik yöntemlerle elde edilen MİK değerlerinin, referans mikrodilüsyon ve makrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen değerlerle oldukça uyumlu olduğu görülmüştür (72).

4.8.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler

4.8.2.1. Disk difüzyon yöntemi

CLSI'nın Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi, *Candida* türlerinin flukonazol ve vorikonazol duyarlılığının araştırılabilmesi için bir disk difüzyon testi M44-A dökümanını geliştirmiştir. Bu yöntem %2 dekstroz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar ve 25 µg'lık flukonazol diskleri kullanılarak uygulanır.

Dilüsyon testlerine göre uygulaması kolay, maliyeti düşük olup, bu test ile kalitatif bir sonuç ve kantitatif bir değerlendirme yapmak mümkündür ve sonuçlar inkübasyondan 20-24 saat sonra elde edilebilir.

CLSI tarafından sınır zon çapı değerleri flukonazol için ≥ 19 mm duyarlı, 15-18mm DBD, ≤ 14 mm dirençli, vorikonazol için ≥ 17 mm duyarlı, 14-16mm DBD, ≤ 13 mm dirençli olarak belirlenmiştir (71).

4.8.2.2. E test yöntemi

Antifungal bir ilacın, dengeli bir şekilde giderek artan konsantrasyonda yerleştirildiği plastik bir şeritten, agar bazlı besiyerine difüzyonu temeline dayanan bir yöntemdir. Besiyeri olarak %2 glikoz eklenmiş RPMI 1640 agar ve Casitone agar ile azoller için MİK değerlerinin saptanması optimize edilmiş ve kısmi inhibisyonu azalttığı gözlenmiştir (73).

Vorikonazol ve flukonazol için %2 glikoz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar (MHA) kullanılarak CLSI ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (74).

4.8.3. Diğer Yöntemler

4.8.3.1. Flovsiometrik yöntem

Akım sitometri yöntemlerinin antifungal duyarlılık testlerine uyarlanmasıyla elde edilir. Bu yöntemde, antifungal bir ilaca maruz bırakıldıktan sonra, mantar hücresinde oluşan hasarı saptamak için, kültüre DNA'ya bağlanan canlı boyalar konulur. Bu yöntemle dört-altı saat gibi kısa sürede sonuç vermek mümkündür. Akım sitometri cihazına ihtiyaç duyulması, küçük laboratuvarlarda kullanılmasını engeller. Bu yöntemle saptanan MİK değerlerinin, M27-A2 yöntemiyle elde edilen değerlere yakın olduğu görülmüştür (71).

4.8.3.2. Ergosterol kantitasyonu

Azol grubu ilaçların etkinliğini ölçmek için ergosterol sentezinin kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. *Candida* türleri için elde edilen sonuçların M27-A2 ile uyumlu olduğu görülmüştür (75).

5. GERIC VE YÖNTEMLER

5.1. Suşlar

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden soyutlanan ve flukonazole Di/ DBD, kısmi inhibisyon gösterdiği belirlenen üç adet, flukonazole Du bulunan yedi adet, Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan gönderilen flukonazole Di/ DBD üç adet, Uludağ Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan gönderilen bir adet flukonazole DBD *C. albicans* suşu çalışmamıza alındı. Ayrıca Prof. Dr. Dominique Sanglard tarafından gönderilen DSY 289 ve DSY 292 no'lu iki adet flukonazole Di ve DSY 347 no'lu bir adet flukonazole Du *C. albicans* suşu ile Dr. Ann Holmes tarafından gönderilen Prof. Dr. Theodore C. White'a ait olan FH8 (MML609) nolu *C. albicans* suşu ve de flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 araştırmamızda kontrol olarak kullanıldı. Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) -80°C'de stoklandı.

Çalışmamıza alınan tüm *C. albicans* suşlarının CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak yapılan mikrodilüsyon ve E test ile belirlenen flukonazol MİK değerleri tablo 2 ve 3'te özetlenmiştir.

Tablo-2: Flukonazole Di/DBD/kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının MİK Değerleri (µg/ml)

Suş No	Minimal İnhibitör Konsantrasyon (µg/ml)			Duyarlılık Kategorisi
	Mikrodilüsyon yöntemi 48 saat	YEPD agar / E test yöntemi 24 saat	0,5µg/ml siklosporin A içeren YEPD agar / E test yöntemi 24 saat	
H1	64	>256	>256	Di
H2	16	48	64	DBD
H3	32	96	128	DBD/ Di
Bursa	32	64	64	DBD/ Di
1978	1024	0,5	0,5	Kısmi inhibisyon
348	1024	0,5	0,5	Kısmi inhibisyon
93-05	1024	1,5	0,5	Kısmi inhibisyon

Tablo-3: Flukonazole Du *C. albicans* suşlarının MİK Değerleri (µg/ml)

Suş No	MİK Değerleri (µg/ml)	Duyarlılık Kategorisi
533	0.500	Du
565	0.500	Du
644	0.250	Du
960	8	Du
1221	0.125	Du
1453	0.250	Du
2157	0.250	Du

Çalışmamıza alınan tüm *C. albicans* suşlarının CLSI M27-A2 standartlarına uygun olarak yapılan mikrodilüsyon ile belirlenen MİK değerleri tablo 4 ve 5’de özetlenmiştir (76).

Tablo-4: Flukonazole Di /DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

Suş No	Antifungal İlaçların MİK Değerleri (µg/ml)						
	Flukonazol	5Flusitozin	AmB	İtrakonazol	Ketokonazol	Mikonazol	Klotrimazol
H1	>64	32	1	4	4	>64	1
H2	16	32	1	2	2	64	0.125
H3	32	16	0.500	2	2	64	0.125
B	32	32	1	1	2	>64	0.250
1978	>64	32	1	>8	>16	>64	0.500
348	>64	32	0.500	2	2	>64	0.250
93-05	>64	64	1	0.500	0.500	0.125	0.250

Tablo-5: Flukonazole Du *C. albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

Suş No	Antifungal İlaçların MİK Değerleri (µg/ml)						
	Flukonazol	5Flusitozin	AmB	İtrakonazol	Ketokonazol	Mikonazol	Klotrimazol
533	0.500	16	0.500	0.250	0.030	2	0.125
565	0.500	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125
644	0.250	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125
960	8	16	0.500	0.250	0.030	8	0.250
1221	0.125	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125
1453	0.250	16	0.500	0.500	0.030	8	0.125
2157	0.250	32	1	0.500	0.060	16	0.250

5.2 Semi Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT)

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının ergosterol demetilazı kodlayan *ERG11*, atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri Semi kantitatif RT-PZT yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla önce suşlardan RNA elde edildi daha sonra cDNA eldesi ve PZT uygulandı.

5.2.1 RNA Eldesi

Stok besiyerlerinden SDA'ya pasajlanan suşlar 37°C'de 48 saat inkübe edilerek üretildi. Üretilen suşlardan bir öze dolusu alınıp, 10 ml Sabouraud dekstroz buyyon bulunan cam tüplerin içine karıştırıldı.

5.2.1.1 Sabouraud Dekstroz Buyyon Hazırlanması:

20 gr/lt pepton (AppliChem,A2208,0500)

80 gr/lt dekstroz (AppliChem, A3666,0500)

Bu bileşime göre Sabouraud dekstroz buyyon distile su içerisinde hazırlandı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlandı.

Sabouraud dekstroz buyyonda 37°C’de 15-16 saat inkübe edilen sıvı kültürler karıştırıldıktan sonra kültürlerden 100 µl alınıp 9900 µl taze Sabouraud dekstroz buyyon içeren başka cam tüplere aktarılarak karıştırıldı. Seyreltilmiş bu kültürler çalkalayıcı yerleştirilen bir etüvde 37°C’de çalkalanarak orta-logaritmik faza erişinceye dek (optik yoğunlukları 600nm’de 0,8-1 arasında oluncaya kadar) inkübe edildi. Spektrofotometrik ölçüm ile optik dansiteleri 0,8-1 olduğu belirlenen kültürler RNA izolasyon basamağına alındı (77).

Kültürler YeaStar RNA Kit (ZYMO RESEARCH R1001&R1002) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyona alındı. 1,5 ml kültür (1,5 X 10⁷ hücre) 500 x g’de 2 dakika santrifüjlenerek çökelti oluşturuldu. Süpernatant dikkatlice atıldı. Bu hücre çökeltisine 80µl YR “digestion” tampon ve 5µl zimolaz solusyonu eklendi. Çökelti tekrarlayan pipetlemelerle tamamen karıştırıldı. Süspansiyon 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra 160µl YR lizis tamponu eklendi, vortekslenerek iyice karıştırıldı. Daha sonra mikrosantrifüjde 7000rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bir toplama tüpü içindeki spin kolona aktarıldı, 14000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Sonrasında 200µl RNA yıkama tamponu kolona eklendi ve yıkamak için 14000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Spin kolon 1,5 ml’lik yeni RNaz olmayan ependorfa aktarıldı. Kolon membranına doğrudan 60µ DNaz-RNaz içermeyen su eklendi. 14000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek RNA elde edildi.

5.2.1.2 DNaz İle İşlem:

Elde edilen RNA’lar cDNA sentezine alınmadan önce DNaz (DNase I, 3000u/mg) AppliChem, A3864,0005) ile muamele edildi. 60µl RNA 0,8µl DNaz ile 37°C’de 1 saat tutuldu. Daha sonra RNA’lar -80°C’de saklandı (77).

5.2.1.3 RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

DNaz ile işlemlenen RNA'ların konsantrasyonunun hesaplanması için RNA'dan 10µl alınıp 90µl steril distile su ile 100µl'lik küvet hacmine spektrofotometrede 260 nm'de ölçüm yapıldı (77).

'OD 260 değeri X 40 X Dilüsyon Faktörü' formülü ile ml'deki RNA miktarı µg cinsinden belirlendi.

5.2.2 cDNA Eldesi

Elde edilen RNA, "revertaid first strand cDNA synthesis kit" (Fermentas K1622) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda cDNA sentezine alındı. 1µg RNA, 1µl "random hexamer primer" (0,2µg/µl) ve dietil pirokarbonat (DEPC) ile işlemlenmiş su toplam hacim 12µl olacak şekilde karıştırılıp, 70°C'de 5 dakika tutuldu. Ardından 4µl 5x reaksiyon tamponu, 1µl ribonükleaz inhibitörü, 2µl 10mM dNTP karışımı karıştırılarak eklendi. 25°C'de 5 dakika tutuldu; daha sonra 1µl M-MuLV revers transkriptaz (200u/µl) eklendi. 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 10 dakika tutularak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA -20 °C'de saklandı.

5.2.2.1 cDNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

cDNA'dan 5µl alınıp 95µl steril distile su ile 100µl'lik küvet hacmine tamamlandı ve spektrofotometrede 260 nm'de ölçüm yapıldı.

'OD 260 değeri X 50 X Dilüsyon Faktörü' formülü ile ml'deki cDNA miktarı µg cinsinden hesaplandı. Ardından 5µg cDNA'nın µl olarak değeri ve PZT'e alınacak cDNA miktarı belirlendi.

