



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**EKİNOKANDİN SINIFI ANTİFUNGAL İLAÇLAR İLE
KARŞILAŞTIRILMIŞ MUTANT *CANDIDA*
KÖKENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

NURNEHİR BALTACI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2019



**EKİNOKANDİN SINIFI ANTİFUNGAL İLAÇLAR İLE KARŞILAŞTIRILMIŞ
MUTANT *CANDIDA* KÖKENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Nurnehir BALTACI

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2019

Nurahir BALTACI tarafından hazırlanan “EKİNOKANDİN SINIFI ANTİFUNGAL İLAÇLAR İLE KARŞILAŞTIRILMIŞ MUTANT *CANDIDA* KÖKENLERİNİN KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Işıl FİDAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. A. Esin AKTAŞ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Ebru EVREN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez savunma tarihi:10/01/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA TEZİ olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

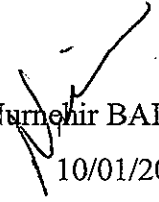
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi bir durum aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Nurettin BALTACI
10/01/2019

EKİNOKANDİN SINIFI ANTİFUNGAL İLAÇLAR İLE KARŞILAŞTIRILMIŞ MUTANT *CANDIDA* KÖKENLERİNİN KARAKTERİZASYONU

(Doktora Tezi)

Nurahir BALTACI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2019

ÖZET

Antifungal ilaçlar üzerine yapılan çalışmalar, antifungallere karşı hızla gelişen bir direncin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle sınırlı sayıda bulunan antifungal ilaca karşı direnç gelişiminin takibi ve mekanizmalarının anlaşılması önem arz etmektedir. Direnç ile virülans ilişkisinin ortaya çıkarılması tedavi takibi ve hastalığın patogenezi açısından önemlidir. Ekinokandin sınıfı antifungaller kandidemi tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak gelişmekte olan ekinokandin direnci sorun oluşturmaya başlamıştır. Dirençli kökenlerde yapılan araştırmalarda *FKS* gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonlar sonucu ekinokandin direncinin geliştiği anlaşılmıştır. Çalışmamızda kaspofungin ile karşılaşmamış referans *Candida* kökenleri (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC MYA 2950) kaspofungine maruz bırakılarak dirençli hale getirilmiştir. Direnç gelişimi ile virülans özellikleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Mini deney hayvanı modeli olan *Galleria mellonella* (mum güvesi) üzerinde *in vivo* virülans araştırılması yapılmıştır. Mutant yapılarak direnç kazandırılan kökenlerin virülans özelliklerinde önemli bir değişiklik meydana gelmediği gözlemlenmiştir.

Birim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : *FKS* , *Candida* sp., Kaspofungin, Virülans, *Galleria mellonella*

Sayfa Adedi :110

Danışman : Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

CHARACTERIZATION OF RESISTANT MUTANTS OF CANDIDA STRAINS
EXPOSED TO ECHINOCANDIN ANTIFUNGALS

(Ph.D. Thesis)

Nurnehir BALTACI

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2019

ABSTRACT

Research data on antifungal drugs revealed that the problem of resistance was raising. Thus, it is important to follow up this resistance problem and to investigate the mechanisms. Demonstration of the possible relationship between drug resistance and the virulence is worth of working. Echinocandins are widely used to treat candidemia. However, antifungal resistance is causing problems in the treatment. During or after the treatment *Candida* strains are gaining resistance. Therefore, it is clear that echinocandin resistance depends on this exposure. *FKS* gene mutations were detected on the genomes of the resistant *Candida* strains exposed to echinocandins. In our study, the reference *Candida* strains (*Candida albicans* ATCC 10231, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC MYA 2950) not encountered with caspofungin were exposed to caspofungin and rendered resistant. The relationship between resistance development and virulence properties was investigated mini experimental animal model of *Galleria mellonella* (wax moth) was conducted to investigate the in vivo virulence. No significant difference was found in virulence properties of resistant mutants.

Science Code : 1039

KeyWords : *FKS* , *Candida* sp., Caspofungin, Virulence, *Galleria mellonella*

Page Number : 110

Advisor : Prof. Dr. Ayse KALKANCI

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, çalışmalarımın yönlendirilmesini ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen, akademik hayatım boyunca akademik duruşunu, bilimsel bakış açısını ve anneliğini kendime örnek alacağım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya,

Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın seçkin ve değerli öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Tez çalışmam sırasında benden desteğini esirgemeyen bütün asistan, yüksek lisans, doktora öğrencileri ve laboratuvar çalışanlarına,

Doktora eğitimim süresince benden ilgi ve desteğini esirgemeyen başta Yüksek İhtisas Üniversitesi Rektörü sayın Prof. Dr. Rabet GÖZİL'e, Yüksek İhtisas Üniversitesi Mütevelli Heyetine, Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ve çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Çiğdem ÇİÇEK, Öğr. Gör. Veysel BASKIN ve Öğr. Gör. Kağan AĞAN'a,

Bu tez çalışması SBAG 216S888 numaralı proje kapsamında gerçekleştirildiğinden dolayı TÜBİTAK'a,

Tez çalışmamı BAP 01/2017-05 kodlu proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi'ne,

Hayatım boyunca sevgi ve hoşgörülerini esirgemeyen, her ne olursa olsun hep yanımda olan, beni bugünlere getiren canım aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Candida</i> Türlerinin Virülans Özellikleri	4
2.1.1. Adezyon.....	4
2.1.2. Dimorfizm	4
2.1.3. Fenotipik değişim	5
2.1.4. Hidrolitik enzimler	6
2.1.5. Biyofilm (Slime) oluşturma	7
2.2. Epidemiyoloji.....	8
2.3. Klinik Bakımdan Önemi Olan <i>Candida</i> Türleri	9
2.3.1. <i>Candida albicans</i>	10
2.3.2. <i>Candida tropicalis</i>	13
2.2.3. <i>Candida parapsilosis</i>	14
2.3.4. <i>Candida glabrata</i>	14
2.3.5. <i>Candida dubliniensis</i>	15
2.3.6. <i>Candida kefyr</i>	16

	Sayfa
2.3.7. <i>Candida krusei</i>	16
2.3.8. <i>Candida guilliermondii</i>	16
2.3.9. <i>Candida lusitaniae</i>	17
2.3.10. <i>Candida auris</i>	17
2.4. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarında Kullanılan Antifungaller.....	17
2.4.1. Alilamin sınıfı antifungaller.....	19
2.4.2. Antimetabolit sınıfı antifungaller.....	19
2.4.3. Azol sınıfı antifungaller.....	19
2.4.3. Ekinokandin sınıfı antifungaller.....	20
2.4.4. Poliyen sınıfı antifungaller.....	21
2.5. Antifungal Direnç Mekanizması	22
2.5.1. Ekinokandin sınıfı antifungallerin direnç mekanizması.....	24
2.6. Mutasyonlar.....	25
2.7. <i>Galleria mellonella</i> (Mum Güvesi).....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	29
3.2.1. Sabouraud dekstrozu agar'ın (SDA) hazırlanışı.....	29
3.2.2. Kaspofungin içeren SDA hazırlanışı	29
3.2.3. Sığır serum albumin agar (SSAA) besiyeri (proteinaz besiyeri)	30
3.2.4. Yumurta sarılı agar (YSA) besiyeri (fosfolipaz besiyeri).....	30
3.2.5. Tween 80 agar besiyeri (esteraz besiyeri).....	31
3.2.6. Koyun kanlı agar besiyeri (hemoliz besiyeri).....	31
3.3. Referans Kökenlerinin Kaspofungin için MİK Değerlerinin Elde Edilmesi	31
3.4. Mutant Kökenlerin Elde Edilmesi.....	33
3.5. Mutant Kökenlerinin Kaspofungin MİK Değerlerinin Elde Edilmesi	33

Sayfa

3.6. DNA İzolasyonu	34
3.6.1. DNA izolasyon protokolü	34
3.7. Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	34
3.8. DNA Dizi Analizi.....	35
3.8.1. Saflaştırma protokolü.....	35
3.8.2. Dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyonu	36
3.9. Mutasyon Analizinin Yapılması.....	37
3.10. Virülans Deneyleri	40
3.10.1. Adezyon deneyi.....	40
3.10.2. Biyofilm (Slaym) deneyi.....	40
3.10.3. Hemolitik aktivite deneyi.....	41
3.10.4 Salgısal aspartil proteinaz (SAP) deneyi.....	41
3.10.5. Fosfolipaz deneyi	42
3.10.6. Esteraz deneyi.....	42
3.10.7. Galleria mellonella in vivo virülans deneyi.....	42
3.11. İstatistik Analizi.....	46
4. BULGULAR	47
4.1. Mutant Kökenlerin Elde Edilmesi.....	47
4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları	50
4.3. DNA Dizi Analizi İzolasyonu ve Nükleik Asit Ölçümü Sonuçları	52
4.4. Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....	53
4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	55
4.6. Virülans Deneylerinin Sonuçları	65
4.6.1. Adezyon deneyi sonuçları	65
4.6.2. Biyofilm (Slaym) deneyi sonuçları	66
4.6.3. Hemolitik aktivite deney sonuçları	67

	Sayfa
4.6.4. Salgısal aspartil proteinaz (SAP) deneyi sonuçları	68
4.6.5. Fosfolipaz deneyi sonuçları	71
4.6.6. Esteraz deneyi sonuçları	72
4.6.7. <i>Galleria mellonella</i> in vivo virölans deneyi sonuçları.....	74
4.7. İstatiksel Analiz Sonucu	79
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ	95
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>C.albicans</i> 'ın virülans özellikleri	12
Çizelge 2.2. <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. glabrata</i> türlerinin morfolojik karakterleri.....	15
Çizelge 2.3. Kullanımda olan sistematik ve topikal antifungal ilaçlar	18
Çizelge 2.4. <i>Candida</i> türlerinin antifungallere karşı duyarlılık ve dirençlilik durumlar	23
Çizelge 3.1. <i>Candida</i> kökenlerinin antifungal duyarlılığını değerlendirmede kullanılan CLSI standartları.....	32
Çizelge 3.2. Gradient PZR reaksiyon karışımı (1X için)	35
Çizelge 3.3. Dizi analizi için “cycle sekans” PZR reaksiyon karışımı (1X için).....	36
Çizelge 3.4. <i>FKS</i> gen bölgelerinin “cycle sekans” için amplifikasyon reaksiyon şartları .	37
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan hedef primer dizileri	39
Çizelge 3.6. Salgisal aspartil proteinaz (SAP) aktivitesi değerlendirme şeması	42
Çizelge 3.7. <i>G. mellonella</i> larvalarının gelişiminde kullanılan besiyeri içeriği (100 g için)	43
Çizelge 4.1. Kaspofungin maruziyeti sonrası elde edilen dirençli kökenlerin ürediği konsantrasyon	47
Çizelge 4.2. Referans kökenler ve kaspofungine maruz bırakılan kökenlerin MİK sonuçları	51
Çizelge 4.3. Kökenlerden elde edilen DNA miktarları	52
Çizelge 4.4. <i>C. albicans</i> ATCC 10231 blast analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.5. <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 blast analizi sonuçları	60
Çizelge 4.6. <i>C. parapsilosis</i> mutant blast analizi sonuçları.....	61
Çizelge 4.7. <i>C. glabrata</i> ATCC MYA 2950 blast analizi sonucu	63
Çizelge 4.8. <i>C. glabrata</i> mutant blast analiz sonuçları.....	64
Çizelge 4.9. Referans kökenlerin ve kaspofungine maruz kalan dirençli kökenlerin virülans özellikleri	73

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. <i>Candida</i> ATCC ve dirençli kökenler ile oluşturulan enfeksiyon modeli, deney saatlerine göre canlı kalan larva sayısı, mortalite oranları ve mortalite ortalamaları.....	75
Çizelge 4.11. <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ve <i>C. albicans</i> mutant kökenler ile enfekte edilmiş <i>G. mellonella</i> larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu	79
Çizelge 4.12. <i>Candida glabrata</i> ATCC MYA 2950 ve <i>Candida glabrata</i> mutant kökenler ile enfekte edilmiş <i>G. mellonella</i> larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu.....	80
Çizelge 4.13. <i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 2950 ve <i>Candida parapsilosis</i> mutant kökenler ile enfekte edilmiş <i>G. mellonella</i> larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu	80
Çizelge 4.14. <i>Candida</i> referans kökenleri ve kaspofungine maruz bırakılan kökenlerinin <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> özellikleri özet tablo	81

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Galleria mellonella</i> yaşam döngüsü [94].....	28
Şekil 4.1. <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ve <i>C.albicans</i> mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri.....	76
Şekil 4.2. <i>C. glabrata</i> ATCC MYA 2950 ve <i>C.glabrata</i> mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri.....	77
Şekil 4.3. <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 ve <i>C.parapsilosis</i> mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri.....	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2. 1. <i>Candida albicans</i> 'ın üç ayrı (beyaz-gri-opak) fenotipi	6
Resim 2. 2. Germ tüp görüntüsü	11
Resim 2.3. Cornmeal Tween 80 Besiyerinde <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> ve <i>Candida tropicalis</i> 'in makroskopik olarak kolonilerinin görüntüsü ve mikroskopik yapıları	13
Resim 2.4. Çeşitli <i>Candida</i> türlerinde <i>FKS</i> gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar	25
Resim 3.1. NCBI nükleotit blast sorgulama motoru.....	38
Resim 3.2. Hazırlanmış besiyeri ve <i>G. mellonella</i> larvalarının bulunduğu kavanoz...	44
Resim 3.3. <i>G. mellonella</i> larvalarının etüvde gelişimi	44
Resim 3.4. Ppd enjektörü kullanılarak sol arka bacak içine <i>Candida</i> kökenlerinin enjekte edilmesi.....	45
Resim 4.1. Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli yapılan <i>C. albicans</i> kökeni	48
Resim 4.2. Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli yapılan <i>C. glabrata</i> kökeni	48
Resim 4.3. Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli yapılan <i>C. parapsilosis</i> kökeni ...	48
Resim 4.4. <i>C. albicans</i> 'ın kaspofungin içeren SDA besiyerinde dirençli hale gelmesi	49
Resim 4.5. <i>C. glabrata</i> mutant kökene ait DNA analizinin NanoDrop analiz ekran görüntüsü	53
Resim 4.6. <i>Candida</i> universal <i>FKS1 HS1</i> primeri için yapılan gradient PZR elektroforez sonucu.....	54
Resim 4.7. Epitel hücrelerine tutunan <i>C. glabrata</i> mutant köken maya hücreleri	65
Resim 4.8. Biyofilm pozitif <i>C. parapsilosis</i> mutant ve biyofilm negatif <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	66
Resim 4.9. Biyofilm negatif <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ve <i>C. albicans</i> mutant.....	66
Resim 4.10. α -hemolitik <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 ve <i>C. parapsilosis</i> mutant kökenler ve kontrol grupları	67
Resim 4.11. SAP aktivitesi sonuçları.....	69
Resim 4.12. <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (+) SAP aktivitesi	70

