



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FULUKONAZOLE DİRENÇLİ VE DOZA BAĞIMLI DUYARLI
KANDİDA İZOLATLARINDA OLASI DIŞA ATIM POMPALARININ
FENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

MELTEM KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilgün Çerikçioğlu

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Sahibi : Meltem KAYA
Tez Başlığı : Flukonazole Dirençli ve Doza Bağımlı Duyarlı Kandida İzolatlarında Olası Dışa Atım Pompalarının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması
Sınav Yeri : Tıbbi Mikrobiyoloji
Sınav Tarihi : 20.08.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)
Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU

Kurumu
M.Ü.Tıp Fak.

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. M.Ufuk HASDEMİR

M.Ü. Tıp Fak.

Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ

Acıbadem Üniv. Tıp Fak.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03/09/2014 tarih ve 24 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

04.07.2014

Meltem KAYA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri engin bilgi, görüş ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan, manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU' na,

Eğitimim süresince başta bilimsel fikir ve düşünceleri olmak üzere her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Güner SÖYLETİR' e, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR' e, Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN' a, Prof. Dr. Nurver ÜLGER' e, Doç. Dr. Arzu İLKİ' ye ve Öğr. Gör. Dr. Burak AKSU' ya,

Tez çalışmam boyunca desteklerini ve güler yüzlerini esirgemeyen Dr. Gülşen ALTINKANAT GELMEZ ve Bio. Naziye GÜL' e,

Hastanemizin tüm çalışanlarına ve asistan arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimine beraber baş koyduğum, birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum sevgili dostlarım Sevim ÖZSOY ve Ramazan AYAŞ' a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, beni daima cesaretlendiren sevgili aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	iv
ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ	v
ÖZET.....	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe.....	5
2.2. Sınıflandırma.....	5
2.3. Candida Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	6
2.4. Hücre Yapısı.....	6
2.5. Tür Tanısı	7
2.6. Antifungal İlaçlar	7
2.6.1. Floropirimidinler	8
2.6.1.1. Flusitozin.....	8
2.6.2. Poliyenler	8
2.6.3. Ekinokandinler	9
2.6.4. Azoller.....	9
2.7. Antifungallere Direnç:	10
2.7.1. <i>Candida</i> ve Azol Direnci	11
2.7.1.1. İlacın hedefi olan lanosterol 14 α -demetilazda değişiklikler	12
2.7.1.2. Ergosterol biyosentez yolağında değişiklik	12
2.7.1.3. İlacın hücre içi birikiminde azalma.....	13
2.8. Pompa İnhibitörü Maddeler ve Özellikleri	15
2.9. Antifungal Duyarlılık Testleri.....	16
2.9.1. Dilüsyon Temeline Dayalı Testler	17
2.9.1.1. Makrodilüsyon Yöntemi	17
2.9.1.2. Mikrodilüsyon Yöntemi	17
2.9.1.3. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemi	19
2.9.2. Difüzyon Temeline Dayalı Testler	19
2.9.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	19
2.9.2.2. E-test yöntemi	19

2.9.3.Diğer Yöntemler.....	20
2.9.3.1.Flow (Akım) sitometrik yöntem	20
2.9.3.2.Ergosterol kantitasyonu.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1.Gereçler	21
3.1.1.Çalışmaya alınan klinik <i>Candida</i> izolatları:.....	21
3.1.2. Referans Kökenler.....	21
3.1.3. Pompa inhibitörü maddeler:	22
3.1.4. Besiyerleri	23
3.1.5. Kimyasal Maddeler ve Antifungal İlaçlar	23
3.1.6. Filtreler:.....	23
3.1.7. Araçlar ve Aygıtlar:.....	23
3.2.Yöntemler.....	24
3.2.1.Sıvı Mikrodilüsyon	24
3.2.2.Agar Disk Difüzyon Yöntemi	27
4.BULGULAR	28
4.1. Referans ve Klinik Kökenlerin Pompa İnhibitörü Varlığında FCZ MİK Sonuçları	28
4.2. Referans ve Klinik Kökenlerde Pompa İnhibitörü Varlığında Agar Disk Difüzyon Sonuçları	30
4.3. Klinik İzolatların 3 Azol için Sıvı Mikrodilüsyon ile Duyarlılık Sonuçları	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
6. KAYNAKLAR	44
EKLER	49
EK-1.ETİK KURUL ONAYI	49
Ek 2. ÖZGEÇMİŞ	50

KISALTMA VE SİMGELER

- ABC: ATP Bağlayan Kaset
- Amf-B: Amfoterisin B
- DBD: Doza Bağımlı Duyarlı
- Di: Dirençli
- Du: Duyarlı
- CA: *C.albicans*
- CDR: *Candida* Drug Resistance
- CG: *C.glabrata*
- CK: *C.krusei*
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FCZ: Flukonazol
- FDA: Food Drug Administration
- İTRA: İtrakonazol
- MDR: Multidrug resistance
- MFs: Major- facilitator süper ailesi
- MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
- POS: Posakonazol
- PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- SDA: Sabouraud Dekstroz Agar
- TET: Tetrandrine
- VOR: Vorikonazol

ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ

i. Şekillerin Listesi

Şekil 1:İkinci basamak işlemlerin şematik olarak gösterilmesi 26

ii. Resimlerin Listesi

Resim 1:SDA besiyerinde Candida koloni morfolojisi..... 6

Resim 2:MİK değişiminin mikropalak görüntüsü 29

Resim 3:Agar disk difüzyon deney sonuçları petri görüntüleri 31

iii. Tabloların Listesi

Tablo 1.Tedavide kullanılan temel antifungal ilaçların hedefi, etki ve direnç mekanizmaları. 11

Tablo 2: M27-A3-S3' e göre sınır değerler 18

Tablo 3: Referans kökenlerin FCZ MİK değerleri üzerine pompa inhibitörü maddelerin etkileri 28

Tablo 4: Klinik izolatların FCZ MİK değerleri üzerine pompa inhibitörü maddelerin etkileri 29

Tablo 5. İnhibitör madde varlığında referans kökenlerin agar disk difüzyon sonuçları 30

Tablo 6: İnhibitör madde varlığında klinik izolatların agar disk difüzyon sonuçları 30

Tablo 7: İki fenotipik yöntemle tüm kökenlere ait elde edilen sonuçlar..... 32

Tablo 8: Klinik izolatlarda VOR ve ITRA MİK sonuçları 33

ÖZET

Flukonazole Dirençli ve Doza Bağımlı Duyarlı Kandida İzolatlarında Olası Dışa Atım Pompalarının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması

Meltem KAYA, Nilgün ÇERİKÇİOĞLU, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Amaç

Flukonazole (FCZ) dirençli ve doza bağımlı duyarlı kandida izolatlarında, pompa inhibitörleri kullanılarak olası atım pompalarının varlığını iki fenotipik yöntemle araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Sekiz referans köken ve FCZ'ye dirençli ve doza bağımlı duyarlı olan *Candida albicans*, *C.glabrata* ve *C.krusei* türlerinden 11 klinik izolat kullanılmıştır. Pompa inhibitörleri olarak; ibuprofen, clorgyline ve tetrandrine seçilmiştir. Bunların sabit subinhibitör konsantrasyonlarının varlığında, kökenlerin FCZ MİK değerleri mikrodilüsyon metoduyla çalışılmış ve orijinal FCZ MİK değerlerinde duyarlılık düzeyinde değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Disk difüzyon metodunda, her köken, FCZ için kendine ait supra-MİK konsantrasyonunu içeren agara ekilmiş ve inhibitörleri içeren diskler besiyerine yerleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası disk çevresinde inhibisyon zonu oluşumları değerlendirilmiştir.

Bulgular

İbuprofen ve clorgyline mikrodilüsyon yönteminde FCZ dirençli iki klinik *C.albicans* izolatında MİK değerinde duyarlılık düzeyinde düşüş oluşturmuştur, tetrandrine ise 1 *C.albicans* kökeninde bu değişime yol açmıştır. FCZ dirençli 4 *C.glabrata* kökeninin üçü clorgyline varlığında duyarlı hale dönüşmüştür. İbuprofen ve tetrandrine ise hiçbir klinik *C.glabrata* kökeninde anlamlı MİK düşüşüne yol açmamıştır. *C.krusei* izolatlarımızda üç pompa inhibitörünün hiçbiri FCZ MİK değerinde değişiklik oluşturmamıştır. Sadece clorgyline iki yöntem arasında uyumlu sonuç vermiştir.

Sonuç

En uygun inhibitörün clorgyline ve en uygun yöntemin mikrodilüsyon olduğu sonucuna varılmıştır. Rutin laboratuvarlarda uygulanmak üzere öneride bulunabilmek için sonuçlarımızın moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Candida*, direnç, atım pompa inhibitörleri

SUMMARY

Investigation of Putative Efflux Pumps in Fluconazole Resistant and Dose Dependent Susceptible *Candida* Isolates by Phenotypic Methods.

Meltem KAYA, Nilgün ÇERİKÇİOĞLU Department of Medical Microbiology

Aim

Investigation of efflux pumps in candida isolates with high MIC to fluconazole by two phenotypic methods.

Material and Methods

Eight reference and 11 FCZ resistant and dose dependent susceptible *Candida albicans*, *C.glabrata* and *C.krusei* clinical strains were used.

Ibuprofen, clorgyline and tetrandrine were chosen as pump inhibitors. In the presence of them, MIC values of the strains were studied by microdilution method and any change in original FCZ MIC values at susceptibility level was investigated.

In disk diffusion method, each strain was inoculated onto agar, including FCZ supra-MIC values for themselves and inhibitor impregnated disks were put on the media. After incubation, formation of inhibition zone around the disk was evaluated.

Results

In microdilution method ibuprofen and clorgyline caused decline in MIC values of two FCZ resistant clinical *C.albicans* isolates at susceptibility level, tetrandrine induced this change in 1 *C.albicans* strain. Three of 4 FCZ resistant *C.glabrata* strains changed into susceptible form in the presence of clorgyline but not in the presence of other inhibitors. None of the three pump inhibitors caused any change in FCZ MIC values in *C.krusei* isolates. Only clorgyline exhibited concordance between the two methods.

Conclusion

The most suitable inhibitor and method were found to be clorgyline and microdilution, respectively. To offer for routine practise, results should be confirmed by molecular methods.

Key Words: *Candida*, resistance, efflux pump inhibitors

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda mortalitesi %38'lerde olan *Candida* enfeksiyonları, invazif mikoz etkenleri sıralamasında %80 oranla halen ilk sıradaki yerini korumaktadır. Tüm nozokomiyal kandidozların %50-60'ında birincil etken olarak *C.albicans* izole edilmektedir. *C.albicans* en sık izole edilen tür olmakla beraber; son yıllarda *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* gibi diğer türlerde de artış dikkat çekmektedir (20, 34, 37).

Antifungal ilaç çeşitlerinin az sayıda olması tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır. Azoller düşük yan etki ve uygun kullanımı nedeni ile mantar enfeksiyonlarının tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır. FCZ, geniş etki spektrumlu olması ve toksisitesinin az olmasından dolayı yaygın kullanım alanına sahip bir antifungal ajandır. FCZ' nin yaygın kullanımına bağlı olarak doğal dirençli *C.krusei* ve primer ya da sekonder dirençli *C.glabrata*'ya bağlı enfeksiyon oranlarında artış gözlenmektedir. Ancak diğer türlerde de düşük sıklıkta da olsa bu ilaca karşı MİK değerlerinde yükselme ya da direnç bildirilmektedir (42, 46).

Candida türlerinde FCZ'ye karşı farklı direnç mekanizmaları bildirilmiştir. Bunlardan biri hücre membranında yer alan özgül ilaç pompalarının fazla ekspresyonudur.

C.albicans ve *C.glabrata* kökenlerinde başta FCZ'e ve bazılarında vorikonazol (VOR) ve itrakonazol (İTRA)' ya karşı çapraz dirençde bu pompaların aktif olarak rol aldığı çeşitli moleküler çalışmalarla gösterilmiştir (13, 21, 35). Bu pompaların inhibitörlerinin geliştirilip; sinerjistik etki ile dirençli maya hücrelerinin tekrar duyarlı hale getirilmesi son yıllarda kandidalarda antifungal ilaç direnci ile mücadelede önemli bir yaklaşım olarak öngörülmektedir. Spesifik bir pompa inhibitörü, hücrenin normal üremesini inhibe etmez ancak substratı olan antifungalin Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun altındaki (sub-MİK) seviyelerinde maya hücrelerini o ilaca karşı duyarlı hale getirir (12).

Uygun pompa inhibitörlerinin seçimi amacıyla agar difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon deneyleri başvurulan yöntemlerdendir. Flukonazolün belirteç azol olarak kullanıldığı bu uygulamalarda tacrolimus (FK506), ibuprofen gibi bazı spesifik pompa inhibitörlerinin seçildiği bildirilmiştir (12).

Klinik izolatlarda, bu pompaların varlığının gösterilebilmesi doku ve organ transplantasyonu gibi büyük ve riskli operasyonların gerçekleştirildiği hastanelerde, olası direnç durumunun önceden belirlenmesi açısından da önem taşıyacaktır. Dahası bu taramalar sayesinde belirlenecek toksik olmayan pompa inhibitörlerinin de antifungal ilaçlarla kombine tedavi seçeneği olarak belirlenmesi mümkün olacaktır.

Literatürde bu amaca dayalı çalışmaların çoğu PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi moleküler yöntemlerle yapılmış olup genellikle bakterilerdeki pompaların varlığı ve bunların inhibitörleri ile ilişkilidir. Mantar çalışmaları henüz sınırlı sayıdadır.

Bu tez çalışmasının amacı; FCZ ile ibuprofen ve yeni pompa inhibitörleri olarak bildirilen tetrandrine (TET) ve clorgyline arasındaki sinerjistik etkileşime dayanarak, hastanemizde etken olarak izole edilmiş olan ve bazıları çoklu azol direncine sahip kandida izolatlarında olası dışa atım pompalarına bağlı direnci, ‘agar difüzyon’ ve ‘sıvı mikrodilüsyon’ yöntemleri ile araştırarak, rutinde uygulanabilecek en uygun tarama yöntemini önererek literatüre katkı sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Kandidalarla ilgili çalışmaların, ilk olarak M.Ö. dördüncü yüzyılda Hippocrates' in ağızdaki pamukçuğu tanımlaması ile başladığı kabul edilmektedir. 1771'de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invazif olarak yerleşebildiğini bildirmiştir (36).