5.2.3 PZT Uygulanması

5.2.3.1 PZT için Gerekli Malzemelerin Hazırlanması

Tamponlar

- “*Taq*” DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas EPO 402) (5U/ μ l)
- 10x “*Taq*” tampon (MBI Fermentas EPO 402)
- 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas EPO 402)
- dNTP karışımı (Fermentas R0192): Her biri 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP’den eşit hacimde bulunan karışımdan 50 μ l’lik PZT için son konsantrasyonu 200 μ M olacak miktarda kullanıldı.

- TE tamponu (pH: 8.0): 2.5 ml 1 M Trizma “base” (Sigma T 6066) (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) karıştırılıp, hacim 250 ml’ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

TE tamponu için Tris ve Na₂EDTA çözeltisi hazırlanması:

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

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

Öncüller, 100 μ l TE çözeltisi ile sulandırıldı ve bu ana dilüsyondan distile su ile 25pmol/ μ l’lik alikotlar hazırlanıp -20°C’de saklandı.

5.2.3.2 PZT Çalışmasında Kullanılan Öncüller

CDR1 için :

“ forward” : 5’ TCGTTATCCCAACTCCAAGTATG 3’

“reverse” : 5’ GACCAGCTTCAATATCACCTTTG 3’

CDR2 için :

“ forward” :5’ ATGCTGATGCCCTAGT 3’

“reverse” : 5’ GCTTCCTTAGGGACATGG 3’

ACT1 için:

“forward” : 5’ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC 3’

“reverse” : 5’GTTTGGTCAATACCGCAGCTTCCAAA 3’

MDR1 için:

“forward” : 5’GAGTCGTAGCTACATTGCCATTAACA 3’

“reverse” : 5’ GGTGATTTCTAATGGTCTCCATAATGT 3’

ERG11 için

“forward” : 5’ ATTGGTATTCTTATGGGTGGTCAACATAC 3’

“reverse” : 5’ CCCAATACATCTATGTCTACCACCACC3’

5.2.3.3 PZT Karışımı ve Isı Döngüsü

PZT döngüsü, *ACT1*, *CDR1* ve *MDR 1* için Looi ve arkadaşlarının (78), *ERG 11* için Henry ve arkadaşlarının (79) önerdiği şekilde 50 µl’lik total hacimde optimize edildi. PZT karışımı aşağıdaki şekilde uygulandı.

	Reaksiyon Hacmi	Son konsantrasyon
Nükleaz içermeyen steril distile su		-
10x'' <i>Taq</i> ''DNA tampon	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	3 µl	1.5 mM
dNTP karışımı	1 µl	0.2 mM
F öncülü	1 µl	25 pmol
R öncülü	1 µl	25 pmol
'' <i>Taq</i> ''DNA polimeraz	0.5µl	2.5 U/50µl
cDNA	5 µg	-
Toplam hacim	50 µl	-

Tepkime ısısı döngüsü:

CDR1 ve *ACT1* için;

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 1 dakika denatürasyon

57°C'de 1 dakika birleşme

72°C'de 1 dakika uzama

72°C'de 5 dakika son uzama

} 25 döngü

CDR2 için;

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 1 dakika denatürasyon

58°C'de 1 dakika birleşme

72°C'de 1 dakika uzama

} 5 döngü

94°C’de 1 dakika denatürasyon
56°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama

} 10 döngü

94°C’de 1 dakika denatürasyon
54°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama
72°C’de 5 dakika son uzama

} 10 döngü

MDRI için;

95°C’de 5 dakika ön denatürasyon
94°C’de 1 dakika denatürasyon
52°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama
72°C’de 5 dakika son uzama

} 25 döngü

ERGII için;

95°C’de 5 dakika ön denatürasyon
94°C’de 1 dakika denatürasyon
65°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama

} 5 döngü

94°C’de 1 dakika denatürasyon
60°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama

} 10 döngü

94°C’de 1 dakika denatürasyon
50°C’de 1 dakika birleşme
72°C’de 1 dakika uzama

} 10 döngü

72°C’de 5 dakika son uzama

Ürünler +4°C’de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

5.2.4 PZT Ürününün Görüntülenmesi

5.2.4.1 Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

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

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

Agaroz: (Sigma A 5093)

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

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

5.2.4.2 PZT Ürününün Görüntülenmesi

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

5.2.5 PZT Ürünlerinin Kantitasyonu

Sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi ve bilgisayarlı görüntüleme cihazında görüntüledi. *ACT1* için 515 bazçiftlik, *CDR1* için 447 bazçiftlik, *CDR2* için 364 bazçiftlik, *MDR1* için 590 bazçiftlik, *ERG11* için 513 bazçiftlik görüntüler izlendi. Her suş için mevcut görüntülerin kantitasyonu yapıldı (Quantity One Software BioRad), internal kontrol olarak kullanılan *ACT1* geni ile karşılaştırılıp oranlandı ve grafikleri çizildi. Ayrıca her suş *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırıldı, bu suş bir kabul edilerek oranlama yapıldı ve grafiklendirildi.

Bu çalışmalar birbirlerinden bağımsız üç çalışma olarak tekrarlandı ve birbiriyle uyumlu olan iki çalışma bir arada değerlendirildi.

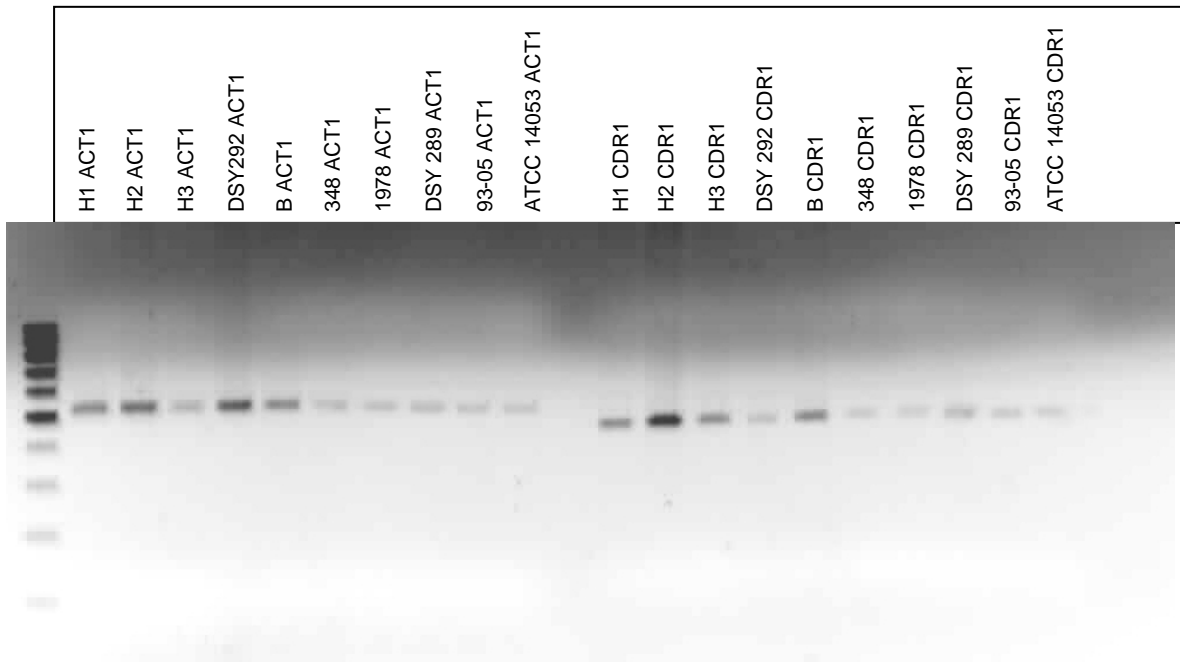
6.BULGULAR

Çalışmamızda flukonazole Di/DBD H1, H2, H3, B suşları ile flukonazole Di/ kısmi inhibisyon gösteren 1978, 348, 93-05 no'lu *C.albicans* suşları yanında yedi adet flukonazole Du ve de flukonazole Di *ERG11* ve *MDR* salınımı artmış DSY 292, *ERG11* ve *CDR* salınımı artmış DSY 289, flukonazole Du DSY 347, *CDR2* salınımı artmış MML609, flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşları kullanılmıştır.

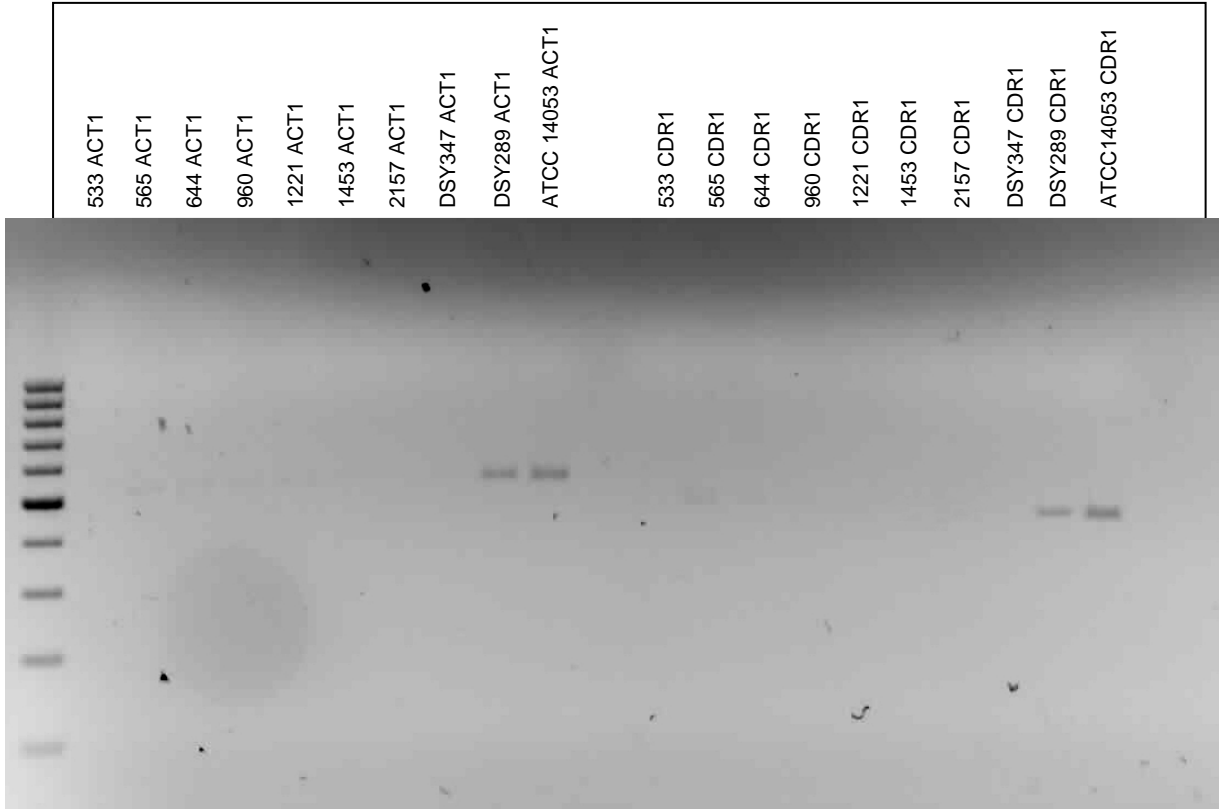
Suşların *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* gen ekspresyon düzeyleri birbirlerinden bağımsız üç çalışma olarak semikantitatif RT-PZT yöntemi ile incelenmiş olup, elde edilen ürünler %1,5'lük agaroz jelde görüntülenmiştir. Her suşun jel görüntülerinin kantitasyonu, *ACT1* ile normalizasyonu ve de *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırması yapılmıştır.