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Fosfolipaz pozitif <i>C.albicans</i> ATCC 10231, fosfolipaz negatif <i>C. albicans</i> mutant.....	71
Resim 4.14. Esteraz pozitif <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72
Resim 4.15. Esteraz pozitif <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	72
Resim 4.16. Referans kökenler ile kaspofungine maruz bırakılan dirençli kökenlerin <i>G. mellonella</i> larvalarında virülans özelliklerinin gösterilmesi.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
L	Litre
g	Gram

Kısaltmalar	Açıklamalar
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Atmosferik Basınç
CFU/ml	Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)/Mililitre
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FDA	Food and Drug Administration
FKS	1,3-beta-Glucan Synthase Proteini Regülasyon Geni
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	Sabouraud Dekstroz Broth
SPSS	Statistical Progame for the Social Sciences

1. GİRİŞ

Candida türlerine bağlı gelişen invaziv fungal enfeksiyonlar özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar arasında morbidite ve mortalite nedenidir. Bu hastaların tedavisinde kullanılan antifungaller kritik öneme sahiptir. Ancak, invaziv mantar hastalıklarını tedavi etmek için sadece birkaç ilaç sınıfı mevcuttur ve bu problem antifungal direncinin ortaya çıkması ile daha da artmaktadır. Kandidoz tedavisinde ekinokandin grubu ilaçlar tercih edilmektedir. Ekinokandin sınıfı antifungaller mantar hücre duvarındaki β -1,3- glukan sentaz enzimini hedef alarak etki etmektedirler. Ekinokandin sınıfı antifungallere direnç gelişirken, glukan sentaz enzimini kodlayan *FKS* geni alt birimlerinin “hot spot” bölgelerinde oluşan *FKS* geni mutasyonları, glukan sentaz enziminde aminoasit değişiklikleri meydana getirmekte, bu da enzimin ilaca olan duyarlılığını azaltmaktadır. Ekinokandin direncini destekleyen klinik faktörler arasında ampirik tedavi, profilaksi ve intraabdominal enfeksiyonlar yer almaktadır [1]. Ekinokandin direnci ile bu kökenlerin oluşturduğu hastalıkların patogenezi ve kökenlerin virülans özellikleri arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu konuda yapılmış çalışma sayısı kısıtlıdır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı;

- *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata* duyarlı referans kökenlerinin artan konsantrasyonlarda kaspofungin ile karşılaştırılarak kaspofungine dirençli mutantlar haline getirilmesi,
- Kaspofungine maruz bırakılarak direnç kazanan kökenlerin fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi,
- Kaspofungin maruziyetine bağlı olarak direnç kazanan kökenlerinin *in vitro* ve *in vivo* virülans özelliklerinin ortaya çıkarılması,
- Direnç ile virülans arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Taksonomik olarak *Candida* cinsi *Ascomycetes* içinde *Saccharomycetales* takımında yer almaktadır. *Candida* cinsi yaklaşık 200 türden oluşmaktadır [2]. *Candida* türleri deri ve mukozalarda, gastrointestinal sistemde ve vajende normal flora üyeleridir [3].

Candida türleri 4-6 µm boyutunda, küçük, ince duvarlı, hareketsiz, 20-40°C'de ve pH 2-8 arasında üreyebilen ökaryotik fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. Hücre duvarları hücre zarını dışardan saran ve 100-200 nm kalınlığında bir yapıdır. Hücre duvarını % 80-90 oranında karbonhidrat, % 10-20 oranında protein ve glikoprotein oluşturmaktadır. Galaktomannan, kitin, glukon ve mannan polisakkaritleri hücre duvarı karbonhidratlarını oluşturmaktadır [4].

Eşeyli olarak tomurcuklanma (blastokonidyum) ve eşeyli olarak askosporlar ile çoğalırlar. Sabouraud dekstrozu agar'da (SDA) 24-48 saat arasında kirli beyaz veya krem renkli, opak, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapında, S tipi koloniler oluşturur. Hücre sitoplazmasında, nükleus, mitokondri, golgi aygıtı, 80S ribozom, protein, yağ, karbohidrat vezikülleri ve olgun hücrelerde vakuoller bulunur. Hücre membranında otoenzimler, kitin sentaz gibi duvar komponentlerinin sentezinde rol alan enzimler ile *C.albicans*'ın morfogenezi için gereken sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz ve proteaz gibi enzimler bulunur. Membran lipidlerinin % 20'si steroldür. Bu sterollerin % 95'i antifungal ilaçların en önemli hedefi olan ergosterol formundadır[5].

Maya hücreleri gerçek veya yalancı hif oluşturabilirler ve tomurcuklanarak çoğalırlar. Tomurcuklanarak meydana gelen yavru hücre, ana hücrenin aynısıdır. Ancak ana hücreden tomurcuklanan hücre, bazen ana hücreden ayrılmaz. Ayrılmayı başaramayan hücre tomurcukları yalancı hif (psödohif) şeklinde zincirler oluştururlar. *C. albicans*, *C. dubliniensis* gibi bazı türlerde gerçek hif oluşumu gözlemlenir [6].

Sağlıklı bireylerde *Candida* türleri gastrointestinal sistem, oral ve vajinal mikrobiyal florada yer alan zararsız üyelerdir. Her ne kadar insan mikrobiyotasının zararsız türleri olsa da değişen fizyolojik ve immün yanıt sonucunda konaklarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Candida* türleri, yüzeysel mukozal lezyonlardan (pamukçuk olarak da adlandırılır), kronik, tekrarlayan, mukozal, deri ve tırnak enfeksiyonlarından yaşamı tehdit

eden invaziv veya yayılmış enfeksiyonlara kadar farklı enfeksiyonlar oluşturabilmektedir. [7]. Kandidemi, kan dolaşımı enfeksiyonlarının %15'e varan oranlarda nedeni olarak bilinmektedir. Ayrıca *Candida* türleri sistemik fungal enfeksiyonların % 50-70 oranında ana etkeni olan olarak gösterilmektedir [8].

2.1. *Candida* Türlerinin Virülans Özellikleri

Fırsatçı patojen olan *Candida* türleri dünya çapında önemli morbidite ve mortalite sebebi olarak bilinmektedir. Bu nedenle halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [8]. Artan enfeksiyon riskine karşı *Candida* türlerinin virülans özelliklerinin anlaşılması ve araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır. *Candida* türlerinin bilinen başlıca virülans faktörleri, konak hücreye adezyon, dimorfizm, hidrolitik enzimleri, fenotipik değişimleri, biyofilm oluşturma özellikleridir [9, 10].

2.1.1. Adezyon

Konak hücresindeki kolonizasyonun ve enfeksiyonun ilk basamağı adezyondur (tutunma). Başlangıçta hücre-hücre etkileşimi van der Waals ve hidrofobik etkileşim aracılığıyla oluşur. Adezyon için hem *Candida* adezinleri hem de konak hücre reseptörü gereklidir. *Candida* adezinlerinden en iyi bilinenleri 8 üyesi olan ALS (agglutinin-like sequence) protein ailesidir. Als1-4 germ tüp ve hif için spesifik adezin kodlarken, Als5-7 ve Als9 maya yüzeyinde bulunabilmektedir [11].

Hwp1p (Hyphal Wall Protein 1) en çok çalışılmış adezindir. Hwp1p hif oluşturmada sorumlu spesifik bir protein olarak bilinmektedir. Hwp1 N- terminal bölgesi epitel hücre ile ilişkili transglutaminazlar için substrat olarak hareket etmektedir. Böylece Hwp1'in N-terminal bölgesinin glutaminaza çapraz bağlanması ile *Candida*'nın konak epiteline kovalent bağlanması sağlanmaktadır [12].

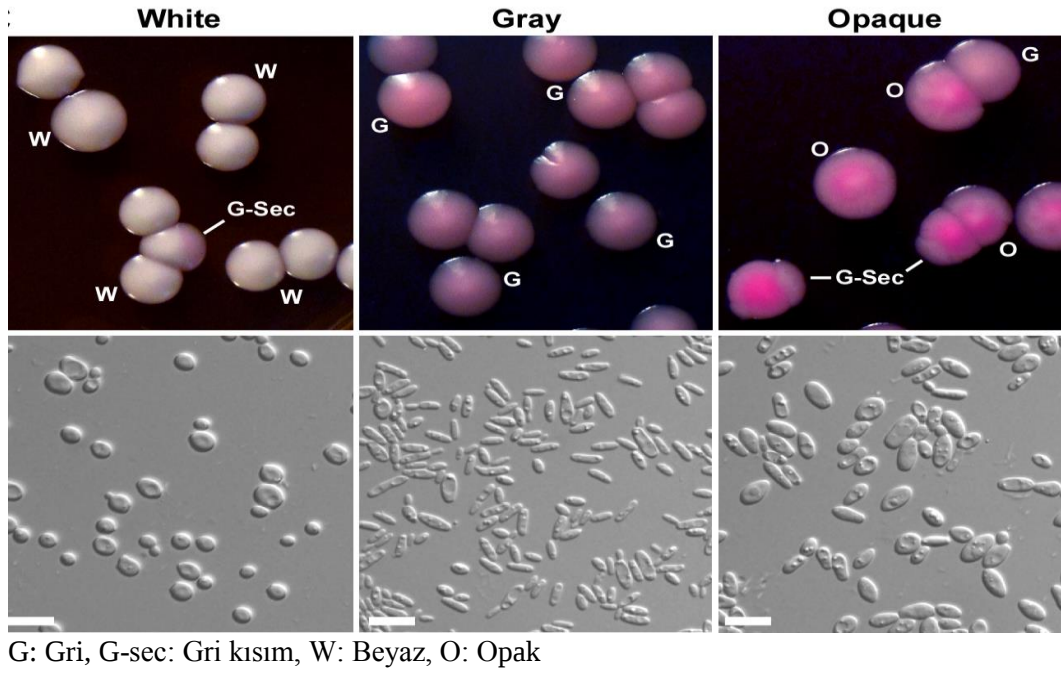
2.1.2. Dimorfizm

Maya ve hif formu arasındaki dönüşüm dimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Hif oluşumu nötral pH'da 37°C'de serum varlığında meydana gelmektedir. Yalancı hif yapısı bazı *Candida* türlerinde oluşurken, *C. albicans* hem gerçek hem yalancı hif yapabilmektedir [13].

Patojeniteden maya ya da hif formunun hangisi sorumlu tam olarak bilinmemekle birlikte, genel olarak hifal formlarının daha invaziv ve derinde olduğu kabul edilmektedir [14]. Maya formunun ise yayılmayı sağlayan form olduğu öngörülmektedir. Hif oluşumu ile ilgili olduğu tespit edilen proteinler; aglütinin benzeri sekans proteini (Als3), hif duvar proteini (Hwp1), salgısal aspartil proteinazlardan (Sap) Sap4, Sap5, Sap6 ve hif oluşturan proteinlerden Ece1 ve Hyr1 olarak bilinmektedir [15].

2.1.3. Fenotipik değişim

Candida albicans içinde bulunduğu ekolojik niş çeşitliliğine ve çevresel şartların değişikliğine adapte olabilmek için çeşitli morfolojiler sergileyebilmektedir. Bugün ortam şartlarına bağlı olarak “beyaz- gri- opak” üçlü fenotipik değişim sisteminin varlığı bilinmektedir. Beyaz hücre tipi katı besiyerinde beyaz ve parlak koloniler oluştururken, mikroskopta hücreler küçük ve yuvarlak görünmektedir (Resim 2.1). Opak hücre tipinde ise daha düz ve pürüzlü koloniler mevcutken, hücreler mikroskopta geniş ve uzamış profil sergilemektedir. Beyaz ve opak hücrelerin gen ifade profilleri, üreme yetenekleri ve virülans karakterleri farklılık göstermektedir. Örnek olarak opak hücreler kutanöz enfeksiyonlardan beyaz hücreler kandideminden sorumludur [16, 17]. Gri hücreler en fazla salgısal aspartil proteinaz (SAP) aktivitesi sergilerken, kutanöz enfeksiyonlara neden olmaktadır. Beyaz-gri-opak üçlü fenotipik değişimin düzenlenmesinde iki anahtar transkripsiyonel düzenleyici *Wor1* ve *Efg1* rol almaktadır [17].



Resim 2. 1. *Candida albicans*'ın üç ayrı (beyaz-gri-opak) fenotipi [17]

2.1.4. Hidrolitik enzimler

Hidrolitik enzimler, konak hücre membranının tahrip olmasına, dağılmasına neden olmaktadır. Bu da membranda işlev bozukluğuna ve fiziksel bozulmaya yol açarlar. Hidrolitik enzimler arasında proteinazlar, lipaz, esteraz, koagülaz, glukoamilaz varlığı *Candida* türlerinde gösterilmiştir[9, 18].

Fosfolipazlar ve proteinazlar hidrolitik enzimler arasında en önemli olanıdır [18]. Fosfolipazlar, gliserofosfolipitlerdeki bir veya daha fazla ester bağınyı hidrolize etme yeteneğine sahip enzimlerden oluşmaktadır. Fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri hedef almaktadır, ancak her bir fosfolipaz enzimi spesifik bir ester bağınyı parçalama yeteneği göstermektedir [19]. Fosfolipaz enzimi, konak hücreleri istila ederek, doku hasarına, epitelyal hücre zarlarını parçalayarak ve hücrelerin sitoplazmaya girmesine izin vererek etki etmektedir [20].

Fosfolipaz ve proteinaz enzimleri önemli virülans faktörleri olarak kabul edilmektedir. Bu enzimlerin ifadesindeki azalış ya da artışın bazı *Candida* türleride virülansın değişmesine etki ettiği gösterilmiştir. Özellikle yoğun bakım ünitesi hastalarında kataterle ilişkili

kandidemiden sorumlu bazı *Candida* türleri için potansiyel virülans faktörü olarak bildirilmektedir [20, 21].

Proteinazlar konak membranının tahrip edilmesi, önemli yapısal ve immünolojik savunma proteinlerinin parçalanmasını sağlayarak, dokuda *Candida* türlerinin invazyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır [18]. Proteinazlar üzerinde en çok çalışma yapılmış olanı salgısal aspartil proteinazlardır (Sap). SAP lezyon bölgesindeki albümin, keratin, hemoglobin, kollajen, fibronektin, laktoferrin, hemen hemen tüm immünglobülinler, kompleman, koagülasyon prekürsörleri gibi konak proteinlerini hidrolize etmektedir [15]. *C. albicans*'ta Sap enzimlerini kodlayan 10 farklı SAP geni tanımlanmıştır. SAP 1-3 yüzeyel enfeksiyon sırasında ifade edilirken, SAP 4-6 ekspresyonu sistemik hastalık ile bağlantılı bulunmuştur. SAP 9-10 ise membrana bağlı GPI proteinleri olarak bilinmektedir [22].