1847'de Robin tarafından mantarın *Oidium albicans* olarak sınıflanması ile albicans ismi ilk kez kullanılmıştır. Bugüne kadar *Candida* türleri için birçok isim önerilmiştir. Fakat kullanılan bütün isimler 1954 yılında Paris'te yapılan 8th Botanical Congress' de onaylanan '*Candida*' altında birleştirilerek kabul edilmiştir (36).

1940'lı yıllardan itibaren, özellikle immünsüprese hastalarda antimikrobiyallerin artan kullanımına paralel olarak *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığı da artmıştır. Bu durum araştırmacıları *Candida* türlerini belirlemeye ve özelliklerini incelemeye yöneltmiştir. Böylece *Candida* cinsi mayaların patojenite mekanizmalarını ve uygun antimikotik ilaçları araştıran çalışmalar hız kazanmıştır (4).

2.2. Sınıflandırma

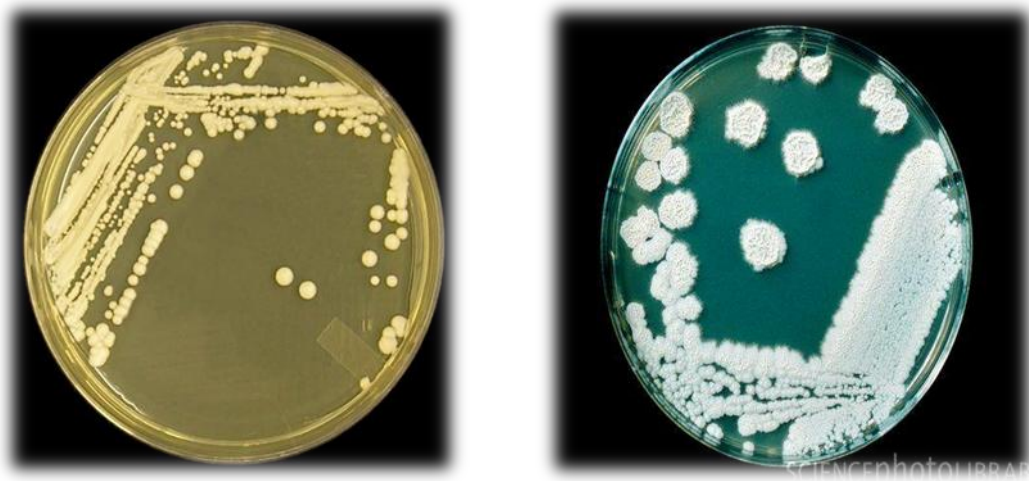
Candida cinsi, mantarlar aleminin Deuteromycota şubesinde, Blastomycetes sınıfında, Cryptococcales takımında, Cryptococcaceae ailesinde yer almaktadır (19).

Kandidaların günümüzde yaklaşık 200 civarında türü tanımlanmıştır. Bunlardan *Candida albicans*, enfeksiyonlardan en sık izole edilen tür olmakla birlikte *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.kefyr* enfeksiyonlara yol açan diğer önemli türlerdir. *Candida lusitaniae*, *C.lipolytica*, *C.norvagensis*, *C.famata* gibi diğer türler de etken olarak daha nadir izole edilmektedir (15, 41).

2.3. Candida Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Candida cinsi 2,0- 7,0 x 3,0- 8,5 µm boyutunda, tek hücreli tomurcuklanarak (blastosporla) çoğalan, yalancı / gerçek hifler oluşturabilen maya morfolojisinde ve gram pozitif boyanan mantarlardır. *Candida* türleri arasında sadece *C.albicans*, *C.dubliniensis* ve nadir olarak da *C.tropicalis* gerçek hif oluşturur. Yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidaların bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli morfolojik özelliklerdir (40).

Bu türler katı besiyerlerinde, oda ısısında veya 37°C' de 24 saat içinde genellikle kirlili beyaz veya krem rengi, nemli ya da kuru, düzgün veya buruşuk yüzeyli, mat ya da parlak, maya kokulu koloniler oluşturur (Resim 1) (40).



Resim 1. *Candida albicans* (solda) *Candida krusei* (sağda)' nin SDA da koloni morfolojisi <http://www.studyblue.com/notes/note/n/yeasts--yeast-like-organisms/deck/2606033> Erişim Tarihi: Haziran 2014

2.4. Hücre Yapısı

Kandidalar; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma içindeki mitokondri, 80S ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve membran ile çevrili nükleus oluşmuş ökaryotik hücrelerdir (40).

Candida türlerinin hücre duvar yapısı, karmaşık içeriklerinin yanı sıra maya formundan hif formuna değişim sırasında kitin içeriğindeki artış ile dikkat çekicidir.

Hücre duvar yapısının yaklaşık olarak %80-90 kadarı karbohidrat, %6-25'i protein, %1-7'si lipidlerden oluşmaktadır. Karbohidratlar, β -glukan, mannan ve kitindir. β -glukan dallanmış β -1,3 ve β -1,6 glukoz polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β -1,4 N-asetil glukozamin polimerlerinden oluşur.

Hücre duvarının en önemli bileşeni, çeşitli yüzeylere tutunmayı sağlayan mannoproteinlerdir.

Hücre zarı iki tabakalı olup fosfolipid, sfingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. Kandidaların 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 hedefdir (40).

2.5. Tür Tanısı

Günümüzde antifungallere direnç açısından türlerin tanımlanması büyük önem taşımaktadır. *Candida* türlerinin, morfolojik olarak tanımlanmasında besiyerinde oluşturduğu koloni morfolojisi, germ tüpü ve klamidospore oluşturma yeteneği, yalancı ve gerçek hif oluşumu; biyokimyasal olarak tanımlanmasında asimilasyon özellikleri göz önünde bulundurulur. Moleküler yöntem olarak PZR ve hibridizasyon temelli deneyler kullanılmaktadır (26). Son yıllarda da 'Matrix assisted laser desorption time of flight Mass Spectrofotometry' (MALDI TOF MS) özellikle sık izole edilen türlerin tanımlanmasında kullanıma girmiştir (14).

2.6. Antifungal İlaçlar

Antifungallerin uygulama alanına girmesi 1950'li yıllarda başlamış, ancak çeşit olarak artışları enfeksiyon hızı ile paralellik göstermemiştir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi ökaryotik özellikteki mantarların, aynı özelliği taşıyan memeli konakta hastalık oluşturmaları nedeni ile, tedavi edici maddelerin yüksek düzeyde seçiciliğe sahip olması gerekliliğidir.

Günümüzde invazif mikoz tedavisinde kullanılan ve 2000’li yıllar öncesine göre sayıca % 30 artış gösteren antifungaller; floropirimidin analogları, poliyenler, azoller ve ekinokandinler olmak üzere dört ana grupta yer alırlar (45).

2.6.1. Floropirimidinler

2.6.1.1. Flusitozin

Primidin türevi sitostatik ilaç olup, DNA’daki sitozin nükleotidinin sentetik analoglarıdır. Flusitozin (5-fluorositozin) fungal bir enzim olan sitozin permeaz tarafından hücre içine alınarak deaminasyona uğrar ve yeni oluşan bu bileşik (5-fluorouracil) RNA sentezinde inhibitör rol oynar. Ayrıca flusitozin pürin ve pirimidin ile yarışarak DNA sentezini de inhibe eder. Monoterapi amaçlı kullanıldığında hızla gelişen sekonder direnç oluşturabileceğinden kombine tedavi programı içerisinde uygulanması gerekir (43).

2.6.2. Poliyenler

Streptomyces türlerinden elde edilmiştir ve fungisidal özelliklidir. Amfoterisin-B (Amf-B) nistatin, ve natamisin bu grupta yer alan antifungallerdir. Nistatin 1951’de *Streptomyces noursei*, natamisin 1956’da *S.natalensis*’ den elde edilmiş olup, çok sınırlı sistemik aktiviteye sahip oldukları için sadece lokal ya da oral yolla kullanılırlar.

Günümüzde yaşamı tehdit eden invazif mikoz tedavisinde halen altın standart olarak kabul edilen Amf-B’nin uzun süreli kullanımlarda ortaya çıkabilecek toksik etkisinden dolayı, yan etkileri minimuma indirilmiş lipozomal Amf-B (AmBisome; Vestar), Amf-B lipid kompleksi [(ABL) (Abelcet: Enzon)], Amf-B kolloidal dispersiyon [(ABCD) ABD’de; Amphotec, diğer ülkelerde: Amphocil] olmak üzere üç lipoidal formu geliştirilmiştir.

Hücre membranında ergosterollere bağlanan antifungal, mantar hücre çeperinde porlar oluşturarak hücre geçirgenliğinin artmasına, makromoleküllerin dışarı sızmasına neden olur ve mantarın ölümü gerçekleşir (43).

2.6.3. Ekinokandinler

Mayalar için fungisidal, küfler için ise fungistatik özellik gösterirler. *Aspergillus rugulovalvus*'dan elde edilen kaspofungin (FDA: 2001, EMEA: 2002), mikafungin (FDA: 2005) ve anidulafungin (FDA:2006) bu grupta yer alır ve lipopeptitlerin sentetik türevleridir.

Hücre duvarındaki $\beta(1-3)$ - D glukun sentezinde görev alan glukun sentazın nonkompetitif inhibitörleridir. Bu etki ile mantar hücre duvarının bütünlüğünün bozulmasına, sitoplazmik içeriğin dışarı sızmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açarlar (43).

2.6.4. Azoller

İlk azol 1944'de Wooley tarafından sentez edilmiş, ancak imidazol grubundan klotrimazol, ekonazol ve mikonazol formülasyonunda antifungal olarak kullanıma girmeleri 1960'ların sonlarına doğru gerçekleşmiştir.

Bu ilaçların toksik yan etkileri nedeniyle kullanımları sınırlandırılmıştır.1981'de FDA ketakonazolün kullanımına onay vermiş ve takip eden 10 yıl boyunca bu ilaç mayalara bağlı sistemik enfeksiyonların tedavisinde yegane azol olarak uygulanmıştır.

İmidazollerin yol açtığı pek çok olumsuzluklar nedeniyle triazoller geliştirilmiştir. 1990'da flukonazol intravenöz formda kolaylıkla uygulanabilirliği ve beyin omurilik sıvısı dahil vücutta iyi dağılımı nedeniyle tercih edilen bir ilaç olmuştur.

Fakat 1990'larda yaygın kullanımına bağlı olarak azollere karşı direnç gelişmeye başlamış dahası bu ilacın küflere karşı hemen hemen hiçbir etkinliği olmadığı belirlenmiştir.

Diğer bir triazol olan itrakonazol 1992'de FDA tarafından onaylanmıştır. Geniş spektrumda mantar türlerine karşı etkinliği nedeniyle artan sıklıkta kullanılmaya başlanmıştır. Fakat hidrofobik olması nedeniyle flukonazolden daha toksik olduğu saptandıktan sonra sadece yüzeysel enfeksiyonların ve bazı sistemik aspergilloz olgularının tedavisinde önerilmeye başlanmıştır. 1997'de bu ilacın daha az toksik formu geliştirilmiş ve 2001'de de enjektabl formülasyonu FDA tarafından

onaylanmıştır. Her iki ilaç da başka ilaçlarla etkileşimlerine bağlı istenmeyen sonuçlara yol açmaları, *Scedosporium*, *Fusarium* ve *Mucorales* türlerine karşı etkisiz olmaları ve azollere karşı artan direnç bildirimleri nedeniyle yeni jenerasyon triazolollerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

Vorikonazol (VOR) 2002'de ve posakonazol (POS) 2006'da FDA tarafından onaylanmıştır; ravukonazol de halen klinik uygulamalar açısından deneme fazındadır. Bu ilaçlar *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Trichosporon* türleri, dimorfik mantarlar, dermatofitler ve *Cryptococcus neoformans* dahil geniş yelpazede etkinliğe sahip antifungaller olarak kullanılmaktadır. Ancak klasik triazolollere karşı dirençli olan mantar izolatlarının bu yeni jenerasyon triazolollere karşı da çapraz direnç geliştirmeleri söz konusudur.

Azoller ERG11 geni tarafından kodlanan ve mantar hücre membranındaki ergosterol biyosentezinde anahtar enzim olan lanosterol 14- α demetilazı inhibe ederek etkinlik gösterirler. Bu inhibisyon, azol halkasındaki serbest nitrojen atomunun, enzimin hem grubundaki demir atomuna bağlanması ile ortaya çıkar ve sonuçta mantar hücresine toksik etkili bileşimlerin sentezlenmesi ve birikimine yol açar (5, 43).

2.7. Antifungallere Direnç:

Antifungallerin tedavi ve profilaksi amaçlı olarak gelişigüzel ve sık kullanımı bazı mantar türlerinde direnç gelişimine neden olmuştur. Antifungal direnç gelişimi klinik, in vitro (mikrobiyolojik) ve moleküler açıdan incelenmeli ve izlenmelidir.

Antifungal direnç genellikle yavaş gelişir ve esas olarak ya ilaç hedeflerinde veya transkripsiyon faktörlerindeki nokta mutasyona bağlıdır. Konu ile ilgili çalışmaların çoğu *Candida* türleri, daha az olarak da *Aspergillus* cinsi ve *C.neoformans* ile yapılmıştır. Antifungallerin fungisidal veya fungistatik etkilerine karşı, mantarlar üç temel mekanizma ile yanıt verirler:

- 1- Artan efluks(dışa atım) etkisi ile hücre içinde ilaç birikimini azaltarak,
 - a- ATP bağlayan kaset (ABC) taşıyıcılar: CDR1, CDR2,
 - b- Major facilitator (kolaylaştırıcı) süper ailesi (MFs) taşıyıcı: MDR(BEN),

2- Hedef enzimde değişiklik yaparak (enzimin aşırı sentezlenmesi veya nokta mutasyonlar ile ilacın hedefine afinitesini azaltarak),

3- Metabolizmada değişiklik yaparak (ergosterol biyosentez yolunun değişimi, plazma membran sterol ve/veya fosfolipid bileşiminde değişikliğe yol açarak, geçirgenliği azaltarak, biyofilm oluşturarak v.b.) (43).