6.1 *CDR1* Ekspresyon Düzeyleri

Flukonazole Di/ DBD/ Du *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR1* genleri için belirlenen jel görüntüleri şekil 1 ve şekil 2' de izlenmektedir.



Şekil- 3. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR1* genleri için elde edilen jel görüntüsü



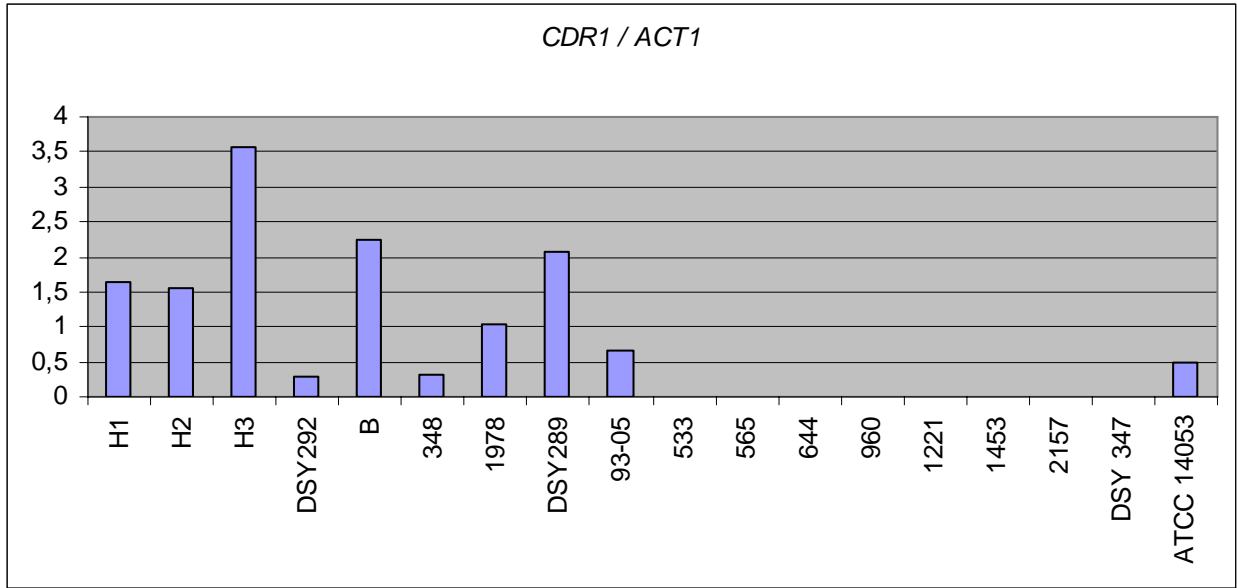
Şekil- 4. Flukonazole Du *C.albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR1* genleri için belirlenen jel görüntüleri

Şekillerde izlendiği üzere *CDR1*, flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşunda ve flukonazole Du *C. albicans* suşlarında düşük düzeyde eksprese edilirken veya hiç eksprese edilmezken flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarında belirgin oranda daha fazla eksprese edilmiştir (şekil 1,2).

Jel görüntülerinden yapılan kantitasyon sonucunda çalışmaya alınan suşların *ACT1* ve *CDR1* genleri için saptanan sayısal değerleri ile $CDR1 / ACT1$ normalizasyon oranları Tablo 6'da, grafiği ise şekil 3'de gösterilmiştir.

Tablo-6. Çalışmaya alınan tüm suşların *ACT1*, *CDR1* genleri için belirlenen sayısal değerleri ve *ACT1* ile normalizasyon oranları

Suş No	<i>ACT 1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR1/ACT1</i>
H1	131	215	1,64
H2	175,5	273,5	1,56
H3	115	412,5	3,58
DSY292	436,5	128	0,29
B	236	528	2,24
348	139	44,5	0,32
1978	14,5	15	1,03
DSY289	25,5	53	2,07
93-05	38	25	0,66
533	0	0	0
565	0	0	0
644	0	0	0
960	0	0	0
1221	0	0	0
1453	0	0	0
2157	0	0	0
DSY 347	0	0	0
ATCC 14053	29,5	15	0,5

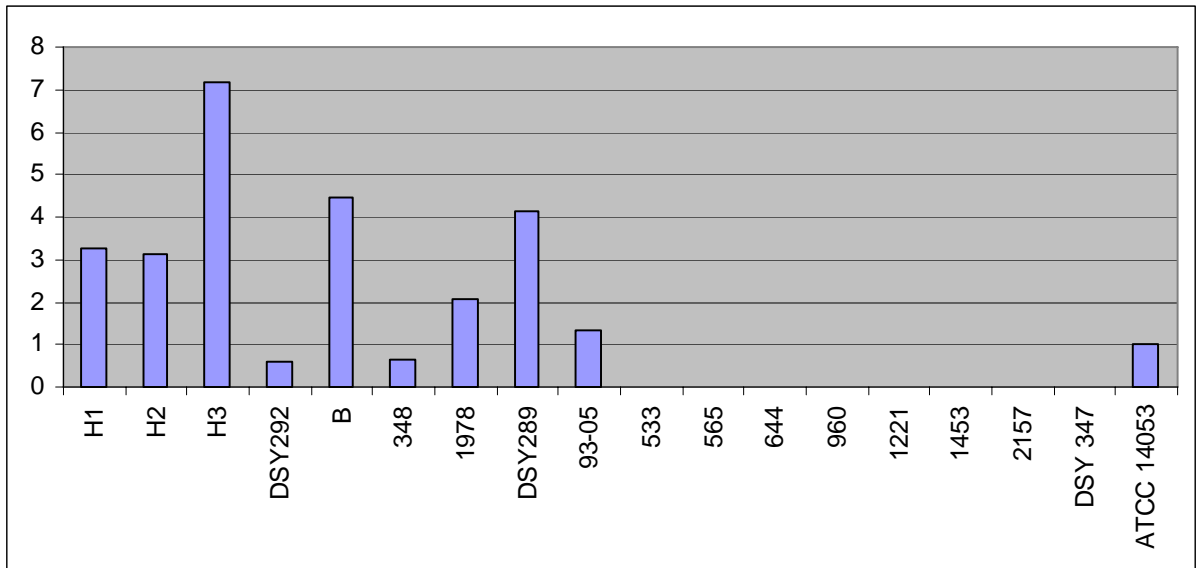


Şekil- 3. Çalışılan suşların *ACT1* ile normalizasyon sonrasında oluşturulan grafiği

Her suşun normalize edilmiş *CDRI* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırılıp oranlanması ile elde edilen değerler tablo 7’de, bu değerlerin grafiklendirilmesi de şekil 4’de görülmektedir.

Tablo-7. Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler

Suş No	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 Suşuna Göre Gen Ekspresyon Oranı
H1	3,28
H2	3,12
H3	7,16
DSY292	0,58
B	4,48
348	0,64
1978	2,06
DSY289	4,14
93-05	1,32
533	0
565	0
644	0
960	0
1221	0
1453	0
2157	0
DSY 347	0
ATCC 14053	1

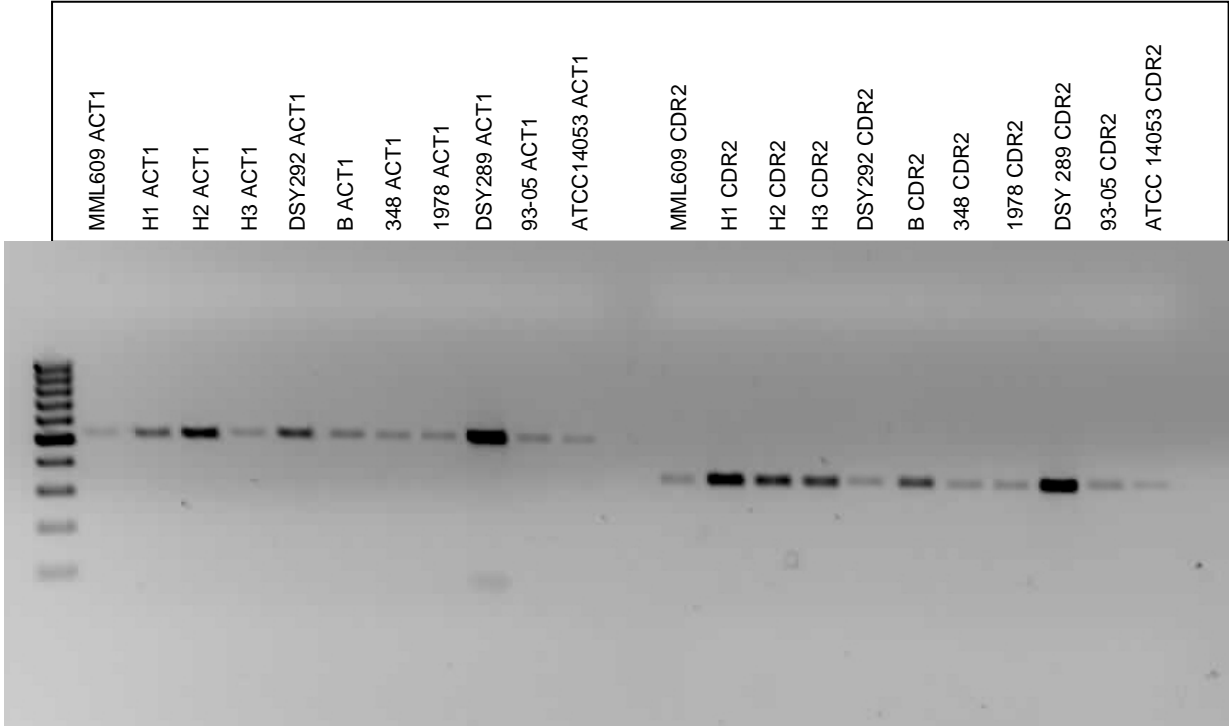


Şekil- 4. Suşların *CDRI* ekspresyonu açısından *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırıldığı grafik