Candida türlerinde mevcut olup enfeksiyonun gelişimine katkıda bulunan diğer bir enzim de lipaz enzimidir. *C. albicans*'a ait 10 adet lipaz enzimi tanımlanmıştır. Bunlardan ilk klonlanan lipaz geni *LIP 1* olarak isimlendirilmiştir. Lipaz enzimi monoaçilgliserol, diasçilgliserol ve triaçilgliserollerin ester bağlarını hidrolize etmektedir. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'de türlerinde *LIP* geni saptanmıştır [15].

Hemolizinler, konak hemoglobinin içindeki demirin kullanılması açısından oldukça önemlidir. Konak eritrositlerinin yok olmasına ve sistemik kandidozda hifal invazyonu kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla hemolizinler, patojenin konakta yaşamasını sağladığı için *Camdida*'ların patogeneze katkıda bulunan önemli bir virülans faktör olarak kabul edilmektedir [18].

2.1.5. Biyofilm (Slime) oluşturma

Mikrobiyal biyofilmler, katı yüzeylere yapışan veya sıvı-hava arayüzlerinde bulunan hücre toplulukları olarak bilinmektedir. Biyofilmler, birçok mikrobiyal tür için en yaygın büyüme durumu olarak kabul edilmektedir. Biyofilm içindeki hücreler, serbest yüzen (planktonik) hücrelere göre antimikrobiyal ajanlara ya da fiziksel strese karşı daha dirençlidir [23].

Biyofilm tabakası amorf (şekilsiz) kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup % 27 proteinden ve % 40 karbonhidrattan oluşmaktadır [24]. *C. albicans* biyofilmleri maya

formunda hücreler, pseudohifal hücreler, hifal hücreler içermektedir. Bu yapının üzerine ekstraselüler bir matriks çevrelemektedir [25]. Hücreleri çevreleyen ekstraselüler matriks türler arasında içerdiği karbonhidrat ve protein miktarları açısından farklılık gösterebilmektedir. Örnek olarak *C. parapsilosis* biyofilmi, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türlerinin biyofilmi ile karşılaştırıldığında daha bol miktarda karbohidrat ve protein içerdiği gösterilmiştir. Genel olarak biyofilm oluşumu ve matriks kompozisyonunda pH ve oksijenin etkisi bulunmaktadır. Ayrıca türlerin de biyofilm oluşturma yetenekleri farklılık gösterebilmektedir. Örneğin *C. albicans* ile *C. dubliniensis*' in biyofilm oluşturma yetenekleri karşılaştırıldığında, *C. albicans*'ın *C. dubliniensis*'e göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturabildiği bildirilmiştir [3, 26]. Biyofilm polimikrobiyal bir yapıda olabilmektedir. Örnek olarak sistemik enfeksiyonlarda, *C. albicans*'ın *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* türleri *Staphylococcus aureus* türleriyle geliştiği gözlenirken, vajinal enfeksiyonlarda ise *Candida* türleri ve *Gardnerella vaginalis* ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir [27].

Kandidaların biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm (slime) oluşturmaları enfeksiyon patogeneğinde virülans faktörlerinden biri olarak gösterilmektedir. *Candida* biyofilm yapısı katater, kalp kapakçıkları, kalp pili, protezler, dişler ve benzeri tıbbi cihazların üzerinde oluşabildiği gibi mukazal yüzeyler, epitel hücreler ve parankimal organlarda da görülebilmektedir [23]. *Candida* türleri enfekte olmuş tıbbi cihazlardan izole edilen baskın mantarlar olarak bildirilmektedir ve hastane kaynaklı sepsis etkenlerinin % 15'ini oluşturmaktadır [28].

Mikrobiyal biyofilmler, biyofilm içinde yer alan mikroorganizmaların antimikrobiyallere direnç geliştirme yeteneğini arttırmaktadır. Mukherjee ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, direnç gelişim mekanizmasının fazlara bağlı olduğunu, biyofilm oluşumunun erken fazlarında effluks pompalarının çalışması sağlanırken, olgun ve ara fazlarda sterol seviyelerindeki değişim ile direnç gelişiminin olduğu saptanmıştır [29, 30].

2.2. Epidemiyoloji

Candida cinsine ait türler insan normal floarasının bir parçası olarak bilinmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış *Candida* türlerinin sadece onda biri insanlarda enfeksiyon yapabilmektedir. *Candida* türlerinin enfeksiyon spekturumu daha az ciddi olan mukozal ve

cilt enfeksiyonlarından (pamukçuk, kronik mukokütanöz kandidoz, vulvovaginit vb.), yaşamı tehdit eden kandidemi, peritonit, enfektif endokardit endovasküler katater enfeksiyonları, menenjit gibi enfeksiyonlara kadar uzanmaktadır [31].

İmmün sistemi baskılanmış hasta popülasyonlarının ve çeşitli invaziv prosedürlere maruz kalan hastaların artması nedeniyle *Candida* türlerinin neden oldukları invaziv fungal enfeksiyonların insidansı yükselmektedir [32]. Son zamanlarda ciddi *Candida* enfeksiyonları sadece immün sistemi baskılanmış konaklarda değil, yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda da görülmektedir [33].

Son 20 yıl içinde kandidemili hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin farklılaştığı görülmüştür. *Candida albicans* türünün izolasyon oranının azaltığı, *albicans* dışı *Candida* türlerinin ise oranının arttığı gösterilmiştir. Bu değişimin altında çoklu nedenler yatarken en önemli sebeplerin başında flukonazol kullanımı ve venöz kataterlerin yaygınlığı gelmektedir [34]. Örnek olarak Viscoli ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada hemotolojik kanseri olan hastalarda *C. albicans* oranı % 36'ya düşerken, bu hastalarda *C. tropicalis* 'in % 14, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'nin %13 oranında olduğu bildirilmiştir [35]. İspanya'da yapılan bir çalışmada izole edilen *Candida* türlerinin %49'un *C. albicans* % 10,7'in *C. tropicalis*, % 20,7'inin *C. parapsilosis*, % 13,6'nın *C. glabrata* ve *C. krusei*'nin % 2,1 olduğu bildirilmiştir [36]. Türkiye'de 83 kandidemili hastada yapılan bir çalışmada % 45,8'in *C. albicans* % 24,1'in *C. tropicalis*, % 14,5'inin *C. parapsilosis*, % 4,8'inin *C. glabrata* olduğu gösterilmiştir [37].

Mantar enfeksiyonlarının sağlık hizmetleri ve ekonomik harcamalar üzerindeki etkisi büyüktür. Sistemik mantar enfeksiyonlarına atfedilebilen maliyetler yüksektir. [38]. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarının başında gelen *Candida* enfeksiyonlarının kontrolü ve tedavisi için alınacak tedbirler önemlidir.

2.3. Klinik Bakımdan Önemi Olan *Candida* Türleri

Candida türleri fırsatçı patojenlerin yaygın olanıdır. Yapılan çalışmalarda invaziv kandidozdan her yıl dünya çapında 250 000'den fazla kişi etkilenmektedir ve bunlardan 50 000'ni ölmektedir. Popülasyon bazlı çalışmalarda kandideminin insidans oranlarının her 100 000 kişide 2 ile 14 arasında olduğu bildirilmiştir [39]. *Candida* türleri en sık rastlanan

nozokomiyal kan dolaşım enfeksiyonu etkenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Avrupa’da *Candida* türleri her 100 000 kişide 1,9-4,8 oranında enfeksiyona neden olduğu için, en sık izole edilen ilk 10 nozokomiyal patojen arasında yer almaktadır [40].

Candida türlerinin gastrointestinal mukozada kolonizasyon oluşturduğu ve kan dolaşımına gastrointestinal sistemden translokasyon veya kontamine vasküler katater aracılığıyla ulaştığı, karaciğer, dalak, böbrekler, beyin ve kalp gibi hedef organları istila etmek üzere damar dışına çıktığı bilinmektedir. [6].

Candida türlerinin dağılımı geçtiğimiz 10 yıl içinde değişmiştir. Daha önce *C. albicans* baskın patojen olarak bilinirken, günümüzde pekçok çalışmada izole edilen izolatların sadece yarısını oluşturmaktadır. *C. glabrata* Kuzey Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada gibi ölkelerde bildirilirlerken, *C. parapsilosis* ile ise Asya’da, Güney Amerika’da ve güney Avrupa’da daha çok karşılaşılmaktadır. *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* gibi diğer türler klinik ortamlarda daha az sıklıkta görölmektedir [39]. *C. auris* ise ilk olarak 2009 yılında Japonya’da bir hastadan izole edilmiştir [41]. 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde ve İngiltere’de enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir. Sonrasında ise pekçok ölkede de *C. auris* enfeksiyonları gösterilmiştir [42].

2.3.1. *Candida albicans*

Candida albicans *Candida* cinsi içinde en çok çalışılan türdür. *C. albicans* genomunun dizi analizi yapıldığında, bu türün 8 kromozomu ve yaklaşık on bin gene sahip olduğu bildirilmiştir [43].

C. albicans pleomorfiktir. Bir maya hücresinden çıkan parmaksı uzantılar olan germ tüpler, gerçek bir hif başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Resim 2.2.) [44]. Tomurcuklanan bir maya hücresi üzerinde uzamış ve birbirine yapışık maya hücrelerinin oluşturduğu yalancı hif (pseudohif) ya da uc uca büyüyen yapılar şeklinde uzayarak gerçek hifler görölebilmektedir [45].



Resim 2. 2. Germ tüp görüntüsü

C. albicans konakta mide, vajen, oral mukoza ve deride bulunabilir. Gastrointestinal sistemde ağırlıklı olarak mantarlardan maya formunu kolonize olduğu bilinmektedir. Konak mikroflorası heterojen karbon kaynağı dağılımına, farklı pH ve CO₂ seviyelerine ve besin çeşitliliğine sahiptir. *C. albicans* ise bu çeşitli ortam şartlarına çok başarılı bir şekilde adapte olabilen bir türdür. *Candida* türü metabolik esnekliği nedeniyle hücresel proteom ve sekretomdaki değişikliklere de katkıda bulunur. Böylece hifal değişim, beyaz opak koloni rengi değişikliği, biyofilm oluşumu, adezyon ve hücre duvar tamirinin yapılabilmesi gibi özellikleri ortaya çıkmaktadır [45, 46].

C. albicans klinik örneklerden en sık izole edilen tür olup, mukozaya ait kökenlerin % 90-100'n  ve kan dolaşım enfeksiyonlarının % 50-70'ini oluşurmaktadır. *C. albicans* kolonileri SDA'da beyaz-krem renğinde, S veya R tipi koloniler oluşturur. Konakta kolonize iken maya fazında iken invazyon için yalancı hif yaparlar. Maya-hif dönüşümü göstermesi ve hidrolitik enzimleri nedeniyle *Candida* türleri arasında vir lansı en yüksek türdür ( izelge 2.1). Serumda  imlenme borusu (germ tüp) oluşturması ve mısır unlu agarda klamidospor oluşumu *C. albicans* 'ın karakteristik özelliği olup tür tanımı yapılmasında kullanılmaktadır [47]. *C. albicans*, *Candida dubliniensis* ve *Candida africana* germ tüp pozitifdir [48].

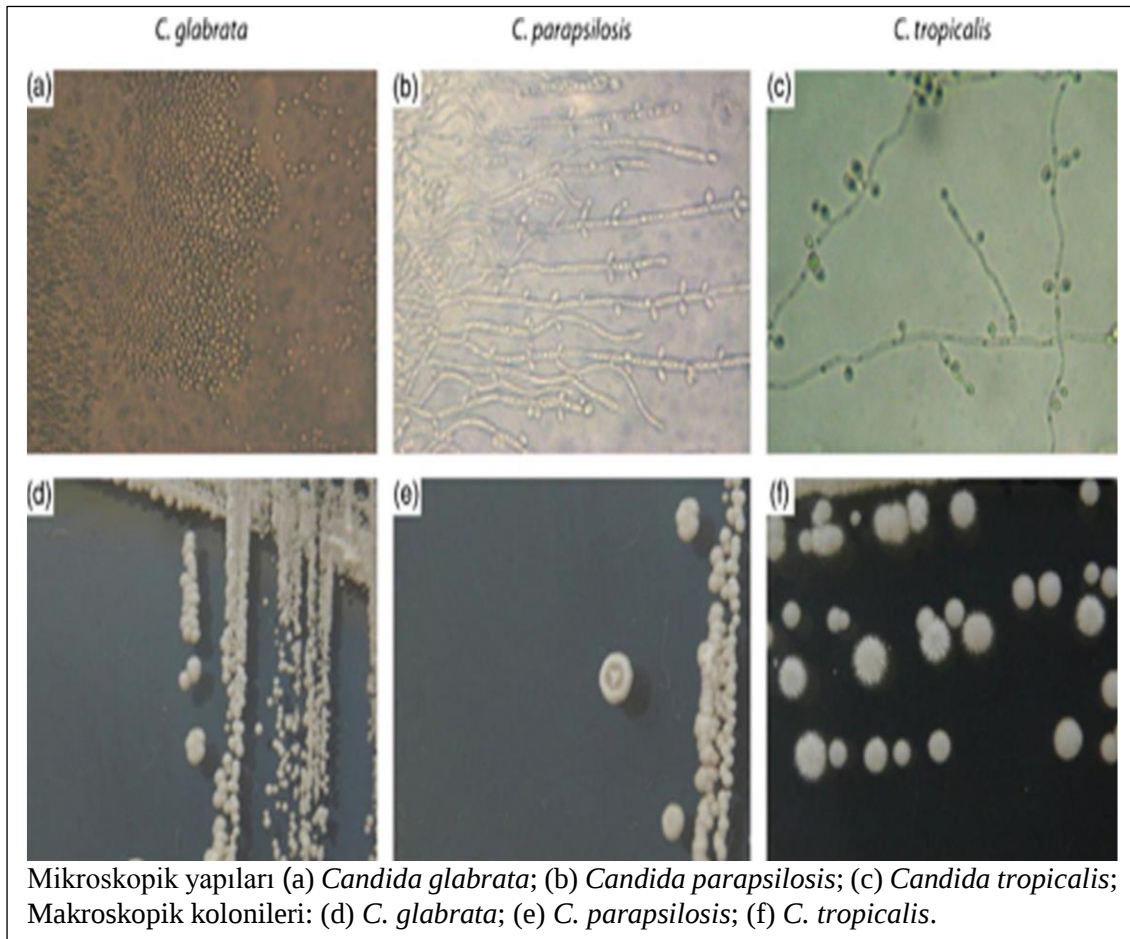
Çizelge 2.1. *C.albicans*'ın virülans özellikleri [49, 50]

Virülans Faktörü	Virülans Özelliği
Hif oluşumu	Epitel penetrasyonu sağlar
Biyofilm oluşumu	Plastik yüzeyler gibi intravenöz katater yüzeylerine tutunmayı kuvvetlendirir
Als hücre duvar proteini	Konak protein/yüzeyi tutunmayı ve biyofilm oluşmasını güçlendirir
Hwp1 (Hifal hücre duvar proteini)	Epitele tutunma ve biyofilm oluşumu
Salgısal aspartil proteinaz	Adezyon/penetrasyon ve konak hücre parçalanmasına yardım eder
Lipaz izoenzimi	Adezyon/penetrasyon ve konak hücre parçalanmasına yardım eder
Plb1 (Fosfolipaz B)	Adezyon/penetrasyon ve konak hücre parçalanmasına yardım eder
Katalaz	Konak antimikrobiyal reaktif oksijen türevlerini inaktive eder
Sod4, Sod5 (Superoksit dismutaz)	Oksidatif strese cevap vermesini sağlar
Fenotipik değişim	Beyaz ve opak fenotip derin doku ve deri için değişik virülans sergiler

C. albicans dışında kalan diğer *Candida* türleri non-*albicans Candida* türleri olarak tanımlanmaktadır. *C. albicans* türleri ile *albicans* dışı *Candida* türleri karşılaştırıldıkları zaman *C. albicans* daha yüksek virülans sergilemektedir. *C. albicans* yukarıda bahsedilen tüm virülans faktörlerini gösterirken, *albicans* dışı *Candida* türleri bu virülans özelliklerinden bazılarına sahiptir.