Antifungalın etki mekanizmaları ve bunlara karşı mantarlarda gelişen direnç mekanizmaları Tablo-1 'de özetlenmiştir (43).

Tablo 1. Tedavide kullanılan temel antifungal ilaçların hedefi, etki ve direnç mekanizmaları (43).

Antifungal Maddeler	Hedef ve Etki Mekanizmaları	Direnç Mekanizmaları
Poliyenler	Ergostreol bağlanma, ergosterol azalması	Ergosterol harabiyeti, ERG-3 veya ERG-6' da mutasyon, sterol içeriğinde değişiklik
Azoller	-(14 α -lanosterol demetilaz) Sitokrom p450 nin inhibisyonu, (ERG11) sterol içerik değişikliği	Dışa atım pompaları, ERG11 mutasyonu, ergosterol biyosentezi yolunda değişiklik, ERG11 aşırı ekspresyonu,
5-florositozin	Nükleik asit sentez inhibisyonu	Sitozin permeaz kaybı, sitozin deaminaz kaybı, UPRTaz aktivitesi kaybı[UPRT az'ı kodlayan FCY genlerinde (FCY1, FCY2) mutasyon]
Ekinokandinler	I,3- β -D glukoz sentaz inhibisyonu	FKS1 ve FKS2 genlerinin HS1 ve/veya HS2 bölgelerinde nokta mutasyon

2.7.1. *Candida* ve Azol Direnci

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

- (i) İlacın hedefi olan lanosterol 14 α -demetilazda değişiklik
- (ii) Ergosterol biyosentezinde değişiklik
- (iii) İlacın hücre içinde birikiminde azalma şeklinde özetlenebilir (25).

2.7.1.1.İlacın hedefi olan lanosterol 14 α -demetilazda değişiklikler

Azol grubu antifungallerin hedefi olan 14 α -demetilazı kodlayan *ERG11* geninin fazla ekspresyonu hücre içi enzim seviyesinde artışa ve dolayısıyla da FCZ direncine neden olmaktadır. *ERG11* geni, *ERG* yolağındaki diğer genlerle birlikte *UPC2* (uptake control 2) tarafından kodlanan ve Zn2Cys6 bağlayan bir motif içeren transkripsiyon faktörü (tac 1) tarafından düzenlenmektedir. *UPC2*'nin delesyonu ergosterol yolağında görevli genlerin düzenlenmesini etkilemektedir. Ayrıca *UPC2*'deki bazı mutasyonların sıklıkla *ERG11*'in artan ekspresyonuna neden olarak azol direncine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (10).

Dirençli klinik izolatların genellikle *ERG11*geninde nokta mutasyonlara da sahip olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonlar nedeniyle enzimde ortaya çıkan yapısal değişikliklerin, enzimin azollere afinitesinde azalmaya yol açarak dirençten daha fazla sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (25).

Mutasyonların azollere olan afiniteyi etkilemesinde en önemli neden enzimde konfigürasyon değişiklikleridir. Bu enzim A- M arası 13 α heliks, beta katmanı ve A', J, K ve K2' gibi diğer heliks konfigürasyonları oluşturan 528 aminoasit içeren protein yapısındadır. *ERG11* geninde meydana gelen nokta mutasyonlar aminoasitlerde değişikliklere ve enzimde farklı konfigürasyonların oluşmasına yol açarak enzimin azollere karşı afinitesini azaltmakta ve bu da azollere dirençli fenotiplerin ortaya çıkması ile sonlanmaktadır (43).

C.albicans ile yapılan son çalışmalarda nokta mutasyonların özellikle FCZ ve vorikonazole (VOR) karşı dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (43).

2.7.1.2.Ergosterol biyosentez yolağında değişiklik

Ergosterol biyosentez yolağında 14 α -demetilazdan daha erken bir basamakta rol alan, Δ 5,6 desatüraz enziminin inaktivasyonu ile enzimi kodlayan *ERG3* genindeki mutasyonlara bağlı olarak membran sterolünün yapısında meydana gelen değişiklikler ve 14 α -metil fekosterol birikimi özellikle *C.albicans*'da azol direncine neden olmaktadır.

Özellikle vorikonazol tedavisini takiben bu mutasyonların saptandığı çalışmalar ile gösterilmiştir (24).

2.7.1.3. İlacın hücre içi birikiminde azalma

Mantar hücresi içinde ilaç birikiminde azalma; membran sterollerindeki ve/veya fosfolipitlerindeki değişim nedeniyle membran geçirgenliğinde ve buna bağlı olarak hücre içine ilaç alımında bozulma ya da ilacın pompa sistemleriyle dışa atılımının artması sonucu ortaya çıkmaktadır.

Küçük moleküllerin, mantar hücresi plazma membranının her iki yönüne doğru hareketinde, atım pompaları işlev görmektedir. Funguslarda ABC ve MFs süper aileleri olmak üzere iki tip aktif atım pompa sistemi mevcuttur (3).

ABC süper ailesi ATP'ye bağlanır, enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanır ve hücreye toksik olan küçük moleküllerin aktif atımları ile ilişkilidir. Bu küçük moleküller, azoller gibi hidrofobik veya lipofiliktir. Özellikle *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis* ve *C.dublinsiensis* kökenlerinde bu grup aktif pompaların önemli rolü olduğu bildirilmiştir. *C.albicans*, *C.dublinsiensis* ve *C.glabrata*'da azol direnci ile ABC taşıyıcılarını kodlayan *CDR* (*Candida* Drug Resistance), *CDR* ve *SNQ2* genlerinin ilişkili olduğu gösterilmiş; dirençli *C.albicans* kökenlerinde *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* ve dirençli *C.glabrata*'da ek olarak *CgSNQ2*'nin fazla eksprese edildiği bildirilmiştir (35).

MFs pompaları ise enerji kaynağı olarak membran potansiyelini kullanır ve çeşitli yapısal bileşiklerin transportu ile ilişkilidir. *C.albicans*'da iki MFs pompa geni tanımlanmıştır. Bunlar *MDR1* (*Ben-R*) geni ve *FLU-1* genidir. Klinik *C.albicans* izolatlarında *MDR1*'in mRNA düzeylerindeki artışın, flukonazol için özgün olduğu saptanmıştır. *FLU-1* geninin de *C.albicans* ile yapılan çalışmalarda flukonazol direncinde rol aldığı gösterilmiştir. Ancak *FLU-1* geninin fazla ekspresyonu hiçbir dirençli klinik izolatta ortaya konamamıştır (25).

Klinik *C.albicans* izolatlarında azol direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenin çoklu atım pompalarının fazla ekspresyonu olduğu bildirilmektedir (25).

Atım genleri olan *CDR1* ve *CDR2* genellikle birlikte regüle edilmektedir. *CDR1* ve *CDR2*'nin regülasyonu için önemli 'promoter' bölgeleri tanımlanmıştır. *CDR1*'in

promoter bölgesindeki “drug response element (DRE)”, klinik izolatlarda bu pompanın yüksek düzeyde ekspresyonu için önemlidir. Diğer iki eleman, “steroid response element1,2 (SRE1 ve 2)” pompa genlerinin steroid ile indüksiyonundan sorumludur. Bunun yanında “basal expression element (BEE)” ve “negative regulatory element (NRE)” tanımlanmıştır. BEE ve DRE’deki delesyonlar bazal *CDR1* ekspresyonunu olumsuz etkilerken, NRE’deki delesyonlar *CDR1*’in bazal ekspresyonunda artışa neden olur. *CDR2* promoter bölgesinde sadece DRE motifi mevcuttur (1, 22, 27, 28).

C.glabrata’da önceden *PDH1* olarak gösterilen CgCDR1 ve CgCDR2 ve de bunlarla koregüle edilen CgSNQ2 ABC taşıyıcılarının azollere dirençli klinik izolatlarda fazlaca eksprese edildiği belirlenmiştir. *C.glabrata*’da CgCDR1 ve CgCDR2’deki bozukluklar FCZ’ye, sikloheksimide ve kloramfenikole karşı aşırı duyarlılığa yol açmaktadır. *C.albicans* ve *C.glabrata*’da ABC taşıyıcıları arasında azol direncine en fazla katkıda bulunan *CDR1*’dir (43).

CDR genlerinin transkripsiyonel aktivatörü olan *taclp*’nin in vivo ve in vitro koşullarda *DRE*’ye bağlandığı gösterilmiştir. *taclp* yi kodlayan *TAC-1* geni *C.albicans* genomunda *MTL*(mating type locus) gen bölgesi ile yakın ilişkilidir. *CDR1* ve *CDR2* nin yüksek düzeyde ekspresyonu için, *MTL* gen bölgesinin homozigot olarak yer alması ve aynı bölgede yer alan *TAC-1* hiperaktif allellerinin birlikte bulunması gerektiği gösterilmiştir (1, 39).

Candida albicans, *C.glabrata* ve nadiren *C.krusei* klinik kökenlerinde azollere karşı dirençte bu pompaların aktif olarak rol aldığı çeşitli moleküler çalışmalarla gösterilmiştir (13, 21, 35).

Kandidalarda dışa atım pompasına bağlı azol direnci ile mücadelede, pompa inhibitörü ilaç geliştirip, dirençli maya hücrelerinin mevcut etkili antifungallere tekrar duyarlı hale getirilmesi günümüzde önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir (12).

2.8.Pompa İnhibitörü Maddeler ve Özellikleri

Daha sık bakterilerde görülmekle birlikte son yıllarda kandidalarda da dışa atım pompalarına bağlı direnç sorun oluşturmaya başlamıştır. Bu direncin üstesinden gelmek üzere alternatif tedavi seçeneklerine gereksinim olmasının yanı sıra, dışa atım pompasının etkilerini inhibe edebilen bileşiklerin geliştirilmesine de gereksinim kaçınılmaz görünmektedir.

Son yıllarda bu pompa sistemlerinin üstesinden gelebilecek ve böylelikle neden oldukları ilaç direncini ortadan kaldıracak bileşikler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Çeşitli dışa atım pompa inhibitörlerinin tanımlanmasına ve in vitro aktivitelerinin gösterilmesine rağmen, bunların çoğu ökaryotik hücrelerde güçlü farmakolojik etki gösterdiğinden günümüzde hiçbiri klinik kullanımda değildir.

Literatürde mantarlar için atım pompa inhibitörü olarak bildirilen birçok madde vardır, bunlardan bazıları; FK506, milbemycin, enniatins, ibuprofen ve son yıllarda tanımlanan tetrandrine, clorgylene gibi maddelerdir (12).

Çalışmamızda kullandığımız dışa atım pompa inhibitörü maddeler; ibuprofen, tetrandrine ve clorgyline'dir;

- **İbuprofen;** halen klinik kullanımda olan non-steroidal, antiinflamatuvar bir ilaçtır. İbuprofenin FCZ ile sinerjistik etkisini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise ibuprofenin sabit sub-MİK (100µg/ml) konsantrasyonunda FCZ Di *C.albicans* kökenlerini duyarlı hale getirdiği ve bunu da CDR pompalarını bloke ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (32, 33).

- **Tetrandrine;** *Stephania tetrandra* bitkisinden elde edilmiş düşük toksiteli bir ilaçtır. Çin'de 1950'den bugüne hipertansiyon ve kardiyak aritmi tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda bu maddenin sabit konsantrasyonlarında (40µg/ml) *C.albicans* 'da atım pompa genlerinin (*CDR1*, *CDR2*, *MDR1* ve *FLU1*) ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (38, 47).

- **Clorgylene;** eski bir antidepresandır, çok uzun yıllar önce çeşitli yan etkilerinden dolayı kullanımdan kaldırılmıştır. Literatürde clorgyleninin atım pompa inhibitörü olduğunu bildiren tek çalışma mevcuttur. Bu çalışmada araştırmacılar, clorgyleninin sabit sub-MİK (50µg/ml) konsantrasyonlarında FCZ dirençli *C.albicans* ve *C.glabrata* kökenlerinde ABC ve MFs pompalarını inhibe ederek, bu kökenleri duyarlı hale getirdiğini göstermişlerdir (12).

2.9. Antifungal Duyarlılık Testleri

İn vitro antifungal duyarlılık testleri;

i) iki ya da daha fazla antifungal ilacın göreceli etkinliklerinin güvenilir bir ölçümünü sağlar,

ii) in vivo etkinlik ile paralellik gösterir ve sağaltımın muhtemel sonucunu öngörür,

iii) normalde duyarlı olan bir organizma popülasyonu içindeki direnç gelişimini izlemede kullanılan bir araçtır

iv) yeni bulunmuş deneysel ilaçların sağaltıcı potansiyelini öngörür (6).

Ancak azollerin kullanıma girmesinden önce antifungal duyarlılık testleri için klinik gereksinim olmamıştır. Çünkü 1950'lerin başlarında kullanıma girmiş olan amfoterisin B, uzun bir süre fungal hastalıkların tedavisinde yegane başvuru ilacı olarak yer almıştır. Fakat son yıllarda hazırlayıcı faktörler varlığında artan fungal enfeksiyonlar, bu enfeksiyonlara karşı modern teknoloji ile geliştirilen kimyasallar ve bu kimyasallara karşı mantarların oluşturduğu direnç, antifungal duyarlılık testlerine gereksinimi arttırmıştır (5).

National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) / Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Antifungal Duyarlılık Testleri Altkomitesi, mayalar ve küfler için agar bazlı ve sıvı bazlı duyarlılık deneyleri standartları geliştirmiştir ve bu standartları rehberler halinde yayınlamışlardır (5).

CLSI Antifungal Duyarlılık Testi Alt Komitesi mayalar için makrodilüsyon ve mikrodilüsyon (M27-A2, A3), disk difüzyon (M44-A2); küfler için makrodilüsyon ve mikrodilüsyon (M38-A2) ile disk difüzyon (M51-A) duyarlılık testleri için referans yöntemler geliştirmiştir.