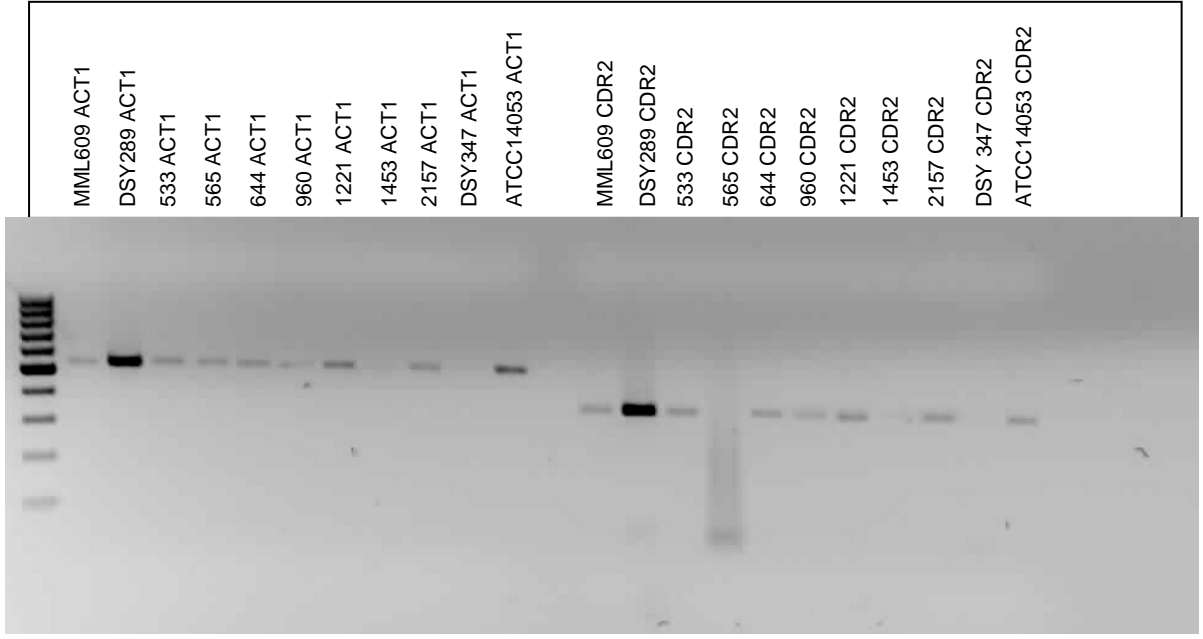
Suşların *CDR1* ekspresyon değerleri incelendiğinde flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarının 3,12–7,16 katı *CDR1* ekspresyonu gösterdiği, Du suşların ise ekspresyon düzeylerinin kontrol suşundan daha duşuk olduğu gorulmuştur (tablo 7, şekil 4). Flukonazole Di/ kısmi inhibisyon gösteren suşların (348, 1978, 93-05) standart suşa göre 0,64-2,06 kat daha fazla *CDR1* eksprese ederek flukonazole Di/ DBD izolatlara göre daha az oranda ekspresyon gösterdiği izlenmiştir.

6.2.CDR2 Ekspresyon Düzeyleri

Çalışılan Di/ DBD/ Du *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR2* genleri için elde edilen jel görüntüleri şekil 5 ve şekil 6' da gösterilmiştir.



şekil- 5. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR2* genleri için saptanan jel goruntusu



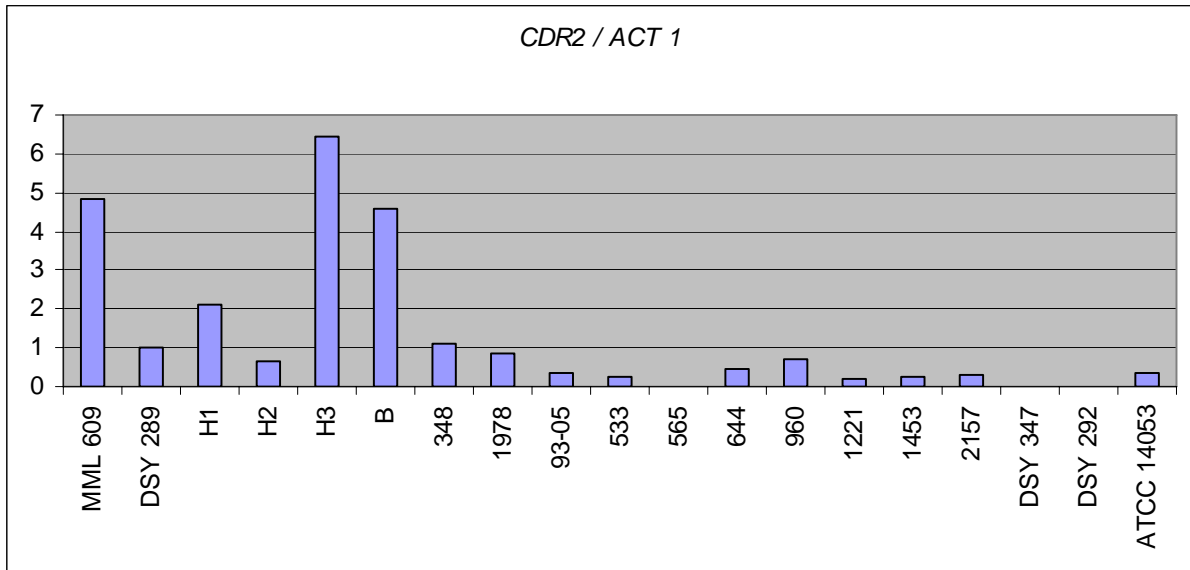
Şekil- 6. Flukonazole Du *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *CDR2* genleri için elde edilen jel görüntüsü

Suşların *CDR2* için jel görüntüleri incelendiğinde, ATCC 14053 *C. albicans* suşunun ve flukonazole Du suşlardan 533, 565, 1221, 1453, 2157 no'luların daha düşük düzeyde, flukonazole Di/ DBD izolatlarından H1, H3 ve B'nin ise daha belirgin düzeyde *CDR2* eksprese ettikleri izlenmiştir (şekil 5,6).

Kantitasyon yapılması sonrasında araştırılan suşların *ACT1* ve *CDR2* genleri için elde edilen sayısal değerleri ile *CDR2 / ACT1* normalizasyon oranları Tablo 8'de grafiği ise şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo-8. Çalışmaya alınan suşların *ACT1*, *CDR2* genleri için belirlenen sayısal değerler ve *ACT1* ile normalizasyon değerleri

Suş No	<i>ACT1</i>	<i>CDR2</i>	<i>CDR2 / ACT1</i>
MML 609	28	136	4,85
DSY 289	556	573	1,03
H1	181	379	2,09
H2	378	249	0,66
H3	33,5	217	6,47
B	45	207	4,6
348	45	51	1,13
1978	45	40	0,88
93-05	42	14	0,33
533	62	14	0,23
565	63	0	0
644	46	21	0,46
960	43	30	0,7
1221	126	23	0,18
1453	56	14	0,25
2157	143	44	0,31
DSY 347	61	0	0
DSY 292	239	5	0,02
ATCC 14053	225	80	0,36

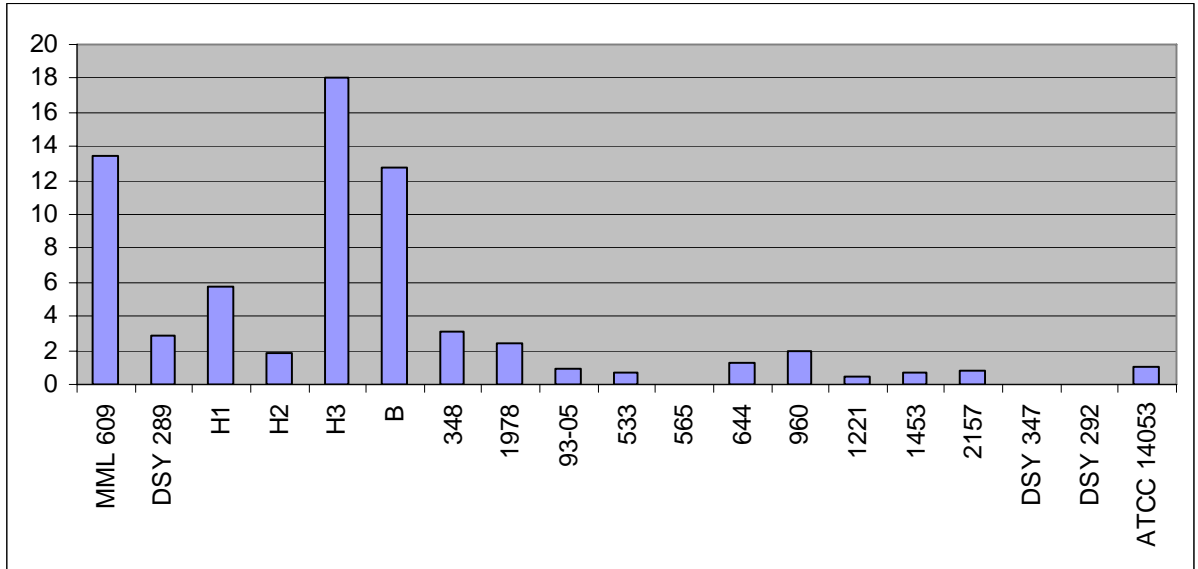


Şekil- 7. *C. albicans* suşlarının *CDR2* ekspresyonu açısından *ACT1* ile normalizasyonu ile elde edilen grafik

Suşların normalize edilmiş *CDR2* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 14053 ile oranlanması sonucu elde edilen değerler tablo 9'da, grafiklendirilmesi de şekil 8'de izlenmektedir.

Tablo-9. Araştırılan suşların *C. albicans* ATCC 14053 ile oranlanması sonucu elde edilen değerler

Suş No	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 Suşuna Göre Gen Ekspresyon Oranı
MML 609	13,5
DSY 289	2,9
H1	5,8
H2	1,83
H3	18
B	12,8
348	3,1
1978	2,4
93-05	0,92
533	0,64
565	0
644	1,3
960	1,94
1221	0,5
1453	0,7
2157	0,86
DSY 347	0
DSY 292	0,05
ATCC 14053	1