2.3.2. *Candida tropicalis*

Candida tropicalis albicans dışı *Candida* türleri içinde en sık izole edilen üç türden biridir. Ayrıca *C. tropicalis* kan ve idrar kültürlerinde izole edilen *albicans* dışı *Candida* türleri içinde üçüncü en sık izole edilen türdür [51]. *C. tropicalis* SDA'da; beyaz-krem renginde, yüzeyi düz veya pürütlü S tipi koloniler yapmaktadır (Resim 2.3.). Mısır unlu-tween 80 agarda 25°C'de, 72 saat inkübasyon sonrası; yalancı hifler boyunca lokalize oval blastosporlar yapmaktadır. *C. tropicalis* sükrozu asimile edebilmektedir. Bu özelliği ile sükrozu asimile edemeyen *Candida parapsilosis* türünden ayrılmaktadır [52]. Sıklıkla paronişi, otitis eksterna, endoftalmit, artrit, endokardit ve peritonite neden olabilmektedir [47]



Resim 2.3. Cornmeal Tween 80 Besiyerinde *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*'in makroskopik olarak kolonilerinin görüntüsü ve mikroskopik yapıları [51]

2.2.3. *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis hücreleri oval, yuvarlak ve silindirik şekildedir. *C. parapsilosis* kolonileri Sabouraud dextrose agar üzerinde beyaz, kremsi, parlak düzgün ya da buruşuk şeklinde morfoloji sergilemektedir (Resim 2.3.). Çoklu morfogenetik formları olan *C. albicans* ve *C. tropicalis*'den farklı olarak *C. parapsilosis* kökenleri gerçek hif oluşturmamaktadır (Resim 2.3.). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *C. parapsilosis*'in yalancı hif oluşumunun sitrulin başta olmak üzere özel bir amino asit setine bağlı olduğu gösterilmiştir [53]. Mısır unu agar besiyerinde 72 saat inkübe edildikten sonra, “dev hücrelere” benzetilen ve düzenli olarak dallanan yalancı hifler oluşturmaktadır [51].

C. parapsilosis türü 2005 öncesinde I, II ve III olmak üzere üç gruba ayrılmaktaydı; ancak yapılan ilerlemiş genetik çalışmalar sayesinde birbirlerine çok yakın olan *C. parapsilosis*, *Candida metapsilosis* ve *Candida orthopsilosis* olmak üzere üç ayrı tür tanımlanmışlardır. Buna rağmen *C. parapsilosis* bu türler arasında en önemli hastalık etkeni olarak bilinmektedir. Son on yıl içinde *C. parapsilosis* enfeksiyonlarında dramatik bir artış görülmektedir [53]. Gastrointestinal sistem, sistemik ve genitoüriner sistem enfeksiyonlarından daha sık izole edilmektedir. Son yıllarda hastane kökenli patojenler arasında yer almaya başlamıştır [6]

2.3.4. *Candida glabrata*

Candida glabrata gerçek ya da yalancı hif oluşumu göstermeyen, 1-4 µm büyüklüğünde hücrelere sahip (çizelge 2.2), SDA üzerinde küçük, krem rengi ve düzgün koloniler yapan *Candida* türlerinden biridir. Glukoz ve trehalozu asimile edebilmektedir. Diploid genoma sahip olan diğer *Candida* türlerinden ve *C. albicans*'tan farklı olarak haploid genoma sahiptir. *C. glabrata* kökenleri ağız, özafagus, barsak ve vajen mukoza yüzeyinde kommensal olarak bulunmaktadır [54].

Çizelge 2.2. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* türlerinin morfolojik karakterleri [51]

Tür Adı	Germ Tüp Oluşumu	Hif/Pseudohyphae	Mantar boyutu (µm)
<i>C. albicans</i>	+	+/+	4-6 X 6-10
<i>C. tropicalis</i>	-	± /+	4-8 X 5-11
<i>C. parapsilosis</i>	-	-/+	2,5-4 X 2,5-9
<i>C. glabrata</i>	-	-/-	1-4

C. glabrata ABD ve Kuzey Avrupa’da kandidemide non-*albicans Candida* türleri arasında en sık rastlanan ikinci türdür. *C. glabrata*’nın oranındaki bu artışın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak azollere karşı direnç geliştirebilmelerinin bu artışta rolü vardır [55]. Ayrıca cansız yüzeyler üzerinde *C. glabrata* 5 aydan daha uzun süre hayatta kalabilirken, *C. albicans* 4 ay yaşabilmektedir. *C. parapsilosis* hücreleri ise cansız yüzeyler üzerinde 2 hafta sonra ölmektedir [54].

C. glabrata immün sistemden bir kaçma stratejisi olarak, makrofaj içinde saklanabilmektedir. Makrofaj içinde sağ kalabilmesi, içinde bulunduğu fagozomu modifiye ederek, ROS üretimini baskılayarak ve minimal proinflatuvar cevabın gelişmesini engelleyerek gerçekleşmektedir. Böylece fagolizozomun toksik şartlarından korunmaktadır [48].

2.3.5. *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis germ tüp oluşturabilme ve klamidopsor oluşturabilme özelliği ile *C. albicans*’a benzemektedir. *C. dubliniensis* 45°C’de üreyememesi, β-glukosidazaktivitesinin olmaması, kromojenik besiyerinde koyu yeşil koloniler oluşturmaması ile *C. albicans* türünden ayrılmaktadır [56]. *C. dubliniensis* ilk olarak İrlanda’da HIV pozitif hastaların ağız boşluklarından izole edilmiştir. Daha sonra yapılan epidemiyoloji çalışmalarında *C. dubliniensis*’in immünsuprese kişilerde enfeksiyon etkeni olduğu bildirilmiştir [57].

C. dubliniensis genomu da *C. albicans* genomuna çok benzerdir. Ancak patogenetik açıdan bakıldığında her ikisi de farklıdır. *C. albicans*'ın *C. dubliniensis*'e göre daha yüksek patojeniteye sahip olmasının nedeni, *C. dubliniensis*'de epitel adezyonunda yer alan Als3 proteinini kodlayan *ALS* geninin bulunmayışıdır [48].

2.3.6. *Candida kefyr*

Candida kefyr besiyerinde beyaz-krem rengi, S tipi koloniler yaparlar. 25°C'de 3 günlük inkübasyon sonucunda oluşan koloniler diğer türlere göre daha küçük koloni morfolojisindedir. Mısır unu agarda yalancı hifler ve bunun etrafında uzun, paralel dizilmiş blastokonidyumlar bulunur [58]. *C. kefyr* insanlarda normal flora içinde bulunurken, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedir. *Albicans* dışı *Candida* türler içinde yer alan ve daha nadir karşılaşılan bir türdür [59].

2.3.7. *Candida krusei*

Candida krusei *Candida* türleri arasında az görülen bir türdür. *C. krusei*'nin flukonazole doğal dirençli olması nedeniyle mortalite yüksektir (% 30 - % 60) [60]. Yoğun bakım ünitelerinde amprik antifungal tedavi uygulamalarına bağlı olarak flukonazole dirençli *C. krusei* kökenlerinin gelişebildiği bilinmektedir [61].

2.3.8. *Candida guilliermondii*

Candida guilliermondii (*teleomorph Meyerozyma guilliermondii*) doğada oldukça yaygın bulunan bir mayadır [62]. Non- albicans *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar artış gösterse de, *C. guilliermondii* tüm *Candida* türlerinin yapmış olduğu enfeksiyonlar arasında sadece % 1'lik kısmı oluşturmaktadır [63]. Bazı çalışmalarda hemotolojik kanseri olan hastalarda daha sık enfeksiyonlara sebep olabildikleri bildirilmiştir [64]. Yapılan çalışmalarda flukonazole olan duyarlılıklarının azaldığı gösterilmiştir [65].

2.3.9. *Candida lusitaniae*

Candida lusitaniae (teleomorph, *Clavispora lusitaniae*) kanser hastalarında ya da diğer ciddi eşlik eden durumların varlığında fungemiye neden olmaktadır. *C. lusitaniae* türlerinde amfoterisin B direci gelişebilmektedir. Ayrıca *Candida* türleri arasında *C. lusitaniae*, amfoterisin B'ye duyarlı ya da dirençli olmasına bağlı olarak çok yüksek oranda fenotipik değişim geçirebilen, benzersiz bir türdür [66].

2.3.10. *Candida auris*

Candida auris ilk olarak 2009 yılında Japonya'da bir hastanın dış kulak akıntısından izole edilmiştir. Ardından Güney Kore ve Hintistan'da amfoterisin B ve flukonazol tedavisine rağmen dirençli kan dolaşımı enfeksiyonları bildirilmiştir. Atfedilebilir mortalite bilinmemekle birlikte, *C. auris* enfeksiyonu olan hastaların % 30-60'ı ölmüştür [67]. Vorikonazole direnç değişken olmakla birlikte, tedavisinde posakanazol, itrakonazol ve isavukonazol daha etkilidir [68]. Pek çok izolat ekinokandinlere duyarlı ise de, *C. albicans*'a göre minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri (MİK) daha yüksektir [42].

2.4. *Candida* Enfeksiyonlarında Kullanılan Antifungaller

Candida enfeksiyonlarında hızlı ve etkili tedavi ihtiyacı her geçen gün artış göstermektedir. Antifungallerin uygulama alanına girmesi 1950'li yıllarda başlamış, ancak sayıca artışları, enfeksiyon hızı ile aynı paralelliği göstermemiştir. Ökaryotik özellikteki mantarlar, aynı özelliği taşıyan memeli konakta hastalık oluşturmaları nedeni ile, tedavi edici maddelerin biyokimyasal ve fizyolojik farklılıklara bağlı olarak üretimleri son 10-15 yıla kadar sınırlı kalmıştır [69].

Günümüzde mikoz tedavisinde kullanılan sistemik ve topikal altı antifungal grubu bulunmaktadır. Her antifungal grubunun etki mekanizması farklı temellere dayanmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kullanımda olan sistematik ve topikal antifungal ilaçlar [6].

Antifungalın İsmi	Uygulama Yolu	Etki Mekanizması	Spektrum Özelliği
Alilaminler			
Naftifin Terbinafin	Topikal Oral, Topikal	Skualen epoksidaz inhibisyonu	Terbinafin çok geniş spektruma sahiptir.
Antimetabolit			
Flusitozin	Oral	DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu	Amfoterisin B ve flukonazolle kombine kullanılır.
Azoller			
<u>İmidazoller</u> Ketokonazol Bifonazol Ekonozol Mikonazol Oksikonazol Sulkonazol	Oral, topikal	Sitokrom P-450 bağımlı enzimlerden lanosterol 14 α -demetilazı inhibe eder.	Ketokonazolün orta seviyede geniş etki spektrumu vardır.
<u>Triazol</u> Flukonazol Itrakonazol Vorikonazol Posakonazol Ravukonazol	Oral, Intravenöz (IV)	İmidazoller ile aynı ancak hedefe daha spesifik bağlanırlar.	Spektrumları geniştir, ancak bazı maya türlerinde primer ve sekonder direnç görülmektedir.
Ekinokandinler			
Kaspofungin, Anidulafungin Mikafungin	IV	Mantar hücrelerinin duvarındaki glukan sentezinin inhibisyonu	Kaspofungin invaziv kandidoz ve aspergilloz tedavisinde kullanılmaktadır.
Poliyenler			
Amfoterisin B	IV, topikal	Ergosterole bağlanır. Direkt oksidatif membran hasarı oluşturur.	Geniş spektrumludur.
Nistatin	Oral süspansiyon, topikal	Membran hasarı oluşturur	Geniş spektrumludur.

2.4.1. Alilamin sınıfı antifungaller

Alilamin sınıfı antifungaller sistemik etkili olan terbinafin ve topikal etkili olan naftifinden oluşmaktadır. Bu ilaçlar skualen epoksidaz enzimini inhibe etmektedir. İnhibisyon sonucunda mantar hücre membranında ergosterolde azalmaya ve skualende artışa sebep olmaktadır. Terbinafin geniş etki spektrumuna sahip lipofilik özellikte bir antifungal olarak bilinmektedir. Dermatofitler, *Malassezia furfur*, *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* türleri ve *Aspergillus* türleri üzerine etki göstermektedir. Yağlı dokularda, saç, deri, ve tırnak gibi dokularda yüksek konsantrasyona ulaşabilmektedir [6, 70].

2.4.2. Antimetabolit sınıfı antifungaller

Flusitozin (5-florositozin, 5-FC) bir antimetabolit olarak işlev görev tek antifungal olarak bilinmektedir. Mantar hücresindeki RNA, DNA ve protein sentezini engelleyerek etki gösteren flusitozin, florlanmış bir primidin analoğu olarak görev yapan bir antifungaldir. Flusitozin, sitozin permeaz enzimi aracılığıyla mantar hücresine girmektedir. Ardından sitoplazmada deaminasyonla 5-florourasile (5-FU) dönmektedir. 5-FU daha sonra 5-floroüridilik aside dönüştürülmektedir. 5-floroüridilik aside dönüş sonrasında RNA sentezi sırasında urasile yarışa girmekte ve RNA'nın yanlış kodlanmasını sağlayarak protein sentezini inhibe etmektedir [71]. Küf mantarlarına etkisi çok sınırlı olmakla birlikte, maya mantarlarına da tek başına kullanıldığında direnç gelişimi sıklıkla gözlenmektedir. Bu nedenle tedavide amfotersin B ile birlikte kullanımı önerilmektedir [70].