Ayrıca EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Antifungal Duyarlılık Testleri Alt Komitesi tarafından mayalar ve küfler için benzer mikrodilüsyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu referans yöntemler, elde edilen in vitro verilerin tekrarlanabilirliğinde ilerleme ve kullanımda olan antifungaller için direnç sınır değerlerinin belirlenmesi açısından mantarlar için standardizasyon sağlamıştır.

In vitro antifungal duyarlılık testleri; inokulum miktarı ve hazırlama şekli, besiyeri içeriği ve pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile MİK değerinin saptanmasında kullanılan kriterler de dahil olmak üzere birçok değişkenden etkilenmektedir.

En sık kullanılan antifungal duyarlılık testlerinin; makrodilüsyon, mikrodilüsyon, kolorimetrik mikrodilüsyon, disk difüzyon ve E test yöntemleri olduğu bildirilmiştir (17).

2.9.1.Dilüsyon Temeline Dayalı Testler

2.9.1.1.Makrodilüsyon Yöntemi

Sıvı makrodilüsyon testleri altın standart olarak kabul edilse de uygulanma zorluğu nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. CLSI tarafından testte kullanılması önerilen besiyeri, L-glutamin ile bir pH indikatörü içeren ve sodyum bikarbonatsız olan RPMI 1640 sıvı besiyeridir. Besiyeri, son konsantrasyonu 0,165M olacak şekilde morfolinopropanesulfonikası (MOPS) ile 25°C'de pH'sı 7,0'e tamponlanmış olmalıdır. Test için yuvarlak tabanlı, kapaklı ve steril polistiren tüpler kullanılmaktadır.

Test sonuçlarının değerlendirilmesi, 35°C'de çalkalamaksızın, 48 saatlik (*C.neoformans* için 72 saat) inkübasyon sonrasında yapılır. Azoller ve 5-FC için, üreme kontrolüne göre, üremeyi %80 oranında azaltan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak tanımlanırken; Amf-B için, görülebilir herhangi bir üreme oluşumunu engelleyen en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kabul edilir (6).

2.9.1.2.Mikrodilüsyon Yöntemi

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 değerlerinkine göre daha yüksek olabilmektedir. Mikrodilüsyon testi, steril, 96 kuyucuklu U tabanlı mikrodilüsyon plaklarında uygulanır. RPMI 1640 besiyeri, iki kat yoğunlukta hazırlanmış ilaç çözeltisi ve maya süspansiyonları kullanılır. 35°C'de

inkübe edilen mikrodilüsyon plakları Amf-B ve FCZ için 24. ve gerekirse 48. saatlerde, ekinokandinler için 24. saatte, 5-FC ve diğer azoller için ise 48. saatte değerlendirilir.

Değerlendirme gözle ve azoller için spektrofotometrik olarak yapılır. Amf-B için; üremenin tam inhibe olduğu yani bulanıklığın izlenmediği kuyucuktaki konsantrasyon; azoller, ekinokandinler ve 5-FC için ise gözle okumada üreme kontrole göre bulanıklığın belirgin olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon ve de spektrofotometrik olarak üremeye göre bulanıklığın %50 oranında azaldığı kuyucuktaki değer MİK değeri olarak kabul edilmektedir (7).

M27-A3- S3'e göre flukonazol için sınır değerler duyarlı (Du): $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, doza bağımlı duyarlı (DBD): 16-32 $\mu\text{g/ml}$ ve dirençli (Di): $\geq 64 \mu\text{g/ml}$; itrakonazol için Du: $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$, DBD: 0.25- 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ve Di: $\geq 1 \mu\text{g/ml}$; vorikonazol için Du: $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, DBD: $1 \mu\text{g/ml}$, ve Di: $\geq 4 \mu\text{g/ml}$; 5- FC için Du: $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, orta duyarlı: 8-16 $\mu\text{g/ml}$ ve Di: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$; ekinokandin için Du: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olarak belirtilmiştir (Tablo- 2) (7).

Tablo 2: M27-A3-S3' e göre sınır değerler (38)

	Du	DBD	Di	I
Flukonazol	$\leq 8 \mu\text{g/ml}$	16-32 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$	-
Itrakonazol	$\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$	0.25- 0.5 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 1 \mu\text{g/ml}$	-
Vorikonazol	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$	-
5- FC	$\leq 4 \mu\text{g/ml}$	-	$\geq 32 \mu\text{g/ml}$	8-16 $\mu\text{g/ml}$
Ekinokandin	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	-	-	-

I: orta duyarlı; Du: duyarlı, DBD: doza bağımlı duyarlı, Di: dirençli

EUCAST'ın geliştirdiği mikrodilüsyon yönteminde CLSI' dan farklı olarak daha fazla inokulum ve %2 dekstroz eklenmiş RPMI besiyeri kullanılmakta olup, 24 saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. Bu yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği iyi olup, CLSI mikrodilüsyon yöntemi ile %95 uyumlu bulunmuştur (17, 30).

2.9.1.3.Kolorimetrik Mikrodilüsyon Yöntemi

Mikrodilüsyon veya makrodilüsyon yöntemlerine alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde MİK'in belirlenmesi için ticari olan veya olmayan kolorimetrik indikatörler veya floresan boyalar kullanılır.

Alamar mavisini, oksidasyon-redüksiyon kolorimetrik indikatörü (mantar üremesi indikatörünün rengini maviden pembeye dönüştürür) olarak içeren ticari bir test (Sensititre YeastOne; TREK Diagnostic Systems) FCZ, itrakonazol ve 5-FC için FDA onayı almıştır (17).

2.9.2.Difüzyon Temeline Dayalı Testler

2.9.2.1.Disk Difüzyon Yöntemi

CLSI, *Candida* türlerinin flukonazol, vorikonazol duyarlılığını disk difüzyon testi ile araştırabilmek için M44-A dokümanını geliştirmiştir. Bu yöntem, %2 dekstroz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agarda 25 µg'lık FCZ, 5 µg'lık POS ve 1 µg'lık VOR diskleri kullanılarak uygulanmaktadır.

Disk difüzyon yönteminin önemli bir avantajı sonuçların inkübasyondan 20-24 saat sonra elde edilebilmesidir. Yöntemin dilüsyon testlerine göre uygulaması daha kolay ve maliyeti düşüktür.

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

2.9.2.2.E-test yöntemi

Belirli bir ilacın konsantrasyonlarının sürekli ve stabil gradiyente dayalı olarak emdirilmiş olduğu plastik bir şerit, test kökeninin inokule edildiği besiyerinin üzerine yerleştirilir. İnkübasyonu takiben gözle görülebilir üremenin varlığında simetrik inhibisyon elipsi gözlenir. Elipsin şeriti kestiği nokta o ilacın MİK değeri olarak değerlendirilir (17).

Pahalı olmasına rağmen uygulanması kolay bir yöntemdir. %2 glukoz eklenmiş ve katılaştırılmış RPMI 1640 besiyeri E test uygulanmasında iyi sonuç vermiştir. FCZ, İTRA ve 5-FC E-testleri FDA onayı almıştır (17).

2.9.3.Diğer Yöntemler

2.9.3.1.Flow (Akım) sitometrik yöntem

Akım sitometri tekniğinin antifungal duyarlılık testlerine uyarlanmasıyla elde edilen bu yöntemde, antifungal bir ilaçla karşılaştırıldıktan sonra, mantar hücresinde oluşan hasarı saptamak için, kültür ortamına konulan boya maddesi hasar gören hücredeki DNA'ya bağlanır ve canlı-ölü hücre sayısal değerlendirmesine göre MİK saptanır. Yöntemin dört-altı saat gibi kısa sürede sonuç vermesine rağmen, akım sitometri cihazına gereksinim nedeniyle kullanımı yaygın değildir. Bu yöntemin CLSI mikrodilüsyon yöntemiyle %96 ile %99 oranında uyumlu olduğu bildirilmiştir (18).

2.9.3.2.Ergosterol kantitasyonu

Üremenin inhibisyonu yerine, ergosterol miktarının kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Azol grubu ilaçların etkinliğini ölçmek için kullanılan bu yöntem, özellikle azol MİK sonuçlarının zor okunduğu, kısmi inhibisyon gösteren *Candida* suşları için ümit vericidir (2).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Çalışmaya alınan klinik *Candida* izolatları:

2001-2012 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi'ne gönderilen çeşitli klinik örneklerden (kan, idrar, balgam, cilt insizyonu, fistül sürüntüsü, kalp kapakçığı) etken olarak izole edilmiş; standardize yöntemlerle ve API ID 32C (*bioMerieux*, Fransa) kiti ile *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.krusei* olarak tanımlanmış ve de CLSI M27-A dokümanının önerdiği makrodilüsyon yöntemine göre FCZ'ye dirençli (Di) ve doza bağımlı duyarlı (DBD) olarak saptanmış kandida kökenleri çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı zamanda klinik kökenlerin ITRA ve VOR' a karşı direnç durumları da araştırılmıştır.

3.1.2. Referans Kökenler

Aşağıdaki kökenler belirtilen özellikleri moleküler yöntemlerle de kanıtlanmış olup, çalışmalarımızda kontrol kökenler olarak kullanılmıştır. Kökenlerin sağlandığı kaynaklar parantez içerisinde belirtilmiştir.

➤ *Candida albicans* ATCC 90028: FCZ'e duyarlı köken (FCZ MİK: 2µg/ml) negatif kontrol olarak kullanıldı.

➤ *Candida albicans* 95-142: *CDR1* ve *CDR2* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK: 128µg/ml), (White, ABD).

➤ *Candida albicans* 95-190: *CDR1*,*CDR2* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK:16 µg/ml), (White, ABD).

➤ *Candida albicans* 12-99: *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, *ERG11* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK: 64µg/ml), (White, ABD).

➤ ***Candida glabrata* DSY-530:** *CDR1*, *ERG11* aşırı ekspresyonu, (FCZ MİK: 32µg/ml), (Sanglard, İsviçre).

➤ ***Candida glabrata* DSY-565:** *CDR1* ve *ERG11* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK: 128µg/ml), (Sanglard, İsviçre).

➤ ***Candida glabrata* DSY-562:** FCZ' ye duyarlı köken (FCZ MİK: 8µg/ml), (Sanglard, İsviçre), negatif kontrol olarak kullanıldı.

➤ ***Candida glabrata* YEM 19:** *CDR1* ve *CDR2* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK: 128µg/ml), (Lomovskaya, ABD).

➤ ***Candida albicans* DSY-292:** *ERG11* mutasyonu, *MDR* aşırı ekspresyonu (FCZ MİK: 64µg/ml), (Doluca, DEÜ İzmir).

3.1.3. Pompa inhibitörü maddeler:

Çalışmamızda, literatürde *C.albicans* ve *C.glabrata* için pompa inhibitörü olduğu bildirilen;

➤ TET (12-99 *C.albicans*'da *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* inhibitörü) (Sigma) sabit sub-MİK * değeri: 40µg/ml

➤ Clorgyline (12-99 *C.albicans*'da *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1*; CBS-138 *C.glabrata* 'da *CDR1* inhibitörü), (Sigma), sabit sub-MİK değeri: 50µg/ml

➤ İbuprofen (12-99 *C.albicans*'da *CDR1* ve *CDR2* inhibitörü)(sigma) sabit sub-MİK değeri: 100µg/ml

maddeleri kullanılmıştır,

*sabit sub-MİK değeri: Literatüre göre belirlenen ve referans kökenlerde pompayı inhibe eden en düşük inhibitör sub-MİK değeri (12, 33, 47).

3.1.4. Besiyerleri

- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Oxoid)
- YPDA (yeast extract peptone dextrose agar) (Sigma)
- YPDB (yeast extract peptone dextrose broth) (Sigma)
- RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız) Besiyeri (Sigma)

3.1.5. Kimyasal Maddeler ve Antifungal İlaçlar

- MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] (Sigma)
- NaCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- Flukonazol (Sigma), potensi: %100
- Vorikonazol (200mg infüzyon çözeltisi için toz, V FEND IV, Pfizer)
- İtrakonazol (Sigma), potensi: %100
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Merck)

3.1.6. Filtreler:

- 0.22 µm'lik membran filtre (Sartorius)

3.1.7. Araçlar ve Aygıtlar:

- Tek kanallı otomatik pipetler (Thermo)
- Petri kutuları, balonlar, pipetler, tüpler, sarı ve mavi pipet uçları, sporlar
- 96 kuyucuklu U tabanlı Plak (LP Italiana)
- Etüv (Memmert)
- Pasteur fırını (Memmert)
- Otoklav (Hirayama)

- Buzdolabı (Arçelik)
- (-20 °C) Dondurucu (Uğur)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Kaba terazi (Scaltec)
- Vorteks (Yellowline, Ika)
- Su banyosu (Memmert)
- Kurutma kağıtları
- Steril pamuklu eküvyonlar
- pH metre cihazı (Hana Instruments)
- Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag)
- Enjektör 5, 10 ml
- Kâğıt diskler 6mm (Oxoid)
- 100 µl'lik ve 1000 µl'lik pipet uçları
- Işık mikroskobu (Nikon)
- Mikroplak okuyucu (Weida)

3.2.Yöntemler

Pompa inhibitörü maddelerin 'sabit değerleri' kullanılarak klinik kökenlerdeki olası pompa varlığı 'sıvı mikrodilüsyon' ve 'agar disk difüzyon' yöntemleri ile araştırıldı.

3.2.1.Sıvı Mikrodilüsyon

CLSI M27 A3 dokümanı referans alınarak, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile pompa inhibitörlerinin sabit konsantrasyonlarının yokluğunda ve varlığında referans kökenlerin ve klinik izolatların FCZ MİK değerleri ve bu değerlerdeki değişimler değerlendirildi.

1.basamak:

Her bir test edilecek maya kökeninin SDA'da 37°C'de, 24 saatlik kültürde üremiş kolonilerinden % 0,85'lik NaCl ile steril tüpte 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ hücre/ml) yoğunluktaki süspansiyonu hazırlandıktan sonra, final konsantrasyonuna ulaşmak üzere, bu süspansiyon RPMI'li besiyeri ile seyreltilerek $1-5 \times 10^3$ hücre/ml'lik yoğunluğa getirildi.