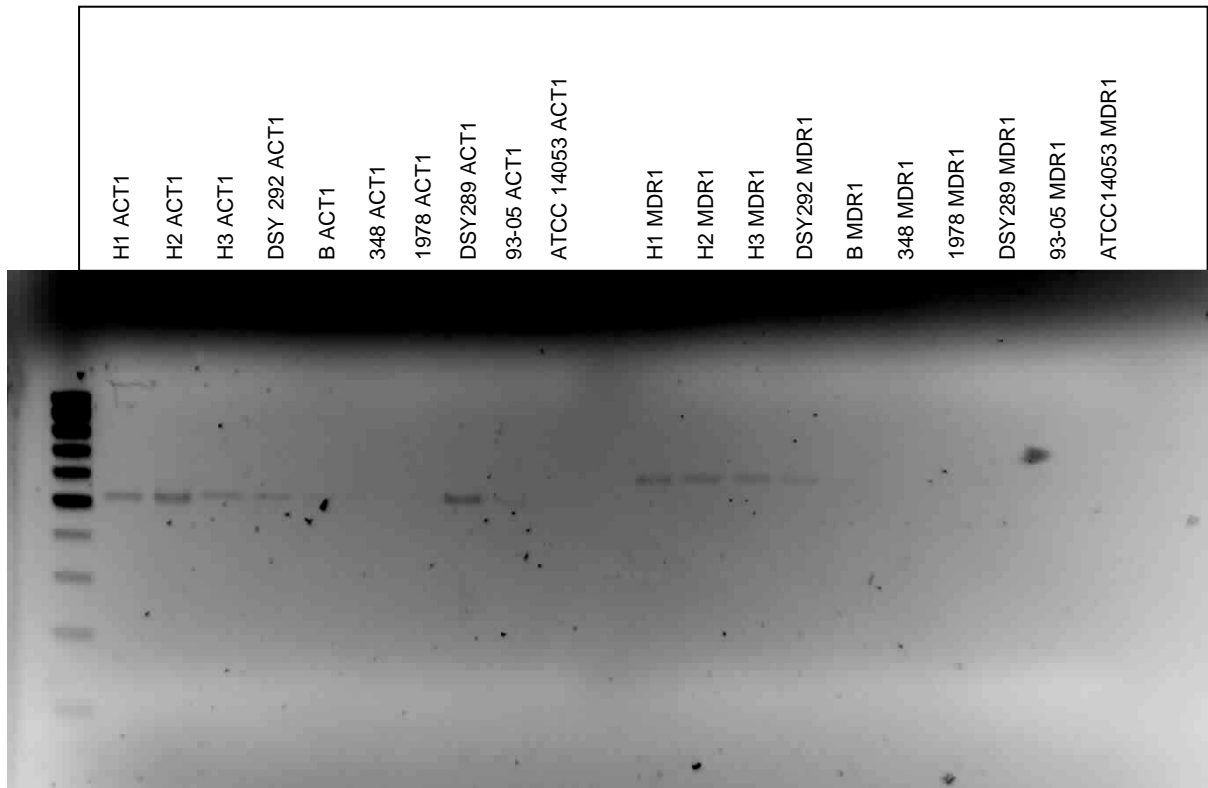
Şekil- 8. Suşların *C. albicans* ATCC 14053 ile oranlanması sonucu elde edilen grafik

CDR2 için elde edilen veriler değerlendirildiğinde, flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarının 1,83–18 katı, Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşların 0,92-3,1 katı, duyarlı suşların ise 0,5–1,94 katı *CDR2*

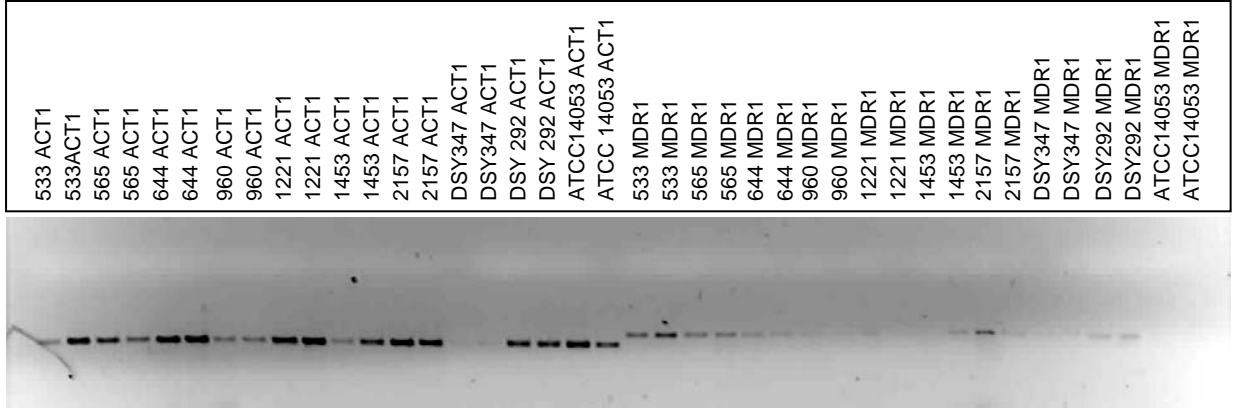
ekspresyonu gösterdiği görülmüştür. Flukonazol Du bir suшта (565) hiç *CDR2* ekspresyonu belirlenmemiştir (tablo 9, şekil 8).

6.3.MDR1 Ekspresyon Düzeyleri

İncelenen *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *MDR1* genlerinin jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüler şekil 9 ve 10' da görülmektedir.



Şekil- 9. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *MDR1* genleri için izlenen jel görüntüsü

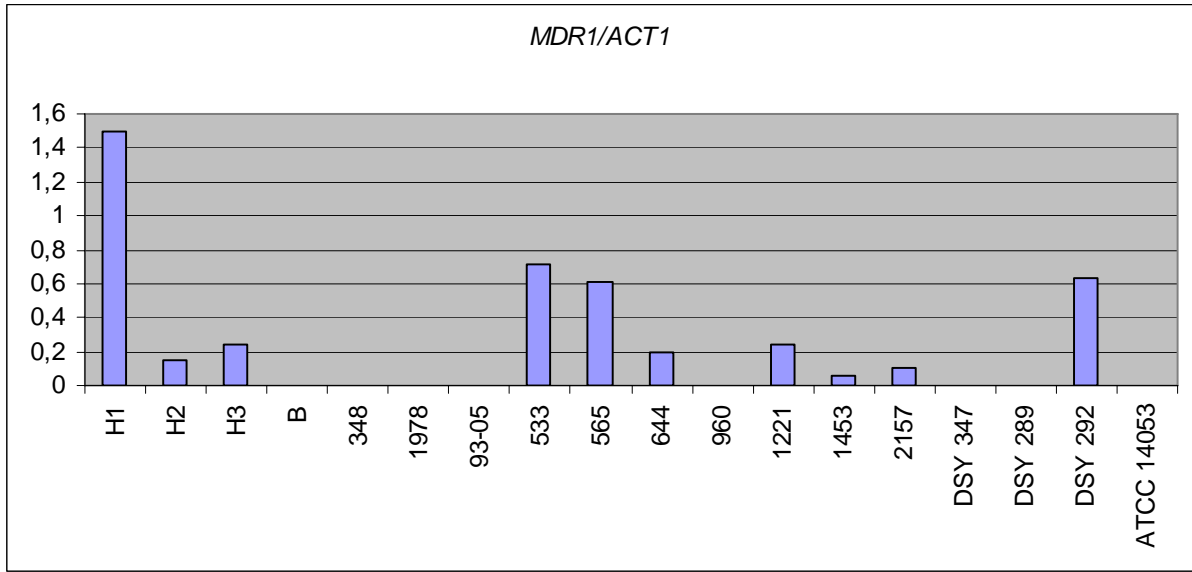


Şekil- 10. Flukonazole Du *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *MDR1* genleri için yapılan iki çalışmanın bir jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntüsü

Çalışmaya alınan suşların yapılan kantitasyonu sonucunda *ACT1* ve *MDR1* genleri için belirlenen sayısal değerleri ile *MDR1* / *ACT1* normalizasyon oranları Tablo 10'da, grafiği ise şekil 11'de gösterilmiştir.

Tablo-10. İncelenen tüm suşların *ACT1*, *MDR1* genleri için belirlenen normalizasyon değerleri

Suş No	<i>ACT1</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR1/ACT1</i>
H1	32,5	52,5	1,5
H2	76	11,5	0,15
H3	8,5	2	0,24
B	9,5	0	0
348	17,5	0	0
1978	19	0	0
93-05	35	0	0
533	131	93	0,71
565	104	63	0,61
644	170	34	0,2
960	58	0	0
1221	148	35	0,24
1453	52	3	0,06
2157	217	21	0,1
DSY 347	53	0	0
DSY 289	75	0	0
DSY 292	60,8	38,3	0,63
ATCC 14053	116,8	0	0



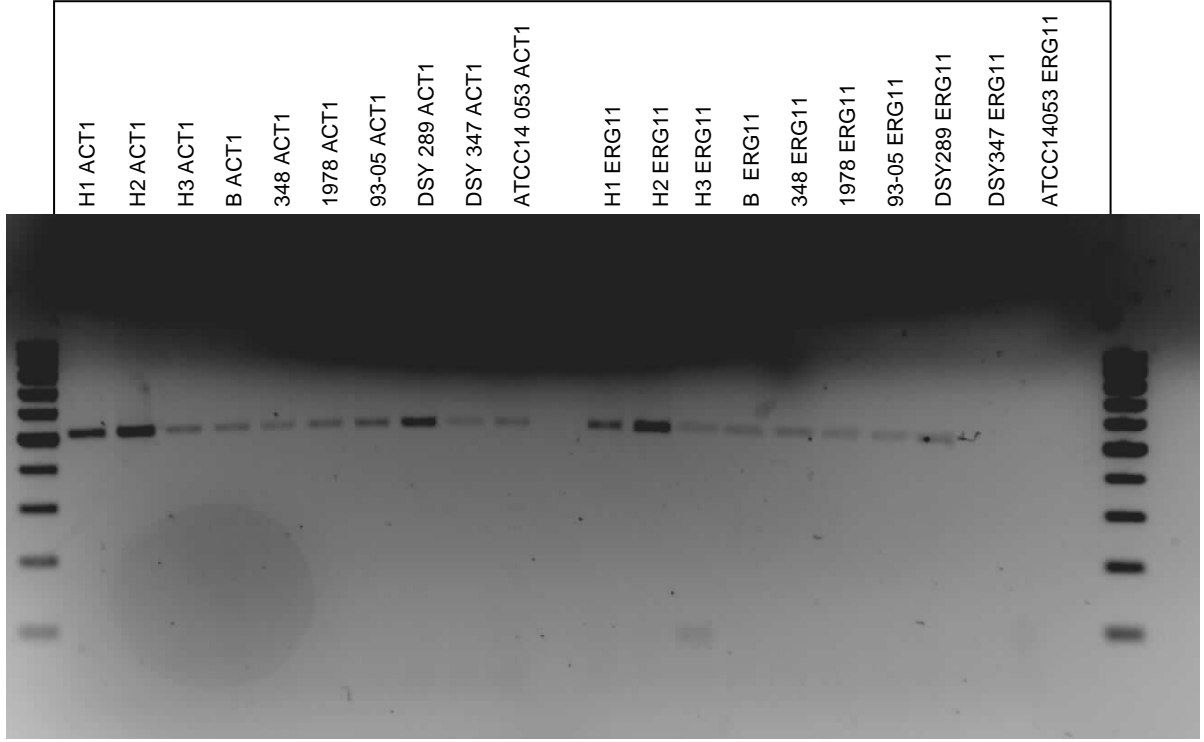
Şekil-11. İncelenen suşların *MDR1* ekspresyonu açısından *ACT1* ile normalizasyon sonrasında oluşturulan grafiği.

MDR1 için belirlenen görüntüler ve değerlere göre flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşu ile flukonazole Di/ DBD suşlardan B, Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşlar (348, 1978, 93-05) ve flukonazole Du'lardan 960 ve 1453 no'luların *MDR1* eksprese etmediği, Di/ DBD suşlardan H1'de belirgin olmak üzere H2 ve H3'de daha düşük oranlarda, Du suşlardan ise 533 ve 565'de düşük; 644,1221, 1453 ve 2157'de ise çok düşük oranlarda *MDR1* eksprese edildiği belirlenmiştir.