2.4.3. Azol sınıfı antifungaller

Azoller triazol ve imidazol olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. İmidazollerin kullanımı yüzeysel mantar enfeksiyonları ile sınırlı iken, triazoller hem yüzeysel hem de invaziv mantar enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Azoller, Sitokrom p450'ye bağımlı C-14 α lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek, mantar plazma zarının önemli bir bileşeni olan ergosterolün sentezini bozarlar. Klinik kullanımdaki azoller, azol halkasında iki ya da üç nitrojen bulunmasına göre triazoller (ör. flukonazol, vorikonazol, itraconazol) ve imidazoller (ör. ketokonazol, klotrimazol, mikonazol) olarak gruplandırılmaktadır [6]. Azol sınıfı antifungallerden, flukonazol birçok *Candida* türüne ve *Cryptococcus neoformans*'a

etkiliyken *Candida krusei* doğal direnç göstermektedir. *C.glabrata* kökenleri ise flukonazole doza bağlı duyarlılık gösterir [70].

Vorikonazol geniş spekturumlu, oral, ve intravenöz olarak kullanılan ikinci kuşak azol grubu antifungaldir. *Candida* türleri, , *Trichosporon* türleri, *Fusarium* türleri, *Aspergillus* türleri, ve dermatofitler üzerine etki göstermektedir. Azol grubu antifungaller arasında çapraz direnç görülebilmektedir. Dolayısıyla flukonazole dirençli *Candida* kökenleri benzer olarak ketokonazole, vorikonazole ve itraconazole de direnç geliştirebilirler [70, 71].

İtrakonazol lipofilik bir triazol grubu antifungaldir. 1992 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır [72]. *Candida* türleri, *C. neoformans*, dermatofitler, *Aspergillus* türleri, *Sporothrix schenckii* ve endemik dimorfik patojen mantarlara kadar uzanan geniş spekturumlu antifungal aktivite göstermiştir. İtrakonazolün flukonazole dirençli *Candida glabrata* ve *Candida krusei* üzerinde etkili olabildiği saptanmıştır. Beyin omurilik sıvısına (BOS) geçişleri oldukça zayıf olmasına rağmen, lipofilik yapıda olmalarından dolayı pürülan eksudalara ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedirler [6].

2.4.3. Ekinokandin sınıfı antifungaller

Ekinokandin sınıfı antifungaller diğer antifungal kökenlerine göre daha yeni, seçici ve semisentetik bir antifungal grubudur. Ekinokandin sınıfı antifungaller kaspofungin, mikafungin ve anidulafunginden oluşmaktadır. Kaspofungin 2001’de FDA’den onay alırken, mikafungin 2005 ve en son anidulafungin 2006 yılında EMEA’dan (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) onay almıştır [72]. Ekinokandin sınıfı antifungaller mantar hücre duvarının yapısında bulunan 1,3 β -D-glukan sentaz enzimini inhibe etmektedir. Böylece mantar hücresinin duvar yapısı bozulmaktadır. Bu bozulmaya bağlı olarak da hücre ölümü gerçekleşmektedir. Memeli hücreleri 1,3 β -D-glukan ihtiva etmediğinden ekinokandinler seçici toksik etki göstermektedir. Glukan sentezini düzenleyen enzim kompleksinin inhibisyonu, *Candida* türlerinde fungisidal etki oluşturken, *Aspergillus* türlerinde ise fungistatik etki oluşturmaktadır [73]. Ekinokandin sınıfı antifungaller *Candida* ve *Aspergillus* türlerine etkili iken, hücre duvarı bulundurmayan *Fusarium* türleri, *Trichosporon* türleri, diğer hiyalen küfler, *C. neoformans* ve *Zygomycetes* sınıfındaki mantarlara etki göstermemektedir [6].

Kaspofungin yüksek oranda organ ve dokulara dağılabilmektedir. İnvaziv kandidoz ve aspergilloz tedavisinde kullanılmaktadır. Son dönemlerde azol sınıfı antifungallere maruz kalmaya bağlı olarak *C. krusei* ve *C. glabrata* enfeksiyonları açısından yüksek risk oluşturan hastalarda tercih edilmektedir [74]. Kaspofungin ekinokandin sınıfı antifungaller içinde en yaygın olarak kullanılan antifungaldir.

Diğer ekinokandin sınıfı antifungaller arasında yer alan anidulafungin ve mikafungin de benzer etkinliğe sahip yeni ajanlardır. Anidulafungin kullanım onayı erişkinlerin invaziv kandidoz ve özafagusun *Candida* enfeksiyonları ile sınırlanmıştır. Anidulafungin flukonazol ile karşılaştırıldığında, invaziv kandidoz olgularında başarı oranı daha yüksek bulunmuştur. Mikafunginin % 99.5'i proteine (özellikle albümin) bağlanmaktadır ve çok az oranda metabolik değişime uğramaktadır. Mikafungin erişkinlerde immün sistemi baskılanmış hastaların invaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisinde etkilibulunmuştur. Bununla birlikte mikafungin henüz FDA tarafından çocuk yaş grubunda onay alamamıştır [70].

2.4.4. Poliyen sınıfı antifungaller

Poliyen sınıfı antifungallerin hedefinde hücre membranındaki ergosterol yer almaktadır. Amfoterisin B ve nistatin bu grubun iki üyesidir.

Amfoterisin B bilinen en eski ve geniş spektrumlu antifungaldir. 50 yıldan daha uzun süredir kullanılmaktadır. İlk defa bir toprak *Actinomyces*'nin doğal ürünü olarak izole edilmiştir. Mantar hücre zarındaki sterol olan ergosterolü hedef almaktadır. Ergosterole bağlanan amfoterisin B iyon kanalları oluşmakta ve depolarizasyon meydana gelmektedir. Böylece hücre membranındaki ozmotik bütünlük hasara uğrar, hücre içeriği dışarı sızar ve ölüm oluşur. Amfoterisin B'nin yarılanma ömrü 15 saattir. Etki spektrumuna *Candida* kökenleri, *C. neoformans*, *Aspergillus* türleri, zigomiçetler ve endemik dimorfik patojenler girmektedir [75].

Poliyen sınıfı başka bir antifungal olan nistatin ise *Candida* türleri ve *Aspergillus* türleri üzerinde etkilidir. Solüsyon hali memeli hücreleri üzerinde toksik etki göstermektedir. Çözünme durumu ve toksitite sistemik mikoz enfeksiyonlarında intravenöz olarak kullanımını engellemektedir. Son dönemlerde çıkan lipomozal nistatin formülasyonu

toksiteyi azaltmak için geliştirilmiştir. Her ne kadar lipozomal formu daha az toksik olsa da, infüzyon ile ilişkili toksisite halen ilacın kullanımı ile ilgili sıkıntılara sebep olmaktadır [71].

2.5. Antifungal Direnç Mekanizması

Mantarların tedavide kullanılan antifungallere karşı direnç geliştirme yetenekleri mevcuttur. Antifungal ilaçların sık ve profilaktik kullanımı antifungallere direnç gelişmesine yol açmaktadır [76]. Antifungal ilaçlara karşı oluşan doğal (primer) ve kazanılmış (sekonder) direnç olmak üzere iki farklı direnç çeşidi bulunmaktadır. Doğal direnç, bir cins ya da türün daha önce o ilaç ile karşılaşmasının etkisi olmaksızın o ilaca dirençli oluşuyken, kazanılmış direnç mantarın antifungal ilaç ile tedavi sonucunda veya bir başka yolla karşılaşması sonucunda suşun dirençli hale geçmesidir [15]. Örneğin *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* kökenlerinde amfoterisin B'ye doğal direnç saptanırken, *C. glabrata* kökenlerinin flukonazol ile karşılaşması sonucunda direnç kazanan kökenleri bildirilmektedir [77, 78].

Özellikle *Candida* enfeksiyonlarına karşı azol sınıfı antifungallerin, özellikle flukonazolün, kullanımına bağlı olarak artan direnç problemi antifungal yönetiminin önemine dikkat çekmektedir (Çizelge 2.4.). Edinilmiş azol direnci, AIDS'li, orofararingeal veya mukozal kandidozlu hastalarda ve invaziv enfeksiyonlarda tanımlanmıştır.

Çizelge 2.4. *Candida* türlerinin antifungallere karşı duyarlılık ve dirençlilik durumları [79]

Türün Adı	Amfoterisin B	Ekinokandin	Flukonazol	Yorum
<i>C. albicans</i>	S*	S	S	
<i>C. dubliniensis</i>	S	S	S	<i>C.albicans</i> ile yakından ilişkilidir. Flukonazol direncini kolayca geliştirebilir
<i>C. glabrata</i>	S	S	I*	Azol tedavisi sırasında effluks pompaları sık sık indüklenir.
<i>C. krusei</i>	S	S	R*	
<i>C. parapsilosis</i>	S	S/I	S	Ekinokandin MİK'in yükselmesinden sorumlu <i>FKS1</i> hot spot mutasyonu sorumludur
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	
S: Duyarlı, I: Orta Seviyede Dirençli, R: Dirençli				

Her antifungal ilacın etki mekanizması farklı olduğu için, gelişen direnç mekanizmaları da farklılık göstermektedir. Örneğin, *Candida* türlerinin azol sınıfı antifungallere direnç geliştirmede başlıca dört temel mekanizması bulunmaktadır. Bunlar ilaç konsantrasyonunun dışa atım pompaları (effluks sistemi) ya da ilaç penetrasyonunun azaltılması, hedef bölgenin modifikasyonu, hedef enzimin düzenlenmesi ve baypas yollarının geliştirilmesi şeklindedir. Ancak *Candida* türlerinin ekinokandinlere direnç ise *FKS* genlerinde meydana gelen mutasyon ile gerçekleşmektedir [80].

Azoller, lanosterol 14 α -demetilaz enziminin inhibisyonu yoluyla mantar hücre zarlarının temel bir bileşeni olan ergosterol sentezini bozmaktadır. Bu hedef protein *ERG11* geni tarafından kodlanmaktadır. *ERG11*'de meydana gelen nokta mutasyonlar hedef değişikliğine yol açarak ilaca olan afiniteyi azaltmaktadır [81]. Edinilmiş azol direncinin diğer bir mekanizması da çoklu ilaç taşıyıcılarının ifade edilmesidir. ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları *Cdr1* ve *Cdr2* 'nin yanı sıra başlıca dışa atım pompası *Mdr1*'in hepsi, birçok *Candida* türünün azol direnci ile ilişkili bulunmuştur. *CDR* genlerinin aşırı çalışması çoklu azol direncine yol açmaktadır [76, 81]

Poliyen sınıfı antifungallerden Amfoterisin B'ye direnç, hücre zarındaki sterollerin değişimi veya ergosterol miktarının düşmesi nedeniyle amfoterisin B'nin bağlanmasında bir azalma sonucu oluşmaktadır [6]. Ergosterol oluşum yolağında *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* ve *ERG11* genlerinde meydana gelen mutasyonlarının *Candida albicans* izolatlarında amfoterisin B'ye duyarlılığı düşürdüğü bildirilmiştir [82]. Amfoterisin B'ye intrinsek direnç bazı *C. lusitanae* suşlarında gözlenirken, sekonder direnç *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* suşlarında bildirilmiştir [69].

Antimetabolit sınıfı antifungallerden flusitozine direnç ilaç alımının azalmasına (permeaz aktivitesinin kaybı) veya flusitozini 5-FU ve 5-floroüridilik aside (FUMP) dönüştürmek için gerekli olan enzimatik aktivitenin kaybına bağlı olarak gelişmektedir [82]

Bakteriler ile karşılaştırıldıklarında mantarların antimikrobiyal ilaçlara karşı daha yavaş direnç geliştirdikleri bilinmektedir. Antifungal direnç genleri plazmid, faj ya da transpozonlar aracılığıyla hücreler arasında aktarılmamaktadır [83].

2.5.1. Ekinokandin sınıfı antifungallerin direnç mekanizması

Ekinokandin sınıfı antifungaller hücre duvarının oluşumunda görev alan glukani sentezleyen 1,3 β -D-glukan sentaz enzimini hedef almaktadır. Bu enzim *FKS* gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır. *Candida* türlerindeki ekinokandin direnci iki korunmuş "hot spot" bölge olan *FKS1* ve *C. glabrata*'da paralogu olan *FKS2*'de oluşan nokta mutasyonlar sonucunda ilacın 1,3 β -D-glukan sentaz enzimine bağlanma eğilimi ve enzim hızı düşer [84]. Buna bağlı olarak ilaca direnç gelişir. *C.parapsilosis* türleri *FKS* genleri içinde doğal olarak meydana gelen mutasyonlar barındırabilmektedirler. Sonucunda *C.parapsilosis* kökenlerinde

ekinokandinlerin *in vitro* potansiyelleri azalmaktadır [85, 86]. *Candida* türlerinde meydana gelen *FKS* mutasyonları tür bazında farklı pozisyonlarda meydana gelebilmektedir (Resim 2.4.)[87].

Özellikle *C. glabrata* geçtiğimiz son 10 yıl içinde ekinokandin direnci önem kazanmıştır. Pek çok olguda direnç 3-4 haftalık kısa süreli tedavi sonrasında ortaya çıkmıştır. Dirençli mutantlar, ilk defa ekonikandin kullanan hastalarda bile yüksek oranda bildirilmiştir. Bu durum, hastanede yatan hastalar arasında bulaşa işaret etmektedir [79].