Mikroplaklardaki 2-11 arası her bir sütunda bir FCZ konsantrasyonu (512-1µg/ml) olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. Son sütundaki kuyucuklara üreme kontrol olarak kullanılmak üzere 100'er µl ilaç içermeyen besiyeri dağıtıldı, ardından ilk sütun hariç (2-12) her bir sıraya bir köken gelecek şekilde maya süspansiyonundan 100'er µl eklendi. Bu işlem sonucunda hem ilaç hem de maya konsantrasyonları ½ oranında seyreltilmiş olarak final konsantrasyonlarına ulaşıldı. Her yatay sıranın ilk kuyucuğuna (A1-H1) 200 µl ilaçsız besiyeri konularak sterilite kontrolü yapıldı.

Mikroplakların üzeri steril kapak ile kapatılarak, 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında üreme kontrol kuyucuğuna göre yapılan karşılaştırmada, üremenin %50 inhibe edildiği en düşük ilaç konsantrasyonunu içeren ilk kuyucuk o köken için FCZ MİK olarak belirlendi. Sonuçlar 630nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ve ayna ile okundu (7).

2.basamak:

Pompa inhibitörü maddelerin sabit konsantrasyonlarının varlığında, CLSI M27 A3 referans alınarak, kontrol ve klinik kökenlerin FCZ MİK değerlerindeki değişimler araştırıldı.

Steril tüplerde, hem inhibitör maddeler için, hem de FCZ için mikroplaklardaki son konsantrasyonlarının 4 katını içeren dilüsyonlar hazırlandı. Her bir maya kökeni için de yukarıda belirtildiği şekilde $1-5 \times 10^3$ hücre/ml'lik maya süspansiyonları elde edildi.

Mikroplaklarda son ve ilk sütun hariç (2-11) her sütunda bir FCZ konsantrasyonu olacak şekilde 50'şer µl dağıtıldı. Aynı kuyucuklara inhibitör maddenin hazırlanan solüsyonundan 50'şer µl dağıtıldı. Ardından ilk sütun hariç (2-12) her bir sıraya bir köken gelecek şekilde maya süspansiyonundan 100'er µl

eklendi. Son sütunda her kuyucuğa 100µl ilaçsız besiyeri de eklenerek üreme kontrol olarak kullanıldı. İlk sütunda her bir kuyucuğa(A1-H1) 200µl ilaç içermeyen besiyeri dağıtılarak sterilite kontrol hazırlandı (Şekil-1).

Test kökenlerinde üreme kontrole göre %50 oranında inhibisyon gerçekleşen kuyucuktaki değer, ilgili pompa inhibitörünün sabit konsantrasyonunun varlığında o köken için FCZ MİK değeri olarak belirlendi.

Kökenler için inhibitör maddeler olmaksızın (1.basamak) ve bu maddelerin varlığında (2.basamak) elde edilen FCZ MİK değerleri karşılaştırıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A*	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
B	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
C	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
D	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
E	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
F	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
G	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K
H	S.K	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	FCZ + inh. + maya	Ü.K

Şekil 1.İkinci basamak işlemlerin şematik olarak gösterilmesi

* A-H arası yatay sıra farklı test kökenlerine ait düzeneği göstermektedir. S.K: sterilite kontrol, Ü.K: üreme kontrol, inh.: inhibitör madde

Ayrıca CLSI M27-A3-S3 metoduna göre; klinik kökenlerimizin vorikonazol (VOR) ve itrakonazol (ITRA) MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon metodu ile belirlendi.

3.2.2 Agar Disk Difüzyon Yöntemi

Test edilecek referans kökenler ve klinik kökenler; YPD sıvı besiyerinde, 150 r.p.m'de, 37°C çalkalayıcı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, steril distile su ile 0,5 McFarland bulanıklığında maya süspansiyonu hazırlandı. YPD agar besiyeri su banyosunda 45°C'ye soğutulduktan sonra besiyerinin mililitresinde her bir köken için supra-MİK konsantrasyonunu elde etmek üzere FCZ eklendi, sonrasında 9 cm'lik plaklara döküldü. 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonları steril eküvyon ile plaklar üzerine homojen yayıldı.

Her bir pompa inhibitörü madde için, 10µl de o maddeye ait sabit konsantrasyonu içermek üzere, DMSO ile stok çözeltileri hazırlandı ve 6mm çapında steril boş disklerle 10'ar µl emdirildi. Diskler 2 saat kurumaya bırakıldıktan sonra FCZ içeren ve ekim yapılmış YPD agar plaklarına yerleştirildi. FCZ içermeyen fakat maya inokulasyonu yapılmış plaklara da inhibitör madde ve DMSO emdirilmiş diskler yerleştirilerek, bu maddelerin antifungal etkilerinin olup olmadığı incelendi. Sonuçlar, 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda disklerin çevresinde inhibisyon zonlarının varlığına ya da yokluğuna göre değerlendirildi (33).

4.BULGULAR

4.1. Referans ve Klinik Kökenlerin Pompa İnhibitörü Varlığında FCZ MİK Sonuçları

Referans ve klinik kökenlerin, pompa inhibitörü maddelerin sabit konsantrasyonlarının varlığında orijinal FCZ MİK değerlerindeki değişim Tablo 3 ve 4' de gösterilmiştir.

Tablo 3: Referans kökenlerin FCZ MİK değerleri üzerine pompa inhibitörü maddelerin etkileri

REFERANS KÖKEN:	Köken Özellik:	FCZ MİK	IBUPROFEN 100µg/ml + FCZ MİK	CLORGYLINE 50µg/ml+ FCZ MİK	TET 40µg/ml + FCZ MİK
<i>12-99 C.albicans</i>	CDR1,CDR2,MDR,ERG11 aşırı ekspresyonu	64µg/ml	64µg/ml	4µg/ml*	≥ 256 µg/ml**
<i>95-142 C.albicans</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	32 µg/ml	4µg/ml*	32 µg/ml
<i>95-190 C.albicans***</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	16 µg/ml	16µg/ml	16µg/ml	16µg/ml
<i>DSY-292 C.albicans</i>	ERG11 mutasyonu, MDR aşırı ekspresyonu	64µg/ml	64µg/ml	8µg/ml*	64µg/ml
<i>DSY-530 C.glabrata</i>	CDR1, ERG11 aşırı ekspresyonu	32µg/ml	32µg/ml	16µg/ml	32µg/ml
<i>DSY- 565 C.glabrata</i>	CDR1, ERG11 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	128µg/ml	8µg/ml*	32µg/ml
<i>YEM-19 C.glabrata</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	64µg/ml	8µg/ml*	64µg/ml
<i>DSY-562 C.glabrata***</i>	CDR1, ERG11 ekspresyonu	8µg/ml	8µg/ml	8µg/ml	8µg/ml
<i>90028 ATCC C.albicans***</i>	Duyarlı köken	2µg/ml	2µg/ml	2µg/ml	1µg/ml

* FCZ MİK değerinde duyarlılık düzeyine düşüş (pompa inhibisyonu)

** FCZ MİK değerinde artış (induksiyon?)

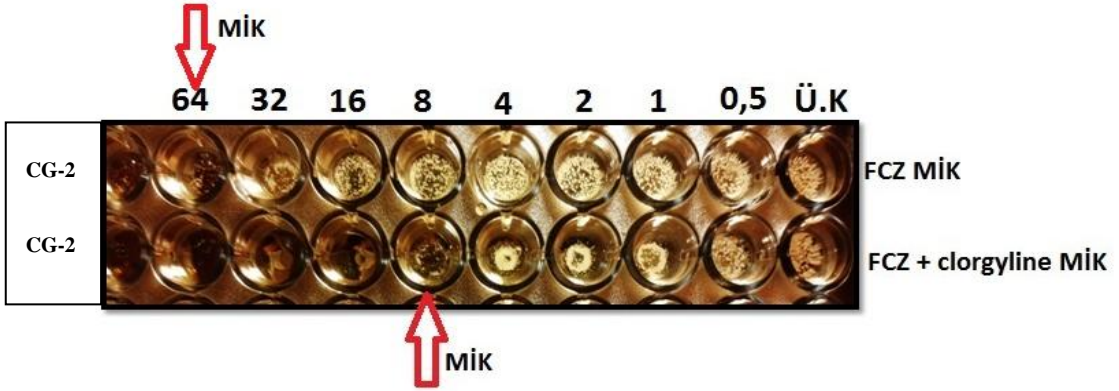
*** FCZ MİK değişimi gözlenmeyen kökenler

Tablo 4: Klinik izolatların FCZ MİK değerleri üzerine pompa inhibitörü maddelerin etkileri

Tür	FCZ MİK	FCZ+ 100µg/ml IBUPROFEN	FCZ+ 50µg/ml CLORGYLNE	FCZ+ 40µg/ml TETRANDRİNE
<i>C.albicans</i> (CA-1)	512µg/ml	0.5 µg/ml*	0.5 µg/ml*	0.5 µg/ml*
<i>C.albicans</i> (CA-2)	512µg/ml	2µg/ml*	0.5 µg/ml*	512 µg/ml
<i>C.albicans</i> (CA-3)	16µg/ml	16µg/ml	8 µg/ml	16µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-1)	256µg/ml	128µg/ml	4µg/ml*	128µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-2)	64µg/ml	64µg/ml	8µg/ml*	16µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-3)	64µg/ml	64µg/ml	16µg/ml	32µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-4)	64µg/ml	64µg/ml	8µg/ml*	16µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-5)	16µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml
<i>C.glabrata</i> (CG-6)	16µg/ml	16µg/ml	4µg/ml	16µg/ml
<i>C.krusei</i> (CK-1)	64µg/ml	32µg/ml	32µg/ml	64µg/ml
<i>C.krusei</i> (CK-2)	32µg/ml	16µg/ml	16µg/ml	32µg/ml

* FCZ MİK değerinde dirençli düzeyden duyarlı düzeye düşüş (pompa inhibisyonu)

Çalışmamızda, pompa inhibitörü yokluğunda ve varlığında (örnek: clorgylne) FCZ MİK değerindeki değişimin mikrolaktaki görüntüsü Resim-2’ de gösterilmiştir.



Resim 2: CG-2 klinik izolatının clorgylne yokluğunda ve varlığında FCZ için MİK değerindeki değişim (Dirençli – duyarlı hale dönüşüm 64-8µg/ml)

4.2. Referans ve Klinik Kökenlerde Pompa İnhibitörü Varlığında Agar Disk Difüzyon Sonuçları

Referans kökenlerin FCZ supra-MİK değerlerini içeren YPD agar besiyerinde, disklere emdirilmiş pompa inhibitörlerinin sabit konsantrasyonlarının varlığında inhibisyon zonu oluşumuna göre sonuçları Tablo 5 de gösterilmiştir.

Tablo 5. İnhibitör madde varlığında referans kökenlerin agar disk difüzyon sonuçları

Referans Köken:	FCZ Supra-MİK	100µg/disk Ibuprofen	50µg/disk Clorgylne	40µg/disk TET
<i>12-99 C.albicans</i>	128µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
<i>95-142 C.albicans</i>	256µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
<i>95-190 C.albicans</i>	32µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
<i>DSY-292 C.albicans</i>	128µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
<i>DSY-530 C.glabrata</i>	64µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
<i>DSY- 565 C.glabrata</i>	256µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
<i>YEM-19 C.glabrata</i>	256µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
<i>DSY-562 C.glabrata</i>	16µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK

*İnhibisyon zonu oluşumu (atım pompası inhibisyonu)

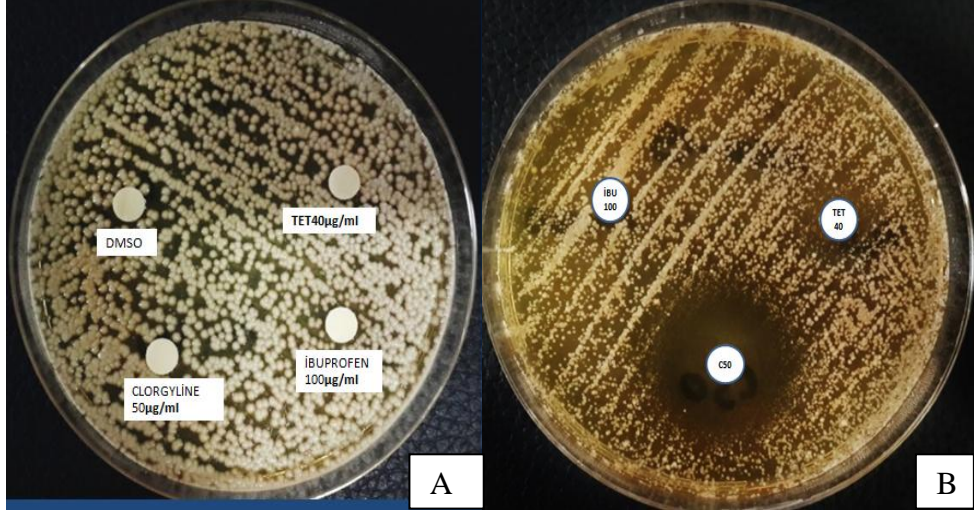
Klinik izolatların FCZ supra-MİK değerlerini içeren YPD agar besiyerinde, disklere emdirilmiş pompa inhibitörlerinin sabit konsantrasyonlarının varlığında inhibisyon zonu oluşumuna göre sonuçları Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: İnhibitör madde varlığında klinik izolatların agar disk difüzyon sonuçları

Tür	FCZ supra-MİK	FCZ+ 100 µg/ml IBUPROFEN	FCZ+ 50 µg/ml CLORGYLNE	FCZ+ 40 µg/ml TETRANDRİNE
CA-1	1024µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
CA-2	1024µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
CA-3	32µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CG-1	512µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
CG-2	128µg/ml	ZON YOK	ZON VAR*	ZON YOK
CG-3	128µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CG-4	128µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CG-5	32µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CG-6	32µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CK-1	128µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK
CK-2	64µg/ml	ZON YOK	ZON YOK	ZON YOK

*İnhibisyon zonu oluşumu (atım pompası inhibisyonu)

Örnek olarak *C.albicans* DSY-292 referans kökenin FCZ içermeyen ve FCZ içeren YPD agarda, pompa inhibitörleri emdirilmiş disklerin varlığında plaklardaki üreme görüntüleri Resim-2’de gösterilmiştir.