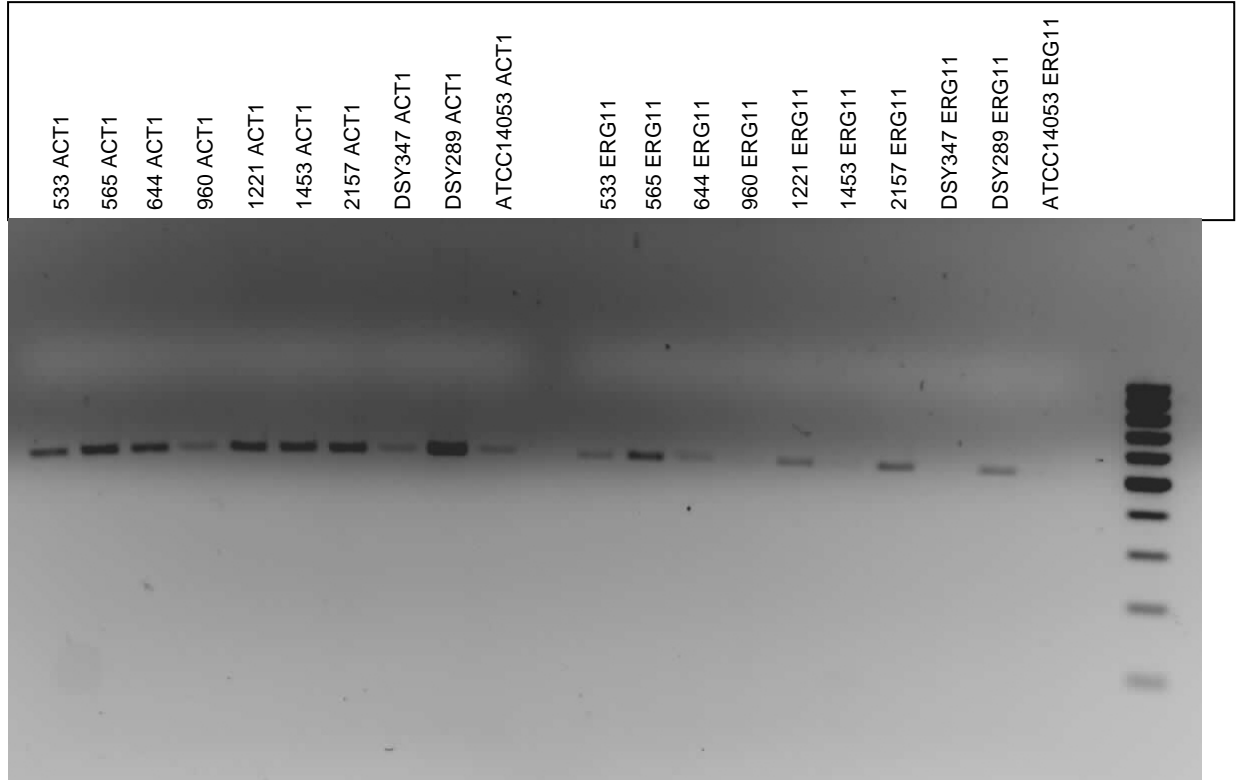
Suşların *MDR1* ekspresyon düzeylerinin ATCC kontrol suşu ile oranlanması, bu suşun *ACT1* geni ile normalizasyon sonucunun sıfır olması yani *MDR1* ekspresyonunun olmaması nedeniyle mümkün olamamıştır.

6.4.ERG11 Ekspresyon Düzeyleri

Araştırmamıza dahil edilen tüm *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *ERG11* gen ürünlerinin jel görüntüleri şekil 12 ve şekil 13' de görülmektedir.



Şekil- 12. Flukonazole Di/ DBD/ Kısmi inhibisyon gösteren *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *ERG11* genleri için belirlenen jel görüntüsü

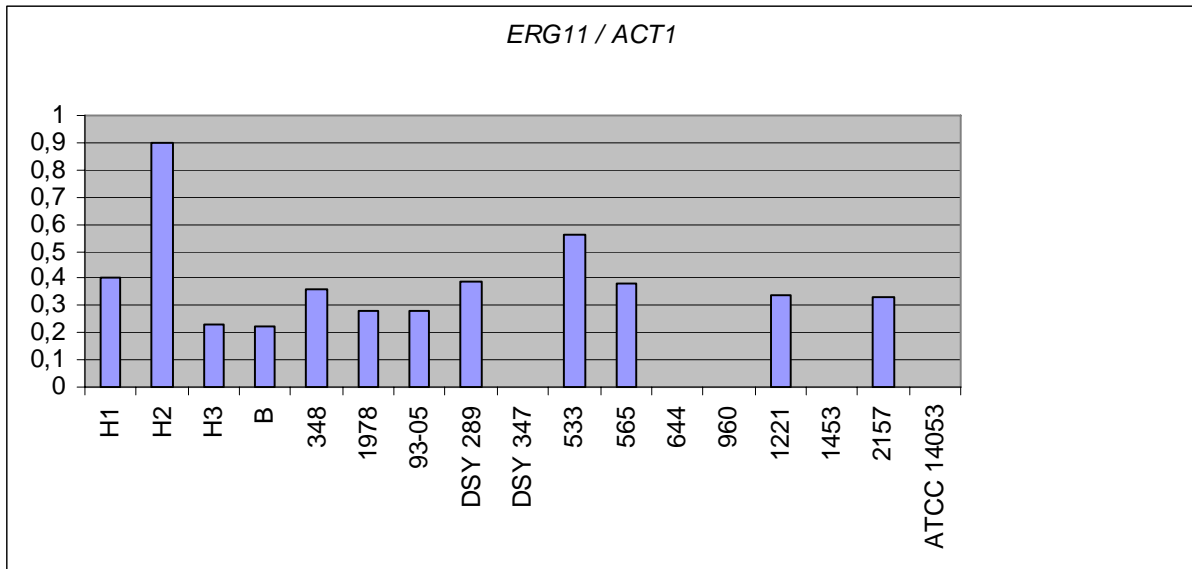


Şekil- 13. Flukonazole Du *C. albicans* suşlarının *ACT1* ve *ERG11* genleri için izlenen jel görüntüsü

Çalışmaya alınan suşların *ACT1* ve *ERG11* genleri için kantitasyonlarının yapılması sonucunda saptanan sayısal değerler ile *ERG11 / ACT1* normalizasyon oranları Tablo 11’de, grafiği ise şekil 14’de gösterilmiştir.

Tablo-11. Çalışmaya alınan tüm suşların *ACT1*, *ERG11* genleri için belirlenen sayısal değerler ve *ACT1* ile normalizasyon değerleri

Suş No	<i>ACT 1</i>	<i>ERG 11</i>	<i>ERG11 /ACT1</i>
H1	336	135	0,4
H2	385	347	0,9
H3	268	61	0,23
B	310	69	0,22
348	148	54	0,36
1978	138	38	0,28
93-05	171	48	0,28
DSY 289	248	196	0,39
DSY 347	165	0	0
533	72	128	0,56
565	170	65	0,38
644	37	0	0
960	34	0	0
1221	155	53	0,34
1453	16	0	0
2157	158	52	0,33
ATCC 14053	102	0	0



Şekil- 14. Tüm suşların *ERG11* ekspresyonu açısından *ACT1* ile normalizasyon yapılmış grafiği

ERG11 için elde edilen jel görüntüleri ve normalizasyon sonrası değerler incelendiğinde flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşu ve flukonazole Du 644, 960 ve 1453 no'lu suşların hiç *ERG11* eksprese etmediği, Di/DBD ve Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşlarla flukonazol Du izolatlarından dördünün farklı düzeylerde eksprese ettiği belirlenmiştir (şekil12-13).

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarının *ERG11* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 14053 ile karşılaştırılıp oranlanması, standart suşun *ACT1* geni ile normalizasyon sonucunun sıfır olması nedeniyle yapılamamıştır.

Araştırma verilerimize göre flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarında standart suşa ve duyarlılara göre *CDR1* ve *CDR2* genlerinin fazla eksprese edildiği, *MDR1* geninin ise bir suşta çok fazla olmak üzere üç suşta yüksek oranda eksprese edildiği; Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşlarda *CDR1* ve *CDR2* genlerinin düşük oranlarda eksprese edilirken *MDR1*'in hiç eksprese edilmediği izlenmiştir. Lanosterol demetilazı kodlayan *ERG11* geninin ise tüm suş gruplarında benzer şekilde düşük oranlarda eksprese edildiği saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda çalışmamıza aldığımız Di/DBD *C. albicans* suşlarının flukonazol direncinde öncelikle *CDR1* ve *CDR2* olmak üzere atılım pompa genlerinin fazla ekspresyonlarının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanında kısmi inhibisyon gösteren suşlarda ise *CDR1* ve *CDR2* genlerinin düşük düzeyde ekspresyonlarının bu etkide yeri olabileceği düşünülebilir.

7. TARTIŞMA

Son yıllarda fungal infeksiyonların ve buna paralel olarak antifungal ilaç kullanımının artması sonucunda gözlenen antifungal direnç sorunu, bu ilaçlara direnç mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalara hız kazandırmıştır (8).

Azollere önemli direnç mekanizmalarından olan atılım pompa genlerinin ve *ERG11* geninin fazla ekspresyonu, RNA hibridizasyonu (“Northern Blotting (NB)” gibi), kantitatif RT-PZT, “real time” PZT ile saptanabilmektedir. Bunun yanında “microarray”ler, gen ekspresyonlarının araştırılmasında, ümit verici bir hibrid teknolojisidir. “Microarray” sisteminde, tüm mRNA’dan revers transkripsiyonla elde edilen karışık cDNA probu, araştırılan genleri gösteren, sabitlenmiş ve düzenlenmiş DNA “çip”leri ile hibridize edilir. Saptama floroför işaretli problemlerin lazerle uyarımı ile gerçekleşir (57). Araştırmamızda “real time” PZT gibi özel ekipman gerektirmeyen, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanabilen kantitatif RT-PZT yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmamızın bulgularına baktığımızda; suşların *CDR1* ekspresyon değerleri açısından flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarının 3,12–7,16 katı *CDR1* ekspresyonu gösterdiği, Du suşların ise ekspresyon düzeylerinin kontrol suşundan daha düşük olduğu görülmüştür. Flukonazole Di/ kısmi inhibisyon gösteren suşların (348, 1978, 93-05) standart suşa göre 0,64-2,06 kat daha fazla *CDR1* ekspresyon ederek flukonazole Di/ DBD izolatlarına göre daha az oranda ekspresyon gösterdiği izlenmiştir.

CDR2 için elde edilen veriler açısından, flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarının 1,83–18 katı, Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşların 0,92-3,1 katı duyarlı suşların ise 0,5–1,94 katı *CDR2* ekspresyonu gösterdiği görülmüştür. Flukonazol Du bir suşta (565) hiç *CDR2* ekspresyonu belirlenmemiştir.