	Fks1p		Fks2p	
	Hot spot 1	Hot spot 2	Hot spot 1	Hot spot 2
<i>C. albicans</i>	641	FLTL ^S LRDP	1357	DWIR ^R YTL
<i>C. dubliniensis</i>	641	FLTL ^S LRDP	1357	DWIRRYTL
<i>C. glabrata</i>	625	FL ^L IL ^S LRDP	1340	DW ^V RRYTL
<i>C. kefyr</i>	54*	FL ^L TL ^R LRDP	769*	DW ^V RRYTL
<i>C. krusei</i>	655	FL ^L IL ^S IRDP	1364	DWIR ^R YTL
<i>C. lusitanae</i>	634*	FLTL ^S LRDP	**	DWIRRYTL
<i>C. tropicalis</i>	76	FL ^L TL ^S LRDP	792	DWIRRYTL
<i>C. parapsilosis</i>	652	FLTL ^S LRD ^A	1369	DWIRRYTL

Resim 2. 4. Çeşitli *Candida* türlerinde *FKS* gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar [87]

2.6. Mutasyonlar

Direncin mutasyonlar ile oluştuğu yukarıda belirtilmiştir. Mutasyonlar, genellikle protein yapısına farklı bir aminoasit eklenmesi ve buna bağlı olarak değişmiş bir fenotipin ortaya çıkması ile sonuçlanan, DNA'nın baz dizilimindeki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Bir pirimidinin başka bir pirimidin ile veya bir pürinin başka bir pürin ile değiştiği tek baz da olan değişimler "transisyon" olarak adlandırılırken, bir pirimidinin bir pürin ile (veya tam tersi yönde) bir değişim olmasına ise "transversiyon" denilmektedir. Mutasyonlar üç çeşit moleküler değişikliğin sonucunda oluşabilmektedir;

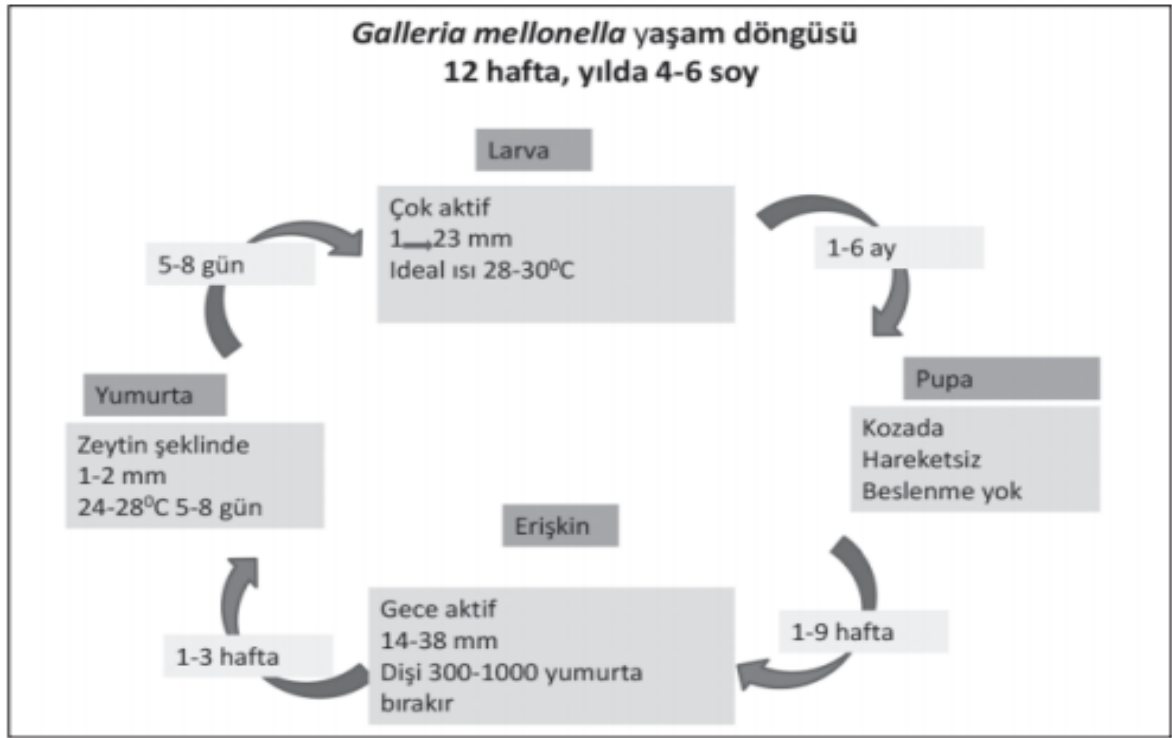
1. Birinci tip; baz değişimi mutasyonu olarak da bilinir. Bu bir bazın çıkıp yerine başka bir baz girmesiyle oluşmaktadır. Bu mutasyonlar daha çok DNA replikasyonu sırasında ya DNA polimerazın bir hata yapması veya bir mutajenin kalıp DNA'daki bir bazın hidrojen bağını değiştirmesi sonucu yanlış bazın girişine neden olması ile gerçekleşmektedir. Bir baz değişimi farklı bir aminoasitin girişine neden olan bir kodon ile sonuçlanırsa buna yanlış anlamlı (missense) mutasyon denirken, baz değişimi bir kodon sonlanmasına neden olursa bu durum protein sentezinin erken sonlanmasına anlamsız (nonsense) mutasyon denilmektedir. Anlamsız mutasyonlar çoğunlukla protein fonksiyonunu ortadan kaldıran özelliktedir. Bazen de kodlanan aminoasit dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmayan bir mutasyon gerçekleşebilir. Bu mutasyonlara ise sessiz (silent) mutasyon denmektedir.
2. İkinci mutasyon tipi ereve kayması (frameshift) mutasyonu olarak bilinmektedir. Bu tür mutasyon, bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesi ve/veya silinmesi sonucunda oluşmaktadır. Böylece ribozomdaki okuma çerçevesinin kaymasına, yanlış aminoasitlerin eklenmesine ve inaktif bir proteinin üretimine yol açmaktadır.
3. nc tip mutasyonlar, transpozonların veya insersiyon dizilerinin DNA'ya entegre olması ile gerçekleşmektedir. Bu yeni yerleşen DNA parçaları, yerleştikleri bölgede ve komşu genlerde önemli değişikliklere neden olmaktadır [88].

2.7. *Galleria mellonella* (Mum Güvesi)

Mikroorganizmalar ile ilgili virlans çalışmaları için genellikle uygun hayvan modellerine ihtiyaç bulunmaktadır. Enfeksiyon çalışmalarında memeli modellerinin kullanılması çalışma maliyetinin artmasına ve etik sorunların gündeme gelmesi nedeniyle yeni model arayışlarına sebep olmuştur. Böcekler gelişmiş bir immün sisteme sahip oldukları için, memeli enfeksiyonları ile ilgili bilgi üretme olasılıkları bulunmaktadır. Memeliler gibi böcekler de doğuştan bağışıklık sistemine sahiptir. Hemolenf sıvıları bulunmaktadır. Hemolenfte bulunan hücreler mikroorganizmaları fagosite etme yeteneğindedir. Ayrıca immün cevap, lizozim ve küçük antibakteriyel peptitler oluşturmaya kapsamaktadır. Ek olarak hücreye tutunma, antimikrobiyal peptitlere direnç, doku parçalanması ve oksidatif strese adaptasyon gibi temel enfeksiyon süreci de böceklerde önemlidir. Bu nedenle böcekler, memeli enfeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmaların virlans faktörlerinin belirlenmesinde önem kazanmaktadır [89].

Bal mumu güvesi *G. mellonella* alternatif enfeksiyon modeli olarak çeşitli bakteri ve mantarların virülans çalışmalarında kullanılmaktadır [90]. Bugüne kadar *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* gibi bakterilerin ve *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* gibi mantarların *G. mellonella* üzerinde virülans çalışmaları yapılmıştır [90-92].

Galleria mellonella, *Lepidoptera* takımı, *Pyrilidae* ailesi içinde yer alan ve bal peteklerine zarar veren bir tarım zararlısıdır. *G. mellonella* tüm dünyada, ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunan bir güve türüdür. Son yıllarda etik kurallar, altyapı ve donanım gerekleri, bakıcı-teknik eleman ihtiyacı, deney hayvanı ücretleri gibi sebeplerle, enfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve etkili tedavi protokollerinin araştırılmasında memelilerin kullanımından kaçınılmaktadır. Onların yerine, omurgasız modeller kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar arasında *G. mellonella* larvasının kullanımı literatürde çok kabul görmüştür. Hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir. *G. mellonella*'nın gelişimi yumurta, larva, pupa ve güve dönemlerinden oluşmaktadır. Yaşam döngüsü, besin durumuna ve ısı değişikliklerine göre 6 hafta ile 6 ay arasında değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.1.). Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında tercih edilen formu son larval evredir (4. gelişim evresi). Bu evrede yaklaşık 0.2-0.4 g ağırlığında, 2-4 cm uzunluğunda, mat beyaz renkli görünümündedir. Laboratuvar şartlarında, oda ısısında, özel barındırma sistemlerine gereksinim duymayan, petri kaplarında saklanabilen larvalar ucuz olması, kolay temin edilmesi ve yetiştirilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Yetiştirme için doğal kepek, gliserol ve bal karışımından oluşan besin içeren cam kavanozlar kullanılmaktadır [93].



Şekil 2.1. *Galleria mellonella* yaşam döngüsü [94]

Bu tez çalışmasında; kaspofungin ile karşılaştırılarak dirençli hale getirilen *Candida* kökenlerinin *in vitro* ve *in vivo* virülans özellikleri araştırılmış ve duyarlı kökenlerle karşılaştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida glabrata* ATCC MYA-2950 referans kökenleri çalışma kapsamına alınmıştır. *Candida* kökenleri çalışmada kullanılmadığı zamanlarda -80°C'de % 20 gliserol içinde saklanmıştır. Kökenler deneylerde kullanılmadan önce SDA besiyerinde 24 saat geliştirilerek aktif kültürler halinde kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. Sabouraud dekstroz agar'ın (SDA) hazırlanışı

Pepton	10 g/L
D (+) Glukoz	20 g/L
Agar	17 g/L
pH	5,6

Toz besiyerinden 47 g tartılmıştır. Ardından 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. 121⁰ C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta (atm) sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına 25'er ml dökülmüştür. Deneylerde kullanılacağı zamana kadar 4°C de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Kaspofungin içeren SDA hazırlanışı

Pepton	10 g/L
D (+) Glukoz	20 g/L
Agar	17 g/L
pH	5,6
Kaspofungin	1 mg/mL (ana stok)

Kaspofungin steril 1 mL distile su içinde 1 mg/mL olacak şekilde çözülerek ana stok hazırlanmıştır. Ardından 0,45 µm'lik steril filtreden geçirilerek çözelti steril edilmiştir. Ana

stoktan 0,03 µg/mL ile 16 µg/mL arasında artan konsantrasyonları içerecek şekilde sulandırılarak yeni çözeltiler hazırlanmıştır.

SDA toz besiyerinden 47 g tartılmıştır. Ardından 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. 50 °C kadar soğuması beklenmiş ve donmadan hedef konsantrasyondaki steril kaspofungin çözeltisi eklenerek besiyeri ile karıştırılmıştır. Steril petri kaplarına 25'er ml dökülmüştür. Deneylerde kullanılacağı zamana kadar 4°C buzdolabında saklanmıştır [95].

3.2.3. Sığır serum albumin agar (SSAA) besiyeri (proteinaz besiyeri)

Glukoz	2 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
Agar	2 g
Distile su	100 ml

Besiyeri karışımı otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Besiyerinin pH'sı 5'e ayarlanmıştır. Besiyerine eklenecek protein çözeltisi; 1 g sığır serum albümin (Fraksiyon V) 100 ml distile su içinde çözülerek ayrıca hazırlanmıştır. Çözelti 0,2 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Otoklavda steril edilen besiyerinin sıcaklığı 50°C'ye geldiğinde % 20 oranında sığır serum albümin çözeltisinden eklenerek petri kaplarına 25 ml olacak şekilde dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Kullanılacağı zamana kadar +4°C de saklanmıştır [96].

3.2.4. Yumurta sarılı agar (YSA) besiyeri (fosfolipaz besiyeri)

NaCl	5,84g
CaCl ₂	0,55 g
SDA	6,5 g
Distile su	100 ml

Besiyerinin pH'sı 5,0'e ayarlanmıştır. Besiyeri için karışım otoklavda 121°C' de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Besiyeri 50°C'ye kadar soğuduğunda % 8 steril yumurta

sarısı eklenmiş ve homojenize olması sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri petri kaplarına dökülmüştür. Kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır [97].

3.2.5. Tween 80 agar besiyeri (esteraz besiyeri)

NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,01 g
Pepton	1 g
Agar	2 g
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 50°C'ye kadar soğuması beklenip içerisine % 0,5 steril tween 80 (Sigma, ABD) eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri petri kaplarına dökülmüştür. Kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır [98].

3.2.6. Koyun kanlı agar besiyeri (hemoliz besiyeri)

Koyun kanlı agar (Sigma, ABD) toz besiyerinden 40 g tartılıp 1 L olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. 50°C'ye kadar soğuması beklenip % 6 steril defibrine koyun kanı eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri petri kaplarına dökülmüştür. Kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır [99].

3.3. Referans Kökenlerinin Kaspofungin için MİK Değerlerinin Elde Edilmesi

Antifungal duyarlılık testleri için Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından mayalar için standardize edilen referans mikrodilüsyon yöntemi M27-A3 kullanılmıştır. Antifungal konsantrasyonu tüm kökenler için 0,03-16 µg/ml arasında hazırlanmıştır. Mutasyon oluşturmak için yapılan pasajlarda aynı konsantrasyon serisi kullanılmıştır [95]. Kaspofungin (Sigma, ABD) yanında amfoterisin B (Sigma, ABD), flukonazol (Sigma ABD), itrakonazol (Sigma, ABD) ve vorikonazol (Sigma, ABD) için duyarlılık ve direnç özellikleri test edilmiştir. Kaspofungin'in duyarlılık sınır değeri olarak CLSI M27-S4 belgesinde yer alan değerlere göre düzenlenmiştir (CLSI M27-A3, CLSI M27-S4, Çizelge 3.1). Deney iki defa tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Candida* kökenlerinin antifungal duyarlılığını değerlendirmede kullanılan CLSI standartları [100].

Tür	Antifungal	CLSI M27-S3			CLSI M27-S4		
		S	SDD/I	R	S	SDD/I	R
<i>C. albicans</i>	Amfoterisin B	≤1	2	≥4	-	-	-
	Kaspofungin	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
	Flukonazol	-	-	-	≤2	4	≥8
	Vorikonazol	-	-	-	≤0,12	0,25–0,5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	Amfoterisin B	≤1	2	≥4	-	-	-
	Kaspofungin	-	-	-	≤2	4	≥8
	Flukonazol	-	-	-	≤2	4	≥8
	Vorikonazol	-	-	-	≤0,12	0,25–0,5	≥1
<i>C. tropicalis</i>	Amfoterisin B	≤1	2	≥4	-	-	-
	Kaspofungin	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
	Flukonazol	-	-	-	≤2	4	≥8
	Vorikonazol	-	-	-	≤0,12	0,25–0,5	≥1
<i>C. glabrata</i>	Amfoterisin B	≤1	2	≥4	-	-	-
	Kaspofungin	-	-	-	≤0,12	0,25	0,5
	Flukonazol	-	-	-	-	≤32	≥64
	Vorikonazol	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	Amfoterisin B	≤1	2	≥4	-	-	-
	Kaspofungin	-	-	-	≤0,25	0,5	≥1
	Flukonazol	-	-	-	-	-	-
	Vorikonazol	-	-	-	≤0,5	1	≥2

*S: Duyarlı, SSD/I: Doza bağlı duyarlı-orta seviyede dirençli, R: Dirençli

3.4. Mutant Kökenlerin Elde Edilmesi

Ekinokandine duyarlı kökenlerin eldesi için, 0,03 µg/ml'den başlayarak 16 µg/ml aralığında artan konsantrasyonlarda kaspofungin (Sigma, ABD) içeren SDA yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır [95]. ATCC kökenleri Sabouraud dekstrozo broth (SDB)'da 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilerek deneye hazır hale getirilmiştir. Sıvı besiyerinden alınarak Mc Farland 0,5'e (10⁶ cfu/ml) olacak şekilde 5 ml PBS içinde sulandırılmıştır. Ardından her üç kökende 0,03 µg/ml'den başlayarak 16 µg/ml'ye kadar artan konsantrasyonlarda kaspofungin içeren SDA'ya yayma ekim yapılmıştır. 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilerek üreme olması beklenmiştir. Bu karşılaştırmalar ardışık olarak devam ettirilmiştir. Kaspofungin konsantrasyonu 0,03 µg/ml'den başlayarak üremenin bittiği konsantrasyona kadar çıkmıştır. Kontrol olarak ilaç içermeyen besiyeri kullanılmıştır. Tüm karşılaştırmalar sonrasında tek koloni olarak elde edilen kökenler kaspofungin dirençli mutant köken olarak kabul edilmiştir. Bu köken % 10 gliserol içinde -80°C'de saklanmıştır [101, 102]. Deney iki defa tekrar edilmiştir.

Artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz bırakılması sonucunda elde edilen mutant kökenlerin mutasyon frekansları belirlenmiştir. Mutasyon frekansları hesaplanırken aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır [103].

$$\text{Mutasyon Frekans} = (\text{Koloni Sayısı (cfu/ml)}) / (\text{Inokulum miktarı})$$

$$\text{Örneğin; } \frac{3 \text{ koloni}}{10^6} = 3 \times 10^{-6} \text{ Mutasyon Frekans}$$

3.5. Mutant Kökenlerinin Kaspofungin MİK Değerlerinin Elde Edilmesi

Ardışık olarak artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz kalarak mutant hale gelen kökenlerin MİK değerleri CLSI M27-A3 protokolüne göre değerlendirilmiştir. ATCC kökenlerinin MİK değerleri ile maruziyet sonrası mutant hale gelen kökenlerin MİK değerleri karşılaştırılmıştır (CLSI M27-A3, CLSI M27-S4) [104, 105]. Deney iki defa tekrar edilmiştir.

3.6. DNA İzolasyonu

Kökenlerden DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, İsviçre) kullanılarak kit protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen total DNA miktarları DNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek DNA varlığı kayıt edilmiştir. Hazırlanan DNA'lar stok solüsyonu içinde -80°C 'de dizi analizi yapılana kadar bekletilmiştir.

3.6.1. DNA izolasyon protokolü

1. Nükleaz içermeyen steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 200 μl test edilecek maya süspansiyonu, 200 μl binding buffer, 40 μl proteinaz K eklenmiştir. Karışım 70°C 'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
2. Karışıma 100 μl isopropanol eklenmiş ve vortekslenmiştir.
3. Filtre tüpü toplama tüpünün içine konulmuş ve filtrenin üzerinden karışım pipetle bırakılmıştır. Tüpler $8,000 \times g$. de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sırasında toplama tüpü atılmış ve yeni bir toplama tüpüne filtre tüpü yerleştirilmiştir.
5. 500 μl yıkama solüsyonu eklenmiş ve tüpler $8,000 \times g$. de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
6. Filtre tüpü temiz steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 200 μl ayrıştırma tamponu filtre tüpünün üst kısmından bırakılmıştır. Tüpler $8,000 \times g$. de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Mikrosantrifüj tüpünde pürifiye edilmiş DNA elde edilmiştir. $15-25^{\circ}\text{C}$ 'de çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

3.7. Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR işlemi sırasında, uygun primer bağlanma sıcaklığı (annealing) ile çalışılmadığında DNA parçaları özgül olmayan bağlanmalar yapabilmektedir. Bu durumun önüne geçilmesi için uygun primer bağlanma sıcaklığının tespit edilmesi gerekmektedir. Gradient PZR, PZR işlemi öncesinde her primer çifti için optimum bağlanma sıcaklığını bulmak için yapılan bir

optimizasyon işlemidir. Gradient PZR için reaksiyon karışımı çizelge 3.2.'de verilmiştir. Gradient PZR için T100 Thermal Cycler (Bio-RAD, ABD) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Gradient PZR reaksiyon karışımı (1X için)

Bileşen	Miktar
10X Standart Taq Buffer (New England Biolabs, M0273S, İngiltere)	2,5 µl
10 mM dNTPs (Thermo Fisher, ABD)	0,5 µl
Forward Primer (10 µM) (Sentegen, Türkiye)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM) (Sentegen, Türkiye)	0,5 µl
Taq DNA Polimeraz Enzimi (New England Biolabs, M0273S, İngiltere)	0,75 µl
DEPC water (Thermo Fisher, ABD)	18,88 µl
Çoğaltılan DNA	2 µl
Toplam	23 µl

3.8. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için hizmet alımı yapılmıştır. Sekans analizi için Sentegen Biotech (Ankara, Türkiye) firması ile çalışılmıştır. Elde ettiğimiz DNA'ların saflaştırma işleminden itibaren sonraki işlemler bu firmada yapılmıştır.

3.8.1. Saflaştırma protokolü

DynaMag-96 side REF12331D cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve Beckman Coulter Ampure XP (REF A63881) (Beckman Coulter, ABD) kiti kullanılarak çalışılmıştır.

1. 96' lık Plate içindeki her bir kuyucuğa 27 µl bead konmuştur. PCR örneklerinden 15'er µl alınarak bead üzerine eklenmiş ve pipetaj yaparak karışması sağlanmıştır. Daha sonra kısa bir vorteks yapılmıştır.
2. Bu şekilde karışım oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir.
3. Plate DynaMag üzerine yerleştirilmiştir. Üst sıvı ve çökelek tamamen ayrılana kadar 3 dk bekletilmiştir.

4. Her bir kuyucuğa 100 µl % 70 lik etanol eklenmiş ve 30 sn bekletilmiştir. Çökeleğe dokunmadan üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Etanolle yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmıştır.
5. Plak “magnetik rack” üzerinde tutulmuş ve çökeleğin oda sıcaklığında 4-5 dk. kuruması beklenmiştir.
6. Plak “magnetik rack” üzerinden alınmış ve her bir kuyucuğa 15 µl “Nuclease-free su” eklenerek çökelek (DNA) çözülene kadar pipetaj yapılmıştır.
7. Plak tekrar “magnetik DynaMag” üzerine yerleştirilmiş ve üst sıvıdaki DNA ayrılana kadar bekletilmiştir.
8. Daha sonra çökeleğe dokunmadan üst sıvı (DNA) alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.

3.8.2. Dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyonu

DNA dizi analizi için T100 Thermal Cycler (Bio-RAD, ABD) cihazı kullanılmıştır. PZR için hazırlanan karışım çizelge 3.3.’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Dizi analizi için “cycle sekans” PZR reaksiyon karışımı (1X için)

Bileşen	Miktar
BigDye	0.5 µl
5X “Sequencing buffer”	2 µl
DEPC treated water unto	10 µl
Primer	0.5 µl
Çoğaltılan DNA	2 µl
Toplam	15 µl

1. Yukarıdaki malzeme miktarları örnek sayısı ile çarpılarak ependorf tüp içerisine alınarak karışım hazırlanmıştır. Çalışma buz üzerinde yapılmıştır.

2. Hazırlanan karışım örnek sayısı kadar 0,2 µl'lik PCR tüpüne 8'er µl alınarak dağıtılmıştır.
3. Üzerlerine saflaştırılan DNA'dan 2'şer µl alınıp eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
4. Ardından örnekler Thermal Cycler'a yerleştirilmiştir.

Dizi analizi için PZR karışımı hazırlandıktan sonra Thermal Cycler'da amplifikasyon işlemine geçilmiştir. Amplifikasyon için çizelge 3.4.'de yer alan reaksiyon şartları uygulanmıştır.

Çizelge 3.4. *FKS* gen bölgelerinin “cycle sekans” için amplifikasyon reaksiyon şartları

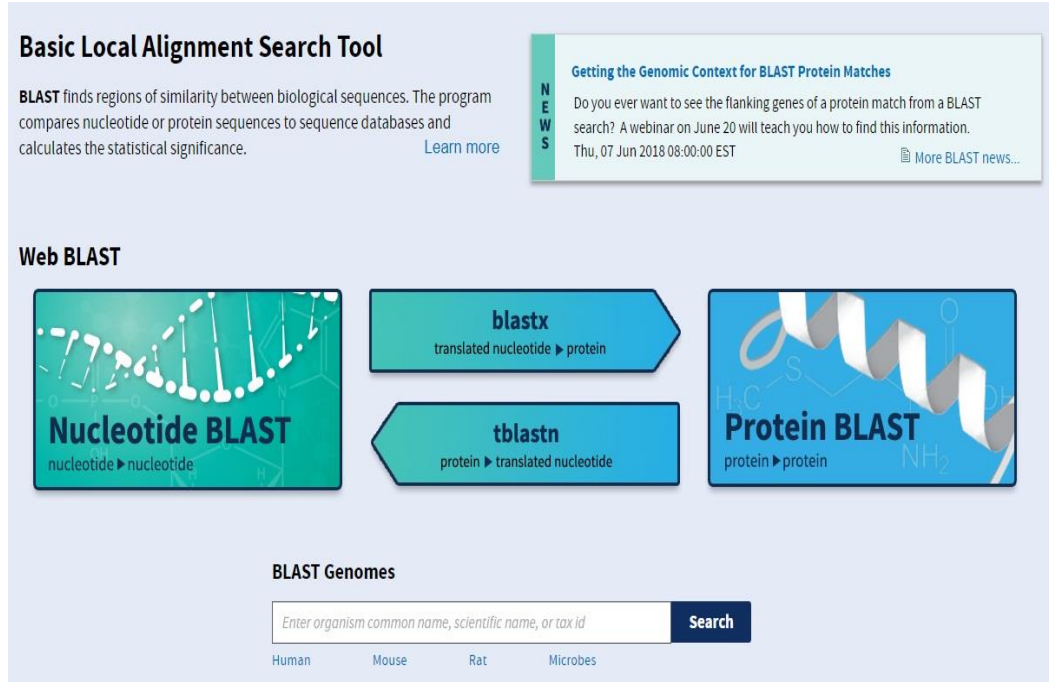
Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Isıtma	96°C	1 Dakika	} 25 Döngü
Denatürasyon	96°C	10 saniye	
Primer Bağlanması	50°C	25 saniye	
Uzama	60°C	4 saniye	
Saklama	4°C	-	

“Cycle sekans” polimeraz zincir reaksiyon örneğinin saflaştırılmasında ZR-96 DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp, ABD) kiti kullanılmıştır. Saflaştırılmış sekans ürünlerinin kapiller elektroforez işlemi ise, ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., ABD) kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen dendogramlar görsel olarak incelenmiş ve düzeltilmiştir.

3.9. Mutasyon Analizinin Yapılması

Ardışık olarak artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz bırakılan kökenlerde *FKS* gen bölgesinde mutasyon olup olmadığının anlaşılması için *FKS1* ve *FKS2* “Hot Spot” bölgelerinin dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizinde daha önce tanımlanmış primer dizileri kullanılmıştır (Çizelge 3.5). *Candida* kökenlerinin hepsinden ayrı ayrı DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lara uygun çoğaltma (annealing) derecesini bulmak için gradient polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandıktan sonra “cycle sekans” yöntemi ile

DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler NCBI nükleotit blastlama motoru (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak incelenmiş ve gen bankasındaki veriler ile çalışmada kullanılan kökenlerin dizileri karşılaştırılmıştır (Resim 3.1). Dizideki baz değişiklikleri kayıt edilmiştir.



Resim 3.1. NCBI nükleotit blast sorgulama motoru

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan hedef primer dizileri

	Primerin Adı ve Kullanılacağı Test	Primer Dizisi	Referans
1	<i>Candida</i> universal <i>FKS1</i> HS1	AAT GGG CTG GTG CTC AAC AT	[106, 107]
	<i>Candida</i> universal <i>FKS1</i> HS1	CCT TCA ATT TCA GAT GGA ACT TGA TG	[107]
2	<i>Candida</i> universal <i>FKS1</i> HS2F	AAG ATT GGT GCT GGT ATG GG	[106]
	<i>Candida</i> universal HS2R	TAA TGG TGC TTG CCA ATG AG	[107]
3	<i>Candida albicans fks1</i> hot spot 1	AATGGGCCGGTGCTCAACA	[108]
	<i>C. albicans fks1</i> hot spot 1	TTCACCATTACATCTCAT	[108]
4	<i>C. albicans fks1</i> hot spot 2	AAGATTGGTGCTGGTATGGG	[108]
	<i>C. albicans fks1</i> hot spot 2	ACCTCTTTCAATCAATTCTTGAACAAC	[108]
5	<i>C. albicans FKS1</i> Ca1-2105F	ACTGTATCTTCTCCATTGGTCGTTC	[109]
	<i>C. albicans FKS1</i> Ca1-2105R*	GAACGACCAATGGAGAAGATACAGT	[109]
6	<i>Candida glabrata</i> FKS1	GTTGCTGCGGTCATGTTCTT	[110]
	<i>C. glabrata</i> FKS1	GCGTTCAGACTTGGGAAAT	[110]
7	<i>C. glabrata FKS1</i> Cg1-3918F*	CGCTCTTGACACGAATCTA	[111]
	<i>C. glabrata FKS1</i> Cg1-3918R	TAGATTTCGTGTGCAAGAGCG	[111]
8	<i>C. glabrata</i> FKS2	GAATGGTGGTTCGTTCCAAG	[110]
	<i>C. glabrata</i> FKS2	TGTTGCTTCTCAGACTTTCACC	[110]
9	<i>C. glabrata</i> FKS2	CTCTGAATCGTACTTCTT	[110]
	<i>C. glabrata</i> FKS2	GATAGGGTCTCTTAGAGA	[110]
10	<i>Candida parapsilosis FKS1</i> Cp1-1070F	ACAAGAACCAGTTCCAGAGGGAGA	[109]
	<i>C. parapsilosis FKS1</i> Cp1-1070F	TCTCCCTCTGGAAGTGGTTCTTGT	[109]
11	<i>C. parapsilosis FKS1</i> Cp1-3818F*	ACTTCACAACCAAGATTGGTGCCG	[111]
	<i>C. parapsilosis FKS1</i> Cp1-3818R	CGGCACCAATCTTGGTTGTGAAGT	[111]
12	<i>C. parapsilosis FKS1</i> Cp1-4941F	GGCATGTTGTGCTGGACCAATGAT	[109]
	<i>C. parapsilosis FKS1</i> Cp1-4941R	ATCATTGGTCCAGCACAACATGCC	[109]

3.10. Virölans Deneyleri

Ardışık olarak artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz bırakılarak mutant hale getirilen ATCC kökenlerinin virölans özellikleri ve fenotiplerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan *in vitro* testler aşağıda sıralanmıştır. Tüm deneyler iki defa tekrar edilmiştir. Deneylerde kontrol grubu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228 kullanılmıştır.