Resim 3. DSY-292 *C.albicans*: (A) FCZ içermeyen YPD agarda, pompa inhibitörleri ve DMSO emdirilmiş disklerin varlığında plaktaki üreme, (B) FCZ supra- MİK (128µg/ml) içeren plakta pompa inhibitörleri emdirilmiş disklerin varlığında farklı zon oluşumu (ibuprofen: zon yok, tet: zon içi üreme, clorglyline: tam inhibisyon zonu).

İki fenotipik yöntemle elde edilen tüm kökenlere ait sonuçlar Tablo 7’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Tablo 7: İki fenotipik yöntemle tüm kökenlere ait elde edilen sonuçlar

	Köken Adı	Köken Özellik / Klinik Materyal	FCZ MİK	İBU 100µg/ml + FCZ MİK	100µg/disk İBU	Clorgyline 50µg/ml+ FCZ MİK	50µg/disk Clorgyline	TET 40µg/ml + FCZ MİK	40µg/disk TET MİK
REFERANS KÖKENLER	12-99 <i>C.albicans</i>	CDR1,CDR2,MDR,ERG11 aşırı ekspresyonu	64µg/ml	64 µg/ml	ZON YOK	4µg/ml*	ZON VAR*	≥ 256 µg/ml**	ZON YOK
	95-142 <i>C.albicans</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	32 µg/ml	ZON YOK	4µg/ml*	ZON VAR*	32 µg/ml	ZON YOK
	95-190 <i>C.albicans</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	16 µg/ml	16µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK
	DSY-292 <i>C.albicans</i>	ERG11 mut, MDR aşırı eksp.	64µg/ml	64µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON VAR*	64µg/ml	ZON YOK
	DSY-530 <i>C.glabrata</i>	CDR1, ERG11 aşırı ekspresyonu	32µg/ml	32µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK	32µg/ml	ZON YOK
	DSY- 565 <i>C.glabrata</i>	CDR1, ERG11 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	128µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON VAR*	32µg/ml	ZON YOK
	YEM-19 <i>C.glabrata</i>	CDR1,CDR2 aşırı ekspresyonu	128µg/ml	64µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON VAR*	64µg/ml	ZON YOK
	DSY-562 <i>C.glabrata</i>	CDR1, ERG11 aşırı ekspresyonu	8µg/ml	8µg/ml	ZON YOK	8µg/ml	ZON YOK	8µg/ml	ZON YOK
	90028 ATCC <i>C.albicans</i>	Duyarlı köken	2µg/ml	2µg/ml	ZON YOK	2µg/ml	ZON YOK	1µg/ml	ZON YOK
KLİNİK KÖKENLER	CA1	İdrar	512µg/ml	0.5 µg/ml*	ZON YOK	0.5 µg/ml*	ZON VAR*	0.5 µg/ml*	ZON YOK
	CA2	Kalp kapakçığı	512µg/ml	2µg/ml*	ZON YOK	0.5 µg/ml*	ZON VAR*	512 µg/ml	ZON YOK
	CA3	Kan	16µg/ml	16µg/ml	ZON YOK	8 µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK
	CG1	Cilt insizyonu	256µg/ml	128µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON VAR*	128µg/ml	ZON YOK
	CG2	Balgam	64µg/ml	64µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON VAR*	16µg/ml	ZON YOK
	CG3	İdrar	64µg/ml	64µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK	32µg/ml	ZON YOK
	CG4	Kan	64µg/ml	64µg/ml	ZON YOK	8µg/ml*	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK
	CG5	Kan	16µg/ml	8 µg/ml	ZON YOK	8 µg/ml	ZON YOK	8 µg/ml	ZON YOK
	CG6	Kan	16µg/ml	16µg/ml	ZON YOK	4µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK
	CK1	Kan	64µg/ml	32µg/ml	ZON YOK	32µg/ml	ZON YOK	64µg/ml	ZON YOK
CK2	Fistül sürüntüsü	32µg/ml	16µg/ml	ZON YOK	16µg/ml	ZON YOK	32µg/ml	ZON YOK ¹	

* FCZ MİK düşüşü/ zon oluşumu = atım pompa inhibisyonu , **FCZ MİK değerinde artış (indüksiyon ?), İBU: ibuprofen

4.3. Klinik İzolatların 3 Azol için Sıvı Mikrodilüsyon ile Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan FCZ için Di veya DBD değerlerine sahip klinik izolatlarımızın, CLSI M27-A3-S3 dokümanı (Tablo-2) referans alınarak yapılan mikrodilüsyon çalışması sonucunda VOR, İTRA MİK değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Klinik izolatlarda VOR ve İTRA MİK sonuçları

Tür	FCZ MİK	VOR MİK	İTRA MİK
CA1	512µg/ml	1µg/ml	0.03µg/ml
CA2*	512µg/ml	≥ 32µg/ml	≥ 32µg/ml
CA3*	16µg/ml	≥ 32µg/ml	2µg/ml
CG1 *	256µg/ml	4µg/ml	4µg/ml
CG2	64µg/ml	0.5µg/ml	0.5µg/ml
CG3	64µg/ml	0.5µg/ml	0.5µg/ml
CG4 **	64µg/ml	0.25µg/ml	1µg/ml
CG5 **	16µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml
CG6 **	16µg/ml	0.5µg/ml	1µg/ml
CK1	64µg/ml	0.5µg/ml	0.5µg/ml
CK2	32µg/ml	0.25µg/ml	0.5µg/ml

* VOR ve İTRA' ya çapraz direnç gösteren kökenler

** İTRA' ya çapraz direnç gösteren kökenler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Flukonazol, geniş etki spektrumlu ve düşük toksisiteli bir antifungal ilaç olup, yaygın kullanımına bağlı olarak doğal dirençli *C.krusei* ve primer ya da sekonder dirençli *C.glabrata*'ya bağlı enfeksiyon oranlarında artış gözlenmektedir. Ancak diğer türlerde de düşük sıklıkta da olsa bu ilaca karşı MİK değerlerinde yükselme ya da direnç bildirilmektedir (42, 46).

Kandida izolatlarında, azol direncinden sorumlu major mekanizma plazma membranında yer alan efluks (dışa atım) pompalarının aşırı eksprese edilmesi ve bunun sonucunda hücre içi ilaç birikiminin azalmasıdır.

Son 10 yılda kandidalarda dışa atım pompasına bağlı azol direnci ile mücadelede pompa inhibitörü ilaç geliştirip, dirençli maya kökenlerinin mevcut etkili antifungallere tekrar duyarlı hale getirilmesi önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir.

İdeal bir pompa inhibitöründen beklenen, pompa ekspresyonuna bağlı olarak direnç gösteren mantar hücrelerinin normal üremesini inhibe etmeyerek o antifungale karşı duyarlılık düzeyinde MİK düşüşüne yol açmasıdır. Bu pompa substratlarının, insandaki benzer yapılara olumsuz etki göstermemesi onların aynı zamanda klinik kullanımlarına da imkan sağlayacaktır (12).

Bu yaklaşımla beraber son zamanlarda mantarlarda azollere karşı direncin dışa atım pompalarına bağlı olup olmadığını saptamak amacıyla da çeşitli maddelerin bu pompaları inhibe etmelerine ve bu yolla olası pompa varlığını belirlemeye yönelik fenotipik testler az da olsa literatürde yer almaya başlamıştır.

Literatür taramalarında, pompa inhibitörü maddeler kullanılarak atım pompasına bağlı direncin fenotipik olarak araştırıldığı çalışmaların çoğunlukla bakterilerle yapılmış olduğu görülmektedir.

Örneğin, Mesaros ve ark. , yaptıkları geniş kapsamlı bir çalışmada *P.aeruginosa*'da 50mg/l PAßN varlığında norfloksasin, eritromisin, karbenisilin, imipenem ve gentamisin MİK değerlerinde anlamlı düzeyde azalma olduğunu bildirmişlerdir (23).

Çetinkaya ve ark. 42 *P.aeruginosa* klinik izolatında, PAßN varlığında kökenlerin > %90'ında siprofloksasin için MİK değerlerinde ≥ 4 kat, azalma

olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar bulgularına göre bu kökenlerde florokinolon direncinin gelişmesinde başlıca mekanizmanın dışa atım pompasının aşırı ekspresyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir (8).

Ülkemizde ve yabancı literatüre göre *Candida* türlerinde atım pompasına bağlı direncin gösterildiği çalışmaların neredeyse tamamı moleküler ve/veya akım sitometri yöntemleri ile yapılmıştır. Ancak bu testler pahalı ve zor olduğundan, dirençli klinik izolatlarda direncin mekanizmasını araştırmak ve bölge ya da hastane düzeyinde epidemiyolojik veriler elde etmek üzere geliştirilebilecek fenotipik testlerin yararlı olabileceği görüşü yaygınlaşmıştır. Bu görüşe dayanarak çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemini ve literatürde yalnızca 2 çalışmada rastladığımız agar disk difüzyon metodunu fenotipik testler olarak uyguladık.

Yapılan çalışmalarda herhangi bir ilaca karşı direncin atım pompalarına bağlı olduğunu göstermek için, pompa inhibitörünün önerilen sabit miktardaki varlığında kökeni öldürmeyen / üremesini inhibe etmeyen ancak, o ilaca karşı orijinal MİK değerinde duyarlılık düzeyinde düşüşe yol açacak inhibitör konsantrasyonu göz önüne alınmıştır. Dirençli kökenlerin inhibitör madde varlığında duyarlıya dönüşmesi atım pompalarının inhibisyonunun göstergesi olarak kabul edilmiştir (12, 33).

Çalışmamızda bu yaklaşımdan yola çıkarak 3 farklı pompa inhibitörü (ibuprofen, clorgylene ve tetrandrine) özelliğine sahip olduğu ileri sürülen maddeleri kullanarak, iki fenotipik yöntem ile kendi hastanemizdeki dirençli kandida izolatlarında, azol direncinin olası atım pompalarına bağlı olup olmadığını göstermeyi ve bu amaca yönelik en doğru fenotipik yöntemi belirlemeyi ve böylece rutin uygulamaya ve literatüre katkıda bulunmayı hedefledik.

Bu konuda literatürde en fazla çalışma ibuprofen ile yapılmıştır.

Non-steroidal, antiinflamatuar ilaç olarak klinik kullanımda yer alan ibuprofen, son yıllarda yapılan çalışmalarda *C.albicans*' da CDR1 ve CDR2 genlerinin ekspresyonunu inhibe eden pompa inhibitörü olarak önerilmiştir (33).

Çalışmamızda ibuprofenin referans kökenler üzerindeki etkisi mikrodilüsyon metodu ile incelendiğinde; bu maddenin varlığında, FCZ Di 95-142 *C.albicans* kökeninin MİK düzeyi 128'den sadece 32µg/ml'ye düşmüştür. Aynı köken için agar disk difüzyon testinde de inhibisyon zonu oluşmamış olması bu iki yöntem arasında

uyumlu bir sonuç olarak değerlendirilebilir. FCZ Di 12-99 ve DSY-292 referans *C.albicans* kökenlerinde ise bu maddenin varlığında her iki yöntemle de FCZ'nin orijinal etkinliğinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo-3, 5, 7) ; bu durum kökenlerde, CDR dışında diğer mekanizmaların da varlığı ile açıklanabilir. Bu gözlemimiz, Ricardo ve ark. çalışmasındaki, ibuprofenin CDR üzerindeki inhibitör etkisinin diğer direnç genlerinin de aktif olması durumunda anlamsız kaldığı bulgusu ile uyumludur (33).

Çalışmamızda *albicans* dışı diğer FCZ Di referans *Candida* kökenlerini irdelediğimizde, her iki yöntemle de ibuprofenin pompa inhibisyonu olarak kabul edilen düzeyde bir değişime yol açmamış olmasını, bu maddenin literatür ışığında sadece *C.albicans*'da CDR1 ve CDR2 pompalarını bloke edebiliyor olmasıyla açıklamak mümkündür (Tablo-3, 5, 7). Benzer olarak Pina ve ark. , 28 FCZ Di *C.albicans* kökeninin 20 sinin ibuprofen varlığında duyarlı hale dönüştüğünü gözlemlemişler ve bunu kökenlerdeki dışa atım pompalarının inhibisyonu ile açıklamışlardır. Araştırmacılar FCZ Di 5 *C.glabrata* kökeninde ise ibuprofen varlığında MİK değerlerinde değişim saptamamışlardır (32).

Ricardo, E. ve ark. , 2009 yılındaki 62 *C.albicans* (20 FCZ Du, 42 FCZ Di) izolatu ile yapmış oldukları geniş kapsamlı çalışmada, duyarlı kökenlerin ibuprofen varlığında MİK değerlerinin değişmediğini, FCZ Di kökenlerin 40'ının duyarlı hale, 1'inin DBD'ye dönüştüğünü ve diğer kökenin ise dirençli olarak kaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu kökenleri agar difüzyon yöntemiyle, kanıtlanmış bir pompa inhibitörü olan FK506 varlığında tekrar değerlendirmişlerdir. İbuprofen varlığında duyarlılaşan kökenler agar difüzyonda FK506'nın sub-MİK değerlerinde inhibisyon zonu oluşturmuşlardır ve bu iki sonuca göre bu kökenlerde başlangıçtaki direncin dışa atım pompalarına bağlı olduğu öne sürülmüştür. Araştırmacılar bu sonuçları moleküler yöntemler ile doğrulamak üzere, revers transkriptaz PZR ve takiben gerçek zamanlı PZR yöntemlerini kullanmışlardır. İbuprofen ile MİK değişimi gösteren veya göstermeyen dirençli kökenlerde CDR1 ekspresyonu, FCZ'ye karşı baştan duyarlı olan kökenlere göre yüksek bulunmuştur. Bu farklılık özellikle baştan duyarlı ve ibuprofene rağmen dirençli kalanlar arasında anlamlı iken ($P=0,008$); duyarlıya dönüşen ve baştan duyarlı olanlar arasında anlamsız bulunmuştur ($P>0,05$). CDR2 ekspresyonu açısından bakıldığında baştan duyarlı ile

dirençli kalanlar ya da duyarlıya dönüşenler arasında anlamlı farklılıklar vardır. Fakat iki dirençli grup arasında CDR2 açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durumda ibuprofenin CDR1 üzerine inhibitör etkisinin CDR2'ye göre daha güçlü olduğu görüşüne varılmıştır. Bu çalışmaya göre bu inhibitör, dirençli iken duyarlıya dönüşen ya da dönüşmeyen kökenlerde CDR1 ve CDR2 genlerinin eksprese edilmesi açısından anlamlı bir değişiklik yapmamış fakat, muhtemelen özellikle *cdr1p* (pompa) üzerinde blokaj yaparak maya hücrelerini duyarlı hale dönüştürmüştür (33).