MDR1 için belirlenen değerlere göre flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşu ile flukonazole Di/ DBD suşlardan B, Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşlar (348, 1978, 93-05) ve flukonazole Du’lardan 960 ve 1453 no’luların *MDR1* ekspresyon etmediği, Di/ DBD suşlardan H1’de belirgin olmak üzere H2 ve H3’de daha düşük oranlarda, Du suşlardan ise 533 ve 565’de düşük; 644,1221, 1453 ve 2157’de ise çok düşük oranlarda *MDR1* ekspresyon edildiği belirlenmiştir.

Bunun yanında flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 suşu ve flukonazole Du 644, 960 ve 1453 no'lu suşların hiç *ERG11* eksprese etmediği, Di/DBD ve Di/ Kısmi inhibisyon gösteren suşlarla flukonazol Du izolatlarından dördünün farklı düzeylerde bu geni eksprese ettiği belirlenmiştir.

Bu bulgular doğrultusunda çalışmamıza aldığımız Di/DBD *C. albicans* suşlarının flukonazol direncinde öncelikle *CDR1* ve *CDR2* olmak üzere atılım pompa genlerinin fazla ekspresyonlarının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanında kısmi inhibisyon gösteren suşlarda ise *CDR1* ve *CDR2* genlerinin düşük düzeyde ekspresyonlarının bu etkide yeri olabileceği düşünülebilir.

Maebashi ve arkadaşları (81) bir adet Di, iki adet Du, bir adet DBD ve standart suş *C. albicans* ATCC 10231 kullanarak flukonazol direnç mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında RT-PZT ile *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* ve *MDR1* mRNA düzeylerine bakmışlar ve genel *CDR* ekspresyon düzeylerini, duyarlı standart suşa göre flukonazole DBD suşta 3,3 kat, flukonazole Di suşta 4,4 kat, Du suşlarda ise 1,3 ve 2,1 kat fazla belirlemişlerdir.

Aynı çalışmada *CDR1*'in duyarlı bir suş hariç diğer tüm suşlarda, özellikle flukonazole Di ve DBD suşlarda belirgin olmak üzere, ATCC'ye göre önemli ölçüde fazla eksprese edildiği izlenmiştir. *CDR2* için ise suşlar açısından benzer bir sonuç elde edilirken standart olarak kullanılan ATCC 10231'de *CDR2* ekspresyonu izlenmemiştir. *MDR1* için ise standart suş ATCC dahil olmak üzere hiçbir suşta ekspresyon saptanamamıştır.

Bu çalışmada suşların flukonazol MİK değerleri ile *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon olduğu belirlenmiş ve bulgular ışığında *Cdrp* pompalarının direnç gelişiminde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. *ERG11* için ise flukonazol MİK değerleri ile böyle bir uyumdan söz etmek mümkün olamamıştır.

Çalışmamızda *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeyleri flukonazole Di/DBD suşlarda, flukonazole Du suşlara göre belirgin derecede fazla olup, sonuçlarımızın Maebashi ve ark.(81) çalışması ile bu açıdan uyumlu olduğu söylenebilir ancak araştırmamızda flukonazol MİK değerleri ile *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeyleri arasında tam bir korelasyondan bahsetmemiz mümkün değildir.

Lyons ve White (82) azol direnci ile direnç genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi saptamak için *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve *ERG11* mRNA ekspresyonunu NB analizi ile hücre büyüme fazları boyunca araştırmıştır. Çalışmada dirençli suşun, duyarlı olana göre tüm logaritmik fazlarda 2,5 ile 7,6 kat fazla *CDR1* ekspresyonu gösterdiği, *CDR2* ekspresyonunun da erken-logaritmik fazda izlendiği bildirilmiştir. *MDR1* ekspresyon düzeyi ise duyarlı suşta sadece erken-logaritmik fazda çok az belirlenirken, dirençli suşta üremenin

logaritmik fazının tüm aşamalarında oldukça yüksek seviyelerde izlenmiştir. *ERG11* ekspresyon düzeyi ise dirençli suşta duyarlıya göre orta-logaritmik fazda 1,2 ile 2,3 kat arası olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *CDR1*, *MDR1*, *CDR2* ve *ERG11* ekspresyon düzeylerinin dirençli suşlarda duyarlılara göre mantar üremesinin sırasıyla logaritmik fazın tüm aşamalarında, erken ve orta logaritmik fazlarda yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamız ise optik yoğunlukları 600nm’de orta-logaritmik fazda yapılmış olup, elde ettiğimiz veriler bu fazı yansıtmaktadır. Araştırmamızda orta-logaritmik fazda flukonazole Di/DBD suşların *ACT1*’e göre fazla *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* eksprese ettiği belirlenmiş, yine bu fazda *ERG11* ekspresyon düzeyleri çok düşük bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımız Lyons ve White (82)’ın *CDR1* ve *MDR1* için elde ettikleri veriler ile uyumlu olup, *CDR2* ve *ERG11* bulguları ile farklı görülmektedir. Lyons ve White (82)’in çalışmasında az sayıda suşun çalışılması, bizim araştırmamızın tüm logaritmik fazları içermemesi nedeniyle çalışmalar arasındaki bu farklılık tam olarak irdelenememektedir.

White ve arkadaşları (83) flukonazole Di suşlarda NB yöntemi ile atılım pompa genleri ve *ERG11* mRNA düzeylerini araştırdıkları bir başka çalışmada ise ilginç olarak bu genlerin ekspresyon düzeyleri ile direnç gelişimi arasında bir ilişki saptayamamışlardır. Ancak araştırmacılar bunun nedenini farklı suşlar arasındaki allelik varyasyonların veya nokta mutasyonların sonucuna bağlamışlardır.

Flukonazole Di 22 adet *C. albicans* vaginal izolatta direnç mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada ise NB yöntemi ile izolatların tümünde *MDR1* genlerinde aşırı ekspresyon saptanırken, suşların bir kısmında *CDR1*, *CDR2* ve *ERG11* aşırı ekspresyonu belirlenmiştir. Çalışmada üç adet flukonazole Di *C. albicans* suşu, itrakonazole Di bulunduğu halde *CDR1*, *CDR2* genlerinin düzeylerinin düşük olduğu; bir suşun ise itrakonazole Du bulunmasına karşın *CDR1*, *CDR2* genlerinin ekspresyonunun fazla olduğu bildirilmektedir. Bu çalışma sonucunda azollere direnç gelişimi ile ilaç atım pompa genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bağlantı saptanamamış ve araştırmacılar henüz bilinmeyen bir çok mekanizmanın etkili olabileceğini vurgulamıştır (84).

İtrakonazol ve ketokonazol için MİK değeri ≥ 1 µg/ml olduğunda dirençli kabul edilmesi nedeniyle suşlarımızdan flukonazole Di/DBD olanlar itrakonazol ve ketokonazole de dirençli olup, yüksek düzeyde *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonu göstermektedir. Bu durum CDR pompalarının flukonazol dışında itrakonazol ve ketokonazole çapraz dirençten sorumlu olması bilgisi ile paralellik göstermektedir (68).

White (85), 1997 yılında *C. albicans* ile yaptığı bir başka çalışma sonucunda flukonazole Di suşlarda *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonunun arttığını göstermiş olup, yüksek düzey azol direncinin birçok mekanizmanın birlikte çalışmasıyla ortaya çıktığını belirtmiştir. Franz ve arkadaşları (86) *C. albicans* suşlarında birden fazla direnç mekanizmasının basamak tarzı bir direnç gelişimine neden olduğunu saptamıştır.

Perea ve arkadaşları (87) HIV ile infekte orofaringeal kandidozlu hasta izolatları üzerinde yaptığı araştırma sonucunda; 20 adet flukonazole Di/DBD *C. albicans* suşu'nun %85'inde atılım pompalarının fazla salınımını, %65'inde *ERG11* geninde mutasyonların varlığını, %35'inde ise *ERG11* geninin aşırı salınımını direnç mekanizmaları olarak belirlemişlerdir. *C. albicans* direnç mekanizmalarından atılım pompalarının "real-time" PZT, mutasyonların ise dizi analizi uygulanarak araştırıldığı çalışmalarda (68-88) direnç gelişiminde birçok mekanizmanın birlikte etkili olduğu vurgulanmaktadır.

Çalışma verilerimize göre flukonazole Di/DBD suşlardan H2, H3 ve B'de *CDR1* ve *CDR2*'nin fazla ekspresyonu, H1'de ise *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1*'in fazla eksprese edildiği görülmektedir. H1 suşunun flukonazol için MİK değerinin diğer Di/DBD suşlardan daha yüksek olması hem *CDR1* ve *CDR2* hem de *MDR1* geninin fazla ekspresyonuna bağlı olabilir. Bu durumda iki pompa sisteminin fazla eksprese edilmesi MİK değerinin daha da yükselmesine yol açmış olabilir.

Bölümümüzde daha önce aynı suşların *ERG11* mutasyonlarının incelendiği bir çalışmada Di/DBD *C. albicans* suşlarında daha önce literatürde flukonazol direnç gelişiminde rolü olduğu bildirilmiş K143R, G464S, G465S ve V488I mutasyonları saptanmış olup, bu mutasyonlar flukonazol Du ve kısmi inhibisyon gösteren suşlarda izlenmemiştir. Bunun yanında Di/DBD suşlardan ikisinde belirlenip, kısmi inhibisyon gösteren ve Du suşlarda saptanmayan ancak literatürde dirençle ilişkisi bildirilmemiş S412T ve R469K mutasyonları da gözlenmiştir (76). Bu bilgilerle birlikte düşünüldüğünde çalışılan flukonazol Di/DBD *C. albicans* suşlarında dirençten sorumlu mekanizmaların öncelikle *ERG11* mutasyonları ile atılım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu görülmektedir. Bu bulgular da White (85) ile Franz ve ark. (86)'nın çalışmalarına paralel olarak flukonazol direncinde birden fazla mekanizmanın birlikte sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda azollere dirençli *C. albicans* izolatlarında *CDR1* ve *CDR2* ekspresyonunun, CDR'nin transkripsiyonel aktivatörü olan Tac1p ile *MDR1* ekspresyonunun ise Mrr1p ile kontrol edilmekte olduğu ve bunlardaki mutasyonların bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve bunun sonucu olarak *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1*'in aşırı ekspresyonuna yol açtığı bildirilmiştir (89).

Araştırma verilerimize göre çalışmamıza aldığımız Di/DBD *C. albicans* suşlarının flukonazol direncinde öncelikle *CDR1* ve *CDR2* olmak üzere atılım pompa genlerinin fazla ekspresyonlarının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanında kısmi inhibisyon gösteren suşlarda ise *CDR1* ve *CDR2* genlerinin düşük düzeyde ekspresyonlarının bu etkide yeri olabileceği düşünülebilir.

8. SONUC ve ÖNERİLER

Çalışmamıza alınan suşların *CDR1* ve *CDR2*, ekspresyon değerleri açısından flukonazole Du *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşuna göre, flukonazole Di/ DBD *C. albicans* suşlarının sırasıyla 3,12–7,16 ; 1,83-18 katı ekspresyonu gösterdiği, Du suşların ise ekspresyon düzeylerinin kontrol suşundan daha düşük ; 0,5-1,94 katı olduğu bulunmuştur. Flukonazole Di/ kısmi inhibisyon gösteren suşların ise standart suşa göre sırasıyla 0,64-2,06 ; 0,92-3,1 kat daha fazla *CDR1* ve *CDR2* eksprese ederek flukonazole Di/ DBD izolatlarına göre daha az oranda ekspresyon gösterdiği saptanmıştır.