İbuprofen, klinik izolatlar üzerindeki etkisi açısından incelendiğinde, sıvı mikrodilüsyon deneylerinde; FCZ'ye yüksek düzeyde dirençli 2 adet *C.albicans* izolatında (CA-1,2) ≥ 4 MİK düşüşüne yol açarak bu kökenleri duyarlı hale getirmiştir. Bu 2 köken için agar disk difüzyon metodunda inhibisyon zon oluşumu gözlenmemiştir. Sıvı mikrodilüsyon sonuçları, bu iki köken için olası bir pompa varlığını düşündürmüş iken agar difüzyon ile uyumsuzluk göstermiştir (Tablo-4, 6, 7).

Yüksek MİK değerlerine sahip klinik *C.glabrata* kökenlerini (CG1, 2, 3, 4, 5, 6) ele aldığımızda, her iki yöntemle de ibuprofenin olası CDR pompa varlığını gösterebilen herhangi bir FCZ MİK düşüşüne yol açmadığı saptanmıştır. Bu durum yukarıda referans kökenlerde de belirtildiği gibi, ibuprofenin yalnızca *C.albicans* CDR genlerinin inhibisyonu ya da *cdr1p* blokajı tarzındaki etkileri ile açıklanabilir (Tablo-4, 6, 7) (33).

FCZ için Di ve DBD özelliklerine sahip iki adet klinik *C.krusei* kökeninde (CK-1,2), bu madde her iki yöntemle de pompa varlığını gösteren bir MİK değişikliğine neden olmamıştır. Bu da *C.krusei* kökenlerinde atım pompaları dışı mekanizmalarla açıklanan intrensek dirençle uyumlu bir bulgudur (Tablo-4, 6, 7) (11).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre ibuprofenin iyi bir CDR inhibitörü olabileceği mikrodilüsyon yöntemi ile gösterilmiştir. Ancak deneylerimiz *C.albicans* (CA-1,2) kökenlerinde dahi, agar difüzyonda beklenenin tam tersi bir sonuç vermiştir. Bu durumu da ibuprofenin agar ortamında iyi difüze olmaması ile açıklayabiliriz. Dolayısıyla ibuprofen literatürle uyumlu olarak sadece FCZ dirençli *C.albicans* kökenlerinde olası pompa varlığının taranması açısından mikrodilüsyon yöntemi ile uygulanabilir bir inhibitör olarak önerilebilir.

Literatürde pompa inhibitörü olarak bildirilmiş olan bir diğer madde ise tetrandrindir.

Tetrandrine (TET) 1950'den beri Çin'de antihipertansif olarak kullanılmakta olan bitkisel bir üründür. İlk kez 1997'de yapılan bir çalışmada MDR eksprese eden tümör hücrelerinde MDR'yi modüle edici bir potansiyele sahip olduğu saptanmıştır. Hayvan deneylerinde tümör hücrelerinde MDR ekspresyonunu inhibe ederek çoklu ilaç direncini geriye dönüştürdüğü, tümörlerde küçülmelere ve hayvanlarda yaşam süresinin uzamasına neden olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TET'in *C.albicans*'da CDR1,CDR2 ve MDR pompalarını inhibe ettiği gösterilmiştir (16).

Literatürde bu madde ile ilgili çalışmalar sadece *C.albicans* ile olup, sınırlı sayıdadır. Bu nedenle öncelikle referans ve klinik *C.albicans* kökenlerimize ait sonuçları değerlendirdik.

Çalışmamızda, sekiz referans köken içinde FCZ dirençli olan 95-142 *C.albicans* kökeninde (128 µg/ml) TET, FCZ MİK değerinde 4 kat düşüşe yol açmıştır; ancak bu düşüş kökenin MİK değerini sadece DBD (32 µg/ml) düzeyine indirmiştir (Tablo-3, 7). Bu sonucu literatür ışığında değerlendirecek olursak, Zhang, H. ve arkadaşlarının 2009 yılındaki çalışmasında, MİK düzeyleri 0.250-64 µg/ml olan 16 adet *C.albicans* kökeninde 30µg/ml TET varlığında FCZ MİK düzeylerinin 0,125-16 µg/ml'ye düştüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada TET varlığında bu kökenlerdeki MDR1, FLU1, CDR1, CDR2 dışı atım pompa genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarının inhibe edildiği gösterilmiştir. MDR ekspresyonunda düşüşü en çok Di kökenlerde saptamışlardır. FLU-1 gen ekspresyonu da hem DBD hem Di kökenlerde TET varlığında önemli düzeyde düşüş göstermiştir. CDR1ve CDR2 genleri ise Du, DBD ve Di kökenlerde hatta MİK düzeyleri aynı olan kökenler arasında bile farklı düzeylerde eksprese edilmekte olup, TET varlığında da düşüşleri farklı düzeylerde olmuştur (47). Çalışmamızda TET'in 40µg/ml sabit konsantrasyonunda yani araştırmacılarınkinden daha yüksek değerde dahi, FCZ direncinin, sadece DBD düzeyine düşmüş olması yukarıdaki çalışma ile uyumluluk göstermektedir; ek olarak agarda da inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Her iki fenotipik yöntemle de bu referans kökenin duyarlı düzeye düşmemiş olması yüksek MİK düzeyinin sadece CDR1, CDR2 ile bağlantılı olması ve bunların

ekspresyonlarının muhtemelen farklı düzeylerde azalması ile ilişkilendirilebilir (Tablo-3, 7).

FCZ dirençli diğer referans köken DSY-292 *C.albicans*'da ise, TET her iki fenotipik yöntemde de FCZ MİK değişime yol açmamıştır. Bu sonuç bu kökende CDR ekspresyonu olmaması ancak mevcut MDR ekspresyonunun yanı sıra ERG11 mutasyonu gibi güçlü bir direnç mekanizmasının da varlığı ile açıklanabilir (Tablo-3,5, 7).

FCZ DBD 95-190 *C.albicans* referans kökenimizde ise herhangi bir MİK düşüşü olmadığı gibi, agarda inhibisyon zonu da meydana gelmemiştir (Tablo-3, 5, 7). Bu sonuç Zhang, H. ve ark. , bulgularına dayanarak, DBD kökenlerde CDR pompa gen ekspresyonunun farklı düzeylerde olmasından dolayı, TET varlığında anlamlı MİK düşüşlerinin gözlemlenmemesi ile açıklanabilir (47).

FCZ Di 12-99 *C.albicans* kökeninde ilginç olarak TET varlığında FCZ için 64µg/ml MİK değeri, ≥ 256 'ya yükselmiştir. Literatürde de rastlamadığımız bu durumu herhangi bir olgu ile açıklayamamaktayız (Tablo-3, 7).

Tetrandrinin klinik *C.albicans* izolatlarımız üzerindeki etkisi incelendiğinde, FCZ DBD olan CA-3 kökeninde MİK düşüşü ve zon oluşumu gözlenmemesi referans kökenler ile uyumluluk olarak değerlendirilmiştir. Benzer olarak 512µg/ml MİK düzeyinde değişiklik oluşturmadığı köken (CA-2) için bu maddenin inhibisyon zonu da oluşturmamış olması muhtemelen kökendeki atım pompası dışı olası mekanizmalar ile özellikle de ERG11 aşırı ekspresyonu ya da mutasyonları ile açıklanabilir. Ancak FCZ için 512µg/ml düzeyinde direnç gösteren CA-1 izolatımızda TET' in 0,5 µg/ml duyarlılık düzeyinde dönüşüme yol açmasına karşın, agar difüzyonda inhibisyon zonu oluşmaması bu köken için beklenmeyen bir sonuçtur. Bu durum TET'in agarda iyi difüze olmaması ile açıklanabilir (Tablo-4, 6, 7).

Çalışmamızda TET'in *C.glabrata* türü üzerindeki etkisi ilk kez incelenmiştir. Bu nedenle referans ve klinik *C.glabrata* kökenlerimiz üzerine bu maddenin etkisini ayrıca değerlendirdik. Referans kökenleri irdelediğimizde; FCZ Di DSY- 565 *C.glabrata* kökeninin TET varlığında MİK değerinde 4 kat ancak DBD düzeyinde bir azalma görülmüştür. Bu da bu kökende CDR1 üzerine inhibitör etkisi olsa da,

ERG11 aşırı ekspresyonun baskın mekanizma olduğunu akla getirmiştir. FCZ Di YEM-19 kökeninde ise anlamlı bir MİK düşüşü gözlenmemiştir (Tablo- 3, 7).

FCZ DBD DSY-530 ve Du DSY-562 *C.glabrata* referans kökenlerinde TET varlığında MİK değişimi ve inhibisyon zonu görülmemesi, referans *C.albicans*' larda öne sürdüğümüz gibi, atım pompalarının düşük ekspresyonu ile ilişkilendirilebilir (Tablo-3, 5, 7).

Klinik *C.glabrata* izolatlarımız üzerinde TET etkisini incelediğimizde ise referans kökenlerle uyumlu olarak, dirençli 3 kökende (CG-2, 3, 4) DBD düzeyinde MİK değişimi gözlenirken, FCZ DBD kökenlerde (CG-5, CG-6) ise anlamlı MİK değişimleri saptanmamıştır. Yüksek düzeyde dirence sahip (256µg/ml) izolatımızda (CG-1) TET'in 1 dilüsyonluk düşüş sağlamasına rağmen köken dirençli olarak kalmıştır. Tüm bu izolatlarda TET' in anlamlı bir etki göstermemesi muhtemelen *C.glabrata* türünde atım pompalarının bazal düzeyde çalışması ya da izolatlarımızda bunların dışında olası direnç mekanizmalarının varlığı ile açıklanabilir (Tablo-4, 7).

Referans ve klinik kökenlerimizin hiç birinde agarda inhibisyon zonu oluşmaması büyük ölçüde (CA-1 klinik kökenimiz dışında) mikrodilüsyon yöntemi ile uyumu yansıtmaktadır. Ancak bu uyum da tetrandrinin ideal bir pompa inhibitörü olmaması kuşkusunu ortadan kaldırmamaktadır (Tablo-5, 6, 7).

TET FCZ Di ve DBD klinik *C.krusei* kökenlerimizde her iki yöntemde de olası pompa varlığını gösterebilecek herhangi bir etki ortaya çıkarmamıştır (Tablo-4, 6, 7).

Çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerden biri de 2012 yılında literatüre girmiş olan clorgyline maddesidir.

Clorgyline, kullanımdan kaldırılmış bir antidepresandır. Bu maddenin kandidalarda dışa atım pompa inhibitörü olduğunu bildiren tek çalışma mevcuttur. Holmes ve ark. , 2012'de yaptıkları bu çalışmaya göre; clorgyline'in *C.albicans* ve *C.glabrata*'da CDR1, CDR2 ve MDR pompa inhibitörü olarak FCZ direncini geriye dönüştürebildiğini göstermişlerdir (12).

Çalışmamızda clorgyline, sıvı mikrodilüsyon deneylerinde, referans kökenlerimizden Di *C.albicans*; 12-99, 95-142, DSY-292 ve *C.glabrata*; DSY-565, YEM-19 kökenlerinde dirençliden duyarlı düzeye düşüşün yanısıra agarda geniş inhibisyon zonlarının oluşumuna yol açmıştır (Tablo 3, 5, 7). Bu sonuç clorgylinin

bu kökenlerimizde CDR1, CDR2 ve MDR ekspresyonu üzerine kuvvetle inhibitör etkili olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bu referans kökenlerde FCZ direncinden major sorumlu mekanizmanın dışa atım pompaları olduğunu ileri sürebiliriz.

Clorgyline, FCZ MİK değerleri DBD düzeyinde olan 95-190 *C.albicans* ve DSY-530 *C.glabrata* kökenleri üzerinde, mikrodilüsyon ve agar difüzyonda pompaların inhibisyonu açısından etkisiz kalmıştır (Tablo-3, 5, 7). Yukarıdaki örneklere benzer olarak bu iki kökende CDR1 ve CDR2 pompalarının yüksek düzeyde eksprese olmaması ve bu nedenle clorgylinden ekspresyon düzeyinde etkilenmemeleri söz konusu olabilir.

Clorgyline için klinik kökenleri incelediğimizde; FCZ Di CA-1, CA-2 ve CG-1, 2, 4 kökenlerinde MİK değerlerinde duyarlılık düzeyinde ≥ 4 kat düşüş ve CG4 kökeni hariç, diğer izolatlar için paralel olarak agar difüzyonda da geniş inhibisyon zonu gözlenmiş olup bu izolatlarda FCZ direncinin olası atım pompaları ile bağlantılı olduğunu öne sürebiliriz. DBD *C.albicans* (CA-3) ve DBD *C.glabrata* (CG-5,6) izolatlarında duyarlılık sınırında da olsa sadece 1 dilüsyon düşüş görülmüştür; bu kökenlerde büyük olasılıkla dışa atım pompalarının yüksek düzeyde aktif olmadığını dolayısıyla clorgylinin de anlamlı bir etki göstermediğini ileri sürebiliriz. Di CG3 kökeninde ise DBD düzeyinde MİK düşüşü gözlenmiştir. Agarda inhibisyon zonu oluşmaması da bu kökenler açısından mikrodilüsyonla uyumlu bir sonuçtur (Tablo-4, 6, 7). Bulgularımıza göre gerek referans gerekse klinik kökenlerimizde clorgylinin sadece yüksek düzeyde eksprese olan atım pompaları için iyi bir inhibitör olduğu görülmektedir. Bu da Holmes ve ark. , çalışması ile uyumludur (12).