Flukonazole Di/ DBD/ kısmi inhibisyon gösteren suşlardan H1’de belirgin olmak üzere H2 ve H3’de daha düşük oranlarda *MDR1*; bu grup suşun tümünde düşük oranlarda *ERG11* ekspresyonu izlenirken; flukonazol Du izolatların sırasıyla altısında ve dördünde düşük oranlarda bu gen ekspresyonları belirlenmiştir.

Flukonazol Di/ DBD *C. albicans* suşlarında öncelikle *CDR1* ve *CDR2* olmak üzere atılım pompa genlerinin fazla ekspresyonları saptanmış, çalışılan flukonazol Di/ DBD *C. albicans* suşlarında dirençten sorumlu mekanizmanın, öncelikle *ERG11* mutasyonları ve atılım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu sonucuna varılmış, flukonazol direncinde birden fazla mekanizmanın birlikte sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Daha sonraki aşamada ise atılım pompalarını fazla eksprese eden suşlarda transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonların araştırılmasının fazla ekspresyon mekanizmasını aydınlayacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak; çalışmamıza aldığımız Di/DBD *C. albicans* suşlarının flukonazol direncinde öncelikle *CDR1* ve *CDR2* olmak üzere atılım pompa genlerinin fazla ekspresyonlarının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanında kısmi inhibisyon gösteren suşlarda ise *CDR1* ve *CDR2* genlerinin düşük düzeyde ekspresyonlarının bu etkide yeri olabileceği kararına varılmıştır.

9. KAYNAKLAR

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:499-511.
2. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Jpn J Med Mycol 2007;48:1-12.
3. Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. Infect Dis Clin Norh Am 1997;11:411-425.
4. Wenzel RP. Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality. Clin Infect Dis 1995;20:1531-1534.
5. Hazen. KC. New and emerging yeast patogen. Clin Microbiol Rev 1995;8:462- 478.
6. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, et al. SENTRY Participant Group: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol 2001;39:3254- 3259.
7. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, et al. Fungal infection network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends 1991–2000. Clin Infect Dis 2004;38:311- 320.
8. Kamai Y, Maebashi K, Kudoh M, Makimura K, Naka W, Uchida K, Yamaguchi H. Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. Microbiol Immunol 2004; 48:937-943.
9. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bile J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2378-2386.

10. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
11. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359:1135-1144.
12. Sanglard D, Bille J. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. In: Calderone RA, (ed). *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press;2002:349-383.
13. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2124-2131.
14. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone;2000:2656-2674.
15. 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.
16. Hazen KC, Howell SA. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press;2003:1693- 1711.
17. Yuluğ N. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Matbaacılık;2002:1777-1785.
18. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Phaller MA. Mechanisms of Fungal Pathogenesis In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Phaller MA, (eds). *Medical Microbiology*. Fourth Edition. St. Louis: Missouri, Mosby;2002:629- 631.

19. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* Türleri. In:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Matbaacılık;2002:1797-1808.
20. Özkütük A. Yüzeysel kandidozlar. In: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. editörler. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar:111-115, 2002, Eskişehir.
21. Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö. Fungal infeksiyonlar. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi;2006:9-21.
22. Romani L. Immunology of invasive candidiasis. In: Calderone RA (ed). *Candida* and Candidiasis. First Edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press;2002:223- 241.
23. Pabuççuoğlu HU. Mikozlar-Patogenez ve Patoloji. İzmir, Güven&Nobel Tıp Kitabevi;1999:63-75.
24. Calderone RA, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In: Calderone RA, (ed). *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press;2002:67-86.
25. Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL, Trupin SR, Hoyer LL. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. *Infection and Immunity*;2005:1656–1663.
26. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family a sticky pursuit. *Medical Mycology*;2008:1-15.
27. Kuleta JK, Kozik MR, Kozik A Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* . *Acta Biochimica Polonica*;2009:211–224.

- 28.** Yang Y-L. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:223-228.
- 29.** Douglas LJ. *Candida* biofilm and their role in infection. *Trends in Microbiology* 2003;11:30-36.
- 30.** Ramage G, Martinez JP, Ribot JLL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *Fems Yeast Res* 2006;6:979-86.
- 31.** Samaranayake YH, Dassanayake RS , Cheung BPK, Jayatilake JAMS, Yeung KWS, Yau JYY, Samaranayake LP. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS* 2006;114: 857–66.
- 32.** Kadir T , Gumru B, Can BU. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol* 2007;52:691 – 696.
- 33.** Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005;48:365- 377.
- 34.** Arıkan S. Mantarlarda Pleomorfizm. In: Yeğenoğlu Y, Erturan Z. Editörler. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar: 77- 86, 2003, Bodrum.
- 35.** Vargas K, Messer SA, Pfaller MA . Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 2000;38:3593-3607.
- 36.** Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. . Relationship between Switching and Mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2003;2:390–397.
- 37.** Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *C. albicans* in vivo. *Infect Immun* 1995;63:1373-1379.

- 38.** Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron Acquisition from Transferrin by *Candida albicans* Depends on the Reductive Pathway. *Infect Immun* 2005;73:5482- 5492.
- 39.** Al Anazi AR. Gastrointestinal opportunistic infections in human immunodeficiency virus disease. *The Saudi Journal of Gastroenterology* 2009;15:95-9.
- 40.** Yakoob J, Jafri W, Abid S, Jafri N, Islam M, Hamid S, Shah HA, Hussainy AS. *Candida* esophagitis: Risk factors in non-HIV population in Pakistan. *World J Gastroenterol* 2003;9:2328-2331.
- 41.** Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, (ed). *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2002:327-340.
- 42.** Tümbay E. *Candida* türleri. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editörler. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Öncü Basımevi-Güneş Kitabevi;1999:1081-1086.
- 43.** Hilmioğlu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı. In: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. editörler. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar:125-131, 2002, Eskişehir.
- 44.** Richardson MD, Carlson P. Culture and Non-culture Based Diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA, (ed). *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press;2002:387-394.
- 45.** LaRocco MT. Reagents, Stains, and Media: Mycolgy. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition Washington DC, American Society for Microbiology Press;2003:1686-1692.
- 46.** Larone DH. Primary isolation. *Medically Important Fungi A guide to identification*. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press;2002:214.

47. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition. Philadelphia. Lippincott Co; 2006:1151-1237.
48. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh edition. St. Louis, Mosby Inc;2002:711-797.
49. Larone DH. Yeast and Yeast Like Organisms. Medically Important Fungi A Guide to Identification. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2002:109-143.
50. Ellepola A NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005;43:65-84.
51. Ener B. Fırsatçı mikozların tanısında yeni gelişmeler. 32. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı:9-12, 12-16 Eylül 2006, Antalya.
52. Kalkancı A. Mikozların serolojik tanısında yenilikler. In: Tuncer İ, Fındık D, Arslan U. editörler. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar:21-32, 3-6 Mayıs 2005, Konya.
53. Morrison CJ, Hurst SF, Reis E. Competitive binding inhibition enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Diagn Lab Immunol 2003;10:835-848.
54. Shea Y R. Algorithms for Detection and Identification of Fungi.: Mycolgy. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, (eds). Manual of Clinical Microbiology. Eighth.edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003:1745-1762.
55. Çerikçioğlu N. Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. In: Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Öncü Basımevi;1999:1145-1153.

- 56.** Saraçlı MA. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler ve Genetik Tanı Yöntemleri. In: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. editörler. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar:133-144, 21-22 Haziran 2002, Eskişehir.
- 57.** Chemaly RF, Procop GW, Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. editörler. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık;2006:551-559.
- 58.** Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. In: Temizkan G, Arda N. editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi; 2004:101-121.
- 59.** McGinnis MR, Nunn GB, Sarıbaş Z, Arıkan S. Mantarların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. editörler. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Ankara, Palme Yayıncılık;2006:561-568.
- 60.** White TC. Mechanisms of Resistance to Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press;2003:1869-1879.
- 61.** Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press;2003:1859-1868.
- 62.** Usluer G. Antifungal ilaçlar. In: Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö editörler. Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006:147-157.
- 63.** Yücesoy M. *Candida* Türlerinde Antifungal Direnç Mekanizmaları. In: Tuncer İ, Fındık D, Arslan U. editörler. 4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi:46-58, 3-6 Mayıs 2005, Konya.
- 64.** Loeffler J, Stevens DA. Antifungal Drug Resistance. *Clin Infect Dis* 2003;36:31-41.

65. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999;12:40-79.
66. Gupta AK, Tomas E. New Antifungal Agents. Dermatol Clin 2003;21:565–576.
67. Kalkancı A. Yeni Antifungaller ve Direnç Mekanizmaları. In: Yeğenoğlu Y, Erturan Z. editörler. 3. Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar:182-190, 27-30 Mayıs 2003 Bodrum.
68. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 1997;143:405-16.
69. Lupetti A, Danesi R. Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends Mol Med 2002;8:76-81.
70. Sanglard D, Odds F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002;2:73-85.
71. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition. CLSI document M27-A2 (Vol 22 No:15), NCCLS Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 2002.
72. Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. (eds). Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press;2003:1880-1894.
73. Pfaller MA, Messer SA, Karlson A, Bolmstrom A. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. Journal of Clinical Microbiology 1998;36:2586–2589.

74. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the Etest method using Mueller-Hinton Agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:4977–4979.
75. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff AV, Ghannoum MA, Gosey L, Odds F, Rinaldi M, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:643-658.
76. Manastır L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in *ERG11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* 2010 (Yayına kabul edildi)
77. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase lightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* 2004;42:2085-2093.
78. Looi CY, D’Silva EC, Seow HF, Rosli R, Ng KP, Chong PP. Increased expression and hotspot mutations of the multidrug efflux transporter, *CDR1* in azole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginitis patients. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 249:283-289.
79. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2693-2700.
80. Lamb DC, Kelly DE, White TC, Kelly SL. The R467K aminoacid substitution in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:63-7.
81. Maebashi K, Nimi M, Kudoh M, Fischer FJ, Makimura K, Niimi K, Piper RJ, Uchida K, Arisawa M, Cannon RD, Yamaguchi H. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:527–536.

- 82.** Lyons CN, White TC. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2296-2303.
- 83.** White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1704-1713.
- 84.** Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:403-408.
- 85.** White TC. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997;41:1482–1487.
- 86.** Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhauser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3065-72.
- 87.** Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McATEE RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. Prevalance of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level flukonazole resistance isolated from Human Immunodeficiency Virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2676-2684.
- 88.** Goldman GH, Ferreira ME, Marques ER, Savoldi N, Perlin D, Park S, Martinez PCG, Goldman MH, Colimbo A. Evaluation of flukonazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50:25-32.
- 89.** Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research* 2009;9:1029-50.