FCZ Di CK-1 ve DBD CK-2 klinik kökenlerinin FCZ MİK değerlerinde clorgyline varlığında anlamlı bir değişiklik gözlenmediği gibi bu sonuçla uyumlu olarak agarda da inhibisyon zonu saptanmamıştır (Tablo-4, 6, 7). Dolayısıyla bu iki kökende direnç, diğer pompa inhibitörleri ile elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olarak, pompa dışı mekanizmalarla ilişkilendirilebilir.

Literatürde clorgylinin kandidalarda pompa inhibitörü olduğunu gösteren tek çalışma, 2012'de Holmes ve ark., (12) tarafından yayınlanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada sadece CDR ve MDR eksprese eden FCZ dirençli *C.albicans* ve *C.glabrata* kökenlerinin bu antifungale karşı clorgyline varlığında duyarlı hale dönüştüklerini agar disk difüzyon yöntemiyle göstermişler ve bu bulgularını sıvı

mikrodilüsyon ve akım sitometri ile de doğrulamışlardır. Fakat hem *C.krusei* kökenlerinde hem de bu kökenlerin dışa atım pompa genleri ile elde ettikleri rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* kökenlerinde bu maddenin CDR ve MDR pompalarında etkili olmadığını göstermişler ve *C.krusei* kökenlerinde direncin pompa dışı mekanizmalara bağlı olduğunu birkez daha kanıtlamışlardır. Çalışmamızda referans ve klinik kökenlerimizle elde ettiğimiz sonuçlar hem uyguladığımız yöntemler arasında hem de Holmes ve ark., bulguları ile yüksek uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda negatif kontrol olarak kullandığımız FCZ Du DSY-562 *C.glabrata* ve *C.albicans* ATCC 90028 kökenlerimiz ile ilgili sonuçlara göre 3 pompa inhibitörünün işlerliği açısından her iki yöntemle de uyumlu ve beklenen sonuçlar elde edilmiştir (Tablo-3, 5, 7).

Son 10 yıl içinde, immünokompromize hastalarda *C.glabrata*'ya bağlı kandidemilerde artış vardır. Ancak, bu hastaların çoğunda önceden azol grubu ilaçlarla karşılaşma söz konusudur. Flukonazole in vitro DBD ya da direnç gösteren izolatlarda, VOR'e karşı da çapraz direnç bildirilmiştir. Bu hasta gruplarındaki kolonizan kökenlerle yapılan çalışmalarda da, FCZ veya VOR ya da İTRA'ya maruz kalındığında her üç ilaca karşı MİK değerlerinde artış gözlenmiştir; yani bir çapraz direnç gelişimi söz konusudur. CLSI'a dayalı duyarlılık testlerinde FCZ duyarlı olan kökenlerin VOR'e de duyarlı oldukları; ancak FCZ MİK değeri ≥ 64 olan izolatların ise VOR'e de dirençli oldukları belirlenmiştir. Bundan yola çıkarak özellikle *C.glabrata* için başlangıçta saptanan FCZ direncinin VOR direnci için bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür (29, 31).

Ancak çalışmamızda FCZ Di 3 adet *C.glabrata* izolatından ikisi (CG2,CG3) VOR ve İTRA'ya karşı duyarlı olarak saptanmıştır; diğeri ise (CG-4) VOR'e duyarlı, İTRA'ya dirençli bulunmuştur. FCZ için DBD olan CG-5, CG-6 ise CG-4'e benzer olarak VOR'e karşı duyarlı çıkarken, İTRA'ya karşı dirençli saptanmıştır. Örnek sayısı az olmakla birlikte bu sonuçlar hastanemizdeki *C.glabrata* izolatlarında henüz VOR açısından bir direnç tehlikesinin bulunmadığını göstermektedir. FCZ Di ve DBD olan CK-1 ve CK-2 izolatlarımız ise diğer iki azole karşı duyarlı olarak saptanmıştır. Literatürde de FCZ dirençli *C.krusei* kökenlerinde diğer azollere karşı çapraz direnç olmadığı bildirilmiştir (11) (Tablo-8).

Çalışmamızda dikkat çekici bir bulgu olarak; biri FCZ Di (2008 izolatu) diğeri ise FCZ DBD (2012 izolatu) olan 2 adet *C.albicans* kökeni (CA-2 ve CA-3) diğeri iki azole de dirençli bulunmuş ve bu kökenler çapraz dirençli olarak değerlendirilmiştir (Tablo-8). 2001-2005 arasında yapılan geniş kapsamlı bir çalışmaya göre *C.albicans*'da her 3 ilaca direnç oranı yalnızca % 0,2'dir (44).

Literatürde, atım pompalarına bağlı FCZ direnci gösteren *Candida* kökenlerinde, diğeri azollere de çapraz direnç gelişebileceği bildirilmiştir (9). Bunlarla uyumlu olarak çalışmamızda olası bir pompa varlığını ileri sürdüğümüz CA-2 ve CG-1 kökenlerinde hem İTRA hem VOR çapraz dirençleri görülürken; CG-4, CG-5,CG-6 kökenlerinde ise sadece İTRA'ya çapraz direnç görülmüştür (Tablo-8).

Köken sayısı az olmakla birlikte azollere çoklu direnç saptadığımız tüm kökenler invazif enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmış olup, bu durum hastanemizde risk altındaki hastalardan izole edilen kolonizan kökenlerde de hem çapraz direnç hem de olası dışa atım pompalarının varlığı açısından taramaların yapılması gerekliliğini düşündürmüştür.

SONUÇ

FCZ'ye direncin dışa atım pompalarına bağlı olduğunu göstermek amacıyla kullanılabilir ideal bir pompa inhibitörü, söz konusu antifungale karşı dirençli maya hücrelerini tekrar duyarlı hale getirebilmelidir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki uyuma ve FCZ Di referans ve klinik kökenler üzerindeki güçlü etkinliğine dayanarak clorgylinin ideal bir atım pompası tarama inhibitörü olarak kullanılabilirliğini öngörmekteyiz.

Uyguladığımız iki fenotipik yöntemi karşılaştırdığımızda, 3 pompa inhibitörü ile de CLSI'ya dayalı sıvı mikrodilüsyon yöntemi, pompa taramaları açısından agar difüzyon yöntemine göre daha üstün bulunmuştur.

Literatüre katkıda bulunabilecek verilerimizin doğrultusunda rutin laboratuvarlara yönelik önermelerin yapılabilmesi için, sonuçlarımızın daha fazla kökenle ve RT-PZR gibi moleküler yöntemlerle de doğrulanması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. A.T. Coste, J. Crittin, C. Bauser, B. Rohde, and D. Sanglard, "Functional analysis of cis-and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. Eukaryotic Cell. 2009; 8: 1250–1267.
2. Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC endpoint determination and evaluation of a sterol quantitation method for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 2477–2481.
3. Cannon D, Lamping E, Holmes A, et all. Efflux- mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rew. 2009; 22: 291-321.
4. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI commercial methods. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009; 7: 107-119.
5. Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis. 2002; 2: 550-556.
6. 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.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standart- Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2008.
8. Çetinkaya E, Yılmaz A, Durupınar B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında dışa atım pompa inhibitörlerinin siprofloksasin MİK değerleri üzerine etkilerinin araştırılması, Mikrobiyol Bült 2008; 42: 553-561.
9. Doluca, M. *Candida* ve azol direnci mekanizmaları. 7. Ulusal moleküler ve tanısal mikrobiyoloji kongresi bildiri özeti kitabı. 2012; 87-94.

10. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2012; 11:1289- 1299.
11. Guinea J, Sanchez-Somolinos O, Cuevas T, Pelaez B. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. *Med Mycol*. 2006; 44:575-578.
12. Holmes AR, Keniya MV, Ivnitski-Steele I, Monk BC, Lamping E, Sklar L A, Cannon RD. The monoamine oxidase A inhibitor clorgyline is a broad-spectrum inhibitor of fungal ABC and MFS transporter efflux pump activities which reverses the azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 56:1508.
13. Holmes AR, Y H Lin, K Niimi, et al. ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:3851–3862.
14. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, Cassaing S. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2107– 2110.
15. İnci R, Hilmioğlu S. Nozokomiyal fungal enfeksiyonlara yaklaşım. *Klimik Dergisi*. 2000; 13: 28- 31.
16. Jin J, Wang FP, Wei H, Liu G. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005; 55: 179-188.
17. Johnson EM, Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility Test Methods: Yeast and Filamentous Fungi. In: Carroll KC, Funke G, Jorgensen JM, Landry ML, Warnock DW eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2011, p: 2020-2037.
18. Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Infect*. 2007; 54: 504-8.
19. Koç NA. Tıbbi bakımdan önemli olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. İçinde: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, editörler. *Candida*

- Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları No:43. Eskisehir: Oğü Basımevi; 2002, s.47-54.
20. Kupfahl C, Ruppert T, Dietz A, Geginat G, Hof H. *Candida* species fail to produce the immunosuppressive secondary metabolite gliotoxin in vitro. *FEMS Yeast Res.* 2007; 7: 986-992.
 21. Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:354 –369.
 22. M de Micheli, J Bille, C Schueller, D Sanglard. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Molecular Microbiology.* 2002; 43: 1197–1214.
 23. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, et al. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 378-86.
 24. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegeville M, Le Pape P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67: 2131-2138.
 25. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587: 240–248.
 26. Murray PR, Rosenthal KS and Pfaller MA. *Medical Microbiology*. Section 6. 7th Ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2013: 605-711.
 27. N Gaur, R Manoharlal, P Saini, et al. Expression of the CDR1 efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332: 206–214.
 28. N Kamani, N Akhtar Gaur, S Jha, et al. SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene I (CDRI) promoter. *Yeast.* 2004; 21: 219–239.

29. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2006; 44: 1740-1743.
30. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Update. 2010;13:180-95.
31. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida spp.* tested by Clinical and Laboratory Standards Institute recommended broth microdilution methods. J Clin Microbiol. 2007; 45: 70-75.
32. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mardh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. J Antimicrob Chemoth. 2005; 56: 678–685.
33. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina Vaz C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. FEMS Yeast Res. 2009; 9 : 618-25.
34. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrob Chemother. 2005; 56 (Suppl 1): 5-11.
35. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 668–679.
36. Segal E, Elad D. Candididiasis. In: Merz WG, Hay RJ (eds). Medical Mycology. 10th Edition. 2005
37. Segal E. *Candida* still number one - what do we know and where are we going from there?. Mycoses. 2005; 48: 3-11.

38. Shui-xiu L, Chao-hong L, Zhang H, Zhang X, Song Y. Chinese Journal of Zoonoses. 2011; Issue 11, 953-957.
39. T. Rustad, D A Stevens, M A Pfaller, T C White. Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. Microbiology. 2002;148: 1061– 1072.
40. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. İçinde : Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.1. baskı İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2002, s:1797- 1808.
41. Tümbay E. *Candida* türleri. İçinde: Ustaçelebi Ş(editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi: 1999, s:1081-1086.
42. Ülger Toprak N, Erdoğan S, Çelik C, Johansson C. Kan kültürlerinden soyutlanan candida suşlarının amfoterisin b ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003; 33: 252-256.
43. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int J Microbiol. 2011; 2012: doi: 10.1155/2012/713687.
44. Yamaguchi H , Uchida K ,Nishiyama Y, and the Japan Antifungal Surveillance Program Group. Species distribution and in vitro susceptibility to three antifungal triazoles of clinical *Candida* isolates from a five-year nation-wide survey in Japan. Med Mycol Res. 2012;3:17-26.
45. Yeğenoğlu Y. Antifungal direnci gösteren mantarlar. ANKEM Derg. 2012;26:(EK2): 254-260.
46. Yenişehirli G, Bulut Y, Günday E. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* suşlarında antifungallere duyarlılık. ANKEM Derg. 2007; 21:146-149.
47. Zhang H, Gao A, Li F, Zhang G, Ho HI, Liao W. Mechanism of action of tetrandrine, a natural inhibitor of *Candida albicans* drug efflux pumps. Yakugaku Zasshi. 2009; 129:623-630.

EKLER

EK-1



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Flukonazole Dirençli ve Doza Bağımlı Duyarlı Kandida İzolatlarında Olası Dışa Atım Pompalarının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Meltem KAYA
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 16.11.2012-7

Sayın Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU

.131 protokol nolu "Flukonazole Dirençli ve Doza Bağımlı Duyarlı Kandida İzolatlarında Olası Dışa Atım Pompalarının Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması" isimli projeniz Enstitümüzün Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Doç. Dr. Serap ŞİRVANCI
Komisyon Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Doç. Dr. Levent KABASAKAL

Prof. Dr. Aysel PEHLIVAN

Doç. Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Doç. Dr. Asım CİNGİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Doç. Dr. Pınar AY

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

Öğr. Gör. Dr. Volga GÜVEN



Marmara Üniversitesi Göztepe
Kampüsü Sağlık Bilimleri
Enstitüsü 34688 Kadıköy /
İSTANBUL

0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23

saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
<http://saglik.marmara.edu.tr>

Ayrıntılı bilgi için:

Ek 2. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Meltem	Soyadı	Kaya
Doğum Yeri	Beyoğlu	Doğum Tarihi	24.03.1990
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	
E-mail	meltemkaya90@hotmail.com	Tel	0537-560-95-547

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Inst./ Klinik Mikrobiyoloji	2014
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Ümraniye Mehmetçik Lisesi(Yabancı dil ağırlıklı lise)	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	Marmara Üni. Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.	2014-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	62.25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office programları	Çok iyi

Ulusal ve Uluslar arası Bildiriler

1. **M. KAYA**, N.ÇERİKÇİOĞLU, Flukonazole Dirençli ve Doza Bağımlı Duyarlı Kandida İzolatlarında Olası Dışa Atım Pompalarının Fenotipik Yöntemle Araştırılması, 2.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, S.195, SS09, 2013,Antalya.
2. **G. ALTINKANAT GELMEZ**¹, **A. KARAASLAN**²,**S. OZSOY**¹, **M. KAYA**¹, **E. KEPENEKLİ**², **A. SOYSAL**², **M. BAKIR**², **G. Soyletir**¹, Screening of Rectal Swabs for Carbapenem Resistant Microorganisms: Evaluation of Different Screening Methods, 24th ESCMID congre, P 1182, 2014, Barcelona.