3.10.1. Adezyon deneyi

Steril eküvyon kullanılarak sağlıklı kişilerin yanaklarından sürüntü örneği alınmış ve PBS içerisine aktarılmıştır. Mayalar YEPD besiyeri (% 2 glukoz, % 2 pepton ve % 1,5 maya özütü) içinde 200 rpm’de yatay çalkalayıcıda inkübe edilerek aktif fazda üremeleri sağlanmıştır. Besiyeri santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı PBS ile yıkanarak 0,5 Mc Farland ayarlanmıştır. Maya ve epitel oranı 50:1 olacak şekilde 2 ml PBS bulunan tüpler içinde karıştırılarak 37°C 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda karışımdan 100 µl alınarak lam üzerine yayılmıştır. % 10’luk kristal viyole ile boyanarak incelenmiştir. Mikroorganizmaların tutunup tutunmadıkları 100 epitel hücresi 40X büyütmede sayılarak adezyon yüzdesi hesaplanmıştır [112].

3.10.2. Biyofilm (Slaym) deneyi

Kökenlerin biyofilm oluşturma özelliklerinin tespiti için Christensen ve arkadaşları tarafından *Staphylococcus epidermidis* kökenleri için 1982’de tanımlanan tüp yöntemi kullanılmıştır [113]. Test edilecek kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 24 saatlik taze kültürleri elde edilmiştir. Her kültürden bir öze dolusu alınarak içinde % 8 glukoz bulunan SDB tüplere ekim yapılmıştır. Etüvde 37°C’de 48 saat inkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılmıştır. İki kez distile su ile yıkanarak tüplerin iç yüzeyi % 1’lik safranin ile boyanmıştır. Tüpler ters çevrilerek süzdürülmüştür. İç yan yüzeyinde kırmızı pembe renkli film tabakası oluşması slaym pozitif; tüp duvarında herhangi bir film tabakası oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir [114]. Kontrol grubu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228 kullanılmıştır.

3.10.3. Hemolitik aktivite deneyi

Koyun kanlı agar % 3 oranında SDA içerecek şekilde modifiye edilmiştir ve pH'sı mayaların üremesi için uygun pH olan 5,6'ya ayarlanmıştır. Test edilecek kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 24 saatlik kültürleri elde edilmiştir. Kökenler 5 ml PBS içinde McFarland 0,5 olacak şekilde tüpler içinde hazırlanmıştır. Her tüpten 10 µl maya süspansiyonu otomatik pipet ile alınarak % 3 SDA içeren koyun kanlı agar plaklarına 5 mm çap oluşturacak şekilde inoküle edilmiştir. Aerobik şartlarda etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plaklarda oluşan koloni etrafındaki şeffaf zonlar hemoliz zonu olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

3.10.4 Salgısal aspartil proteinaz (SAP) deneyi

Test edilecek kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültür elde edilmiştir. Üreyen kökenler steril PBS içinde 0,5 Mc Farland (10^6 cfu/ml) olacak şekilde ayarlanmıştır. SSAA besiyerine hazırlanan maya süspansiyonundan 10 µl inoküle edilerek 37°C'de 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda besiyerinin üzerini örtecek şekilde % 20 triklorasetik asit dökülmüş ve 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Triklorasetik asit uygulaması sonrasında plaklar PBS ile yıkanmıştır. Ardından % 0,06 "amidoblack" boyası ile 10 dakika boyanmıştır. "Amidoblack" boyasının çıkartılması için 45:10:45 oranında metanol, asetik asit, distile su çözücüsü hazırlanmıştır. Bu çözücü ile plak yıkanmış ve amidoblack boyası çıkartılmıştır. Plaklar PBS ile yıkanıp kurumaya bırakılmıştır. Koloni etrafında şeffaf zon olan koloniler pozitif olarak değerlendirilirken, şeffaf zon içermeyen koloniler ise negatif olarak değerlendirilmiştir [96, 115]. Salgısal aspartil proteinaz aktivitesinin şiddeti kolonilerin etrafındaki hidroliz zonu ölçülerek ayrıca hesaplanmıştır [116]. Hesaplama inhibisyon çapı/koloni çapı oranı dikkate alınarak yapılmıştır. Sonuçlar için aşağıdaki değerlendirme şeması kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Çalışma da kontrol grubu olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Salgısal aspartil proteinaz (SAP) aktivitesi değerlendirme şeması

Hidroliz Zonu Çapı/Koloni çapı (mm)	SAP aktivitesi
Hidroliz zonu yok	SAP enzim aktivitesi yok
1-2 mm	Orta aktivite
3-5 mm	Güçlü aktivite

3.10.5. Fosfolipaz deneyi

Fosfolipaz enziminin saptanması için yumurta sarılı agar (YSA) besiyeri hazırlanmıştır. Deneyde kullanılacak olan kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 37°C’de 24 saat inkübe edilerek taze kültür elde edilmiş, ardından her bir test edilen köken için steril PBS içinde 0,5 Mc Farland süspansiyonları hazırlanmıştır. Maya süspansiyonlarından otomatik pipet ile 10 µl alınarak her plağa 2 cm çapında olacak şekilde inoküle edilmiştir. Plaklar 37°C’de 4 gün inkübe edilmiştir. Kolonilerin etrafında halka şeklinde oluşan prepitasyon zonu ölçülmüştür [117]. Fosfolipaz deneyi için kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

3.10.6. Esteraz deneyi

Esteraz üretiminin gözlenmesi için Tween 80 agar besiyeri kullanılmıştır. Deneyde kullanılacak olan kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 37°C’de 24 saat inkübe edilerek taze kültür elde edilmiş, ardından her bir test edilen köken için steril PBS içinde 0,5 Mc Farland süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyondan otomatik pipet ile 10 µl alınarak 2 cm çapında tween 80 agar besiyerine ekilmiştir. Plaklar 37°C’de 10 gün inkübe edilmiştir. Ekim zonu çevresinde opak kristal çökeltilerin oluşması pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir [117]. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökenleri kontrol olarak kullanılmıştır.

3.10.7. *Galleria mellonella* in vivo virülans deneyi

In vivo virülans deneyi olarak *Galleria mellonella* larvaları kullanılarak yapılmıştır. *Galleria mellonella* 28°C± 2°C,% 60 ± 5 bağıl neme sahip karanlık laboratuvar ortamında yetiştirilmiştir. Stok kültürün devamı için larvaların geliştirildiği besiyerleri 3 haftada bir

yenilenmiştir. *G. mellonella* ergin erkek ve dişi güvelerin çiftleşmesi sonucunda gelişen yumurtalar ile larvaların devamlılıkları sağlanmıştır. *In vivo* virölans deneyinde kullanılacak larvaların beslenmesi için yarı sentetik bir ortam kullanılmıştır. Larvaların gelişiminde kullanılan besiyerinin (100 gram için) hazırlanışı çizelge 3. 7'deki gibidir;

Çizelge 3.7. *G. mellonella* larvalarının gelişiminde kullanılan besiyeri içeriği (100 g için) [94]

Malzemeler	Miktar
Buğday unu	22 g
Buğday kepeği	22 g
Süt tozu	11 g
İnstant ekmek mayası	5,5 g
Balmumu	17,5 g
Gliserol	11 ml
Bal (Süzme)	11 ml

Besiyerini oluşturan toz halindeki tüm ürünler karıştırılmıştır. Balmumu rende kullanılarak küçük parçalar haline getirilmiştir. Sonrasında balmumu da karışımın üzerine eklenmiştir. Bal ve gliserol eklenmiş, ardından tüm içerik karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Karışım kavanozlara konmuştur. En son larvalar kavanoza yerleştirilmiştir (Resim 3.2.). İçerdikleri larva sayıları, besiyerinin hazırlanma tarihi vb. bilgiler not edilerek kavanozlar etüve yerleştirilmiştir. Kavanozların ağzı kapatılarak uygun şartlarda üremeleri beklenmiştir (Resim 3.3.).

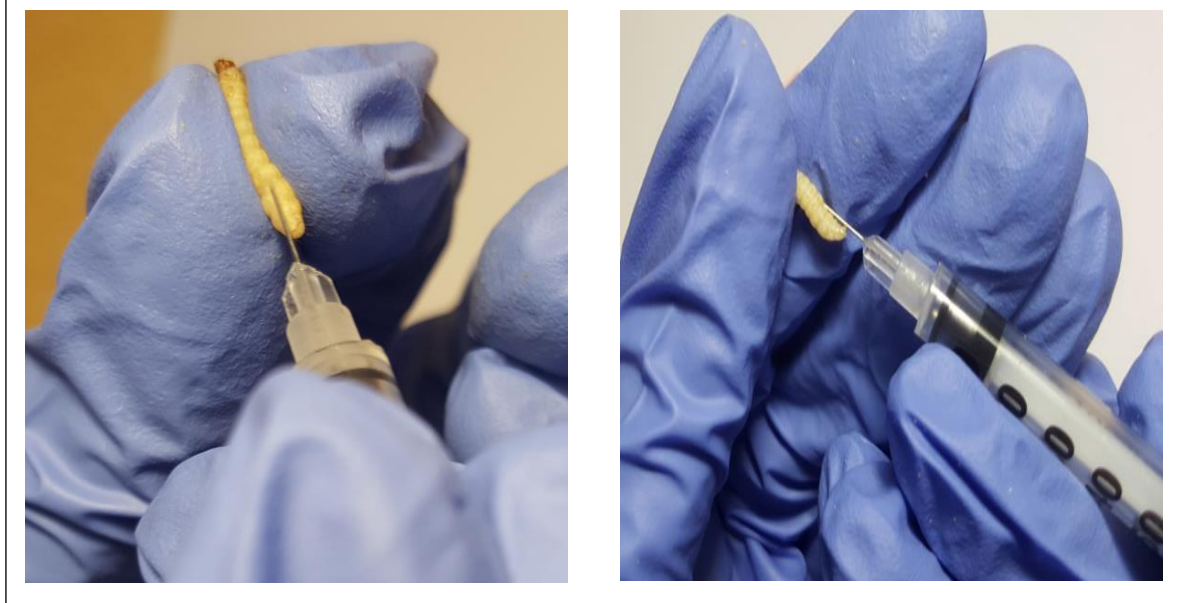


Resim 3.2. Hazırlanmış besiyeri ve *G. mellonella* larvalarının bulunduğu kavanoz



Resim 3.3. *G. mellonella* larvalarının etüvde gelişimi

Etüv içinde gelişimlerini sürdüren larvalar yaklaşık 5 cm büyüklükğine ulaştıklarında deneyde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Rastgele 10'ar adet 300 mg civarında beyaz renkli larva seçilerek steril petrilere dağıtılmıştır. ATCC kökenleri ve direnç kazandırılmış kökenler SDA besiyerine pasajlanarak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültür elde edilmiş, ardından test edilen her köken için steril serum fizyolojik içinde 0,5 Mc Farland süspansiyonları hazırlanmıştır. Her larvanın arka sol bacak içine ppd enjektörü ile 10 µl maya süspansiyonu doğrudan uygulanmıştır (Resim 3.3.). Enfeksiyon modeli yapılırken kontrol grubu olarak hiç işlem uygulanmamış larvalar kullanılmıştır. Maya kökenleri ile enfekte edilen larvalar 30°C'de inkübe edilerek her gün yaşayan larva sayısı not edilmiştir. Canlı larva sayıları ile "Kaplan Meier" (sağ kalım) eğrileri çizilmiştir [94].



Resim 3.4. Ppd enjektörü kullanılarak sol arka bacak içine *Candida* kökenlerinin enjekte edilmesi

3.11. İstatistik Analizi

Daha önce kaspofungine maruz kalmamış referans kökenler ile artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz kalan kökenlerin *Galleria mellonella* larvasına enjekte edildikten sonra referans köken ile mutant köken arasında virulans açısından bir artış olup olmadığını anlamak ve virulansın, larvaların hayatta kalma ortalamaları farkının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını olduğunu ortaya koymak amacıyla SPSS 22.0 (Statistical Progame for the Social Sciences, Chicago, ABD) programı ile bağımsız örneklem T testi (Indipendent Samples T Test) yapılmıştır. Bağımsız örneklem T testi iki ana kütle örnekleme ortalaması arasındaki farkı araştırmada kullanılan en yaygın yöntem olduğu için çalışmada tercih edilmiştir.

Referans kökenler ve kaspofungine maruz bırakılarak direnç kazandırılan kökenlerin *in vitro* virülans özelliklerine ait sonuçların nominal olması ve örneklem hacminin düşük olması sebebi ile anlamlı bir istatistiksel sonuç elde edilememiştir.

.

4. BULGULAR

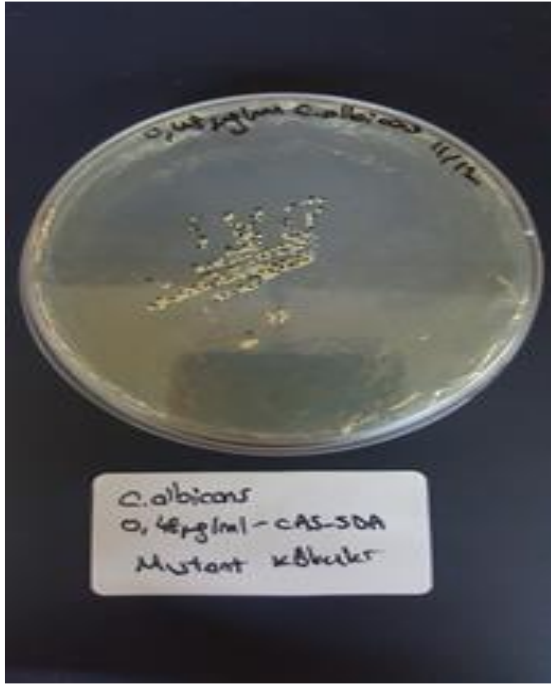
4.1. Mutant Kökenlerin Elde Edilmesi

Ekinokandine dirençli kökenlerin eldesi için, 0,03 µg/ml'den başlayarak 16 µg/ml'ye kadar artan konsantrasyonlarda kaspofungin içeren SDA besiyerinde ardışık pasajlamalar yapılmıştır. *C.albicans* ATCC 10231 0,48 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda ürerken, *C. glabrata* ATCC MYA-2950 0,18 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda üremiştir. *C.parapsilosis* ATCC 22019 ise 1,48 µg/ml'de üremiştir (Sırasıyla resim 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4). Bu konsantrasyonlar dirençli kolonilerin elde edildiği konsantrasyonlar olarak kayıt edilmiştir. Dirençli kökenlerin eldesi için yapılan çalışmalarda dirençli olma konsantrasyonları en yüksek 1,48 µg/ml kaspofunginde gerçekleştiği için 2 µg/ml konsantrasyonuna kadar denenmiş daha yüksek konsantrasyonlara çıkılmamıştır. Sonuçlar çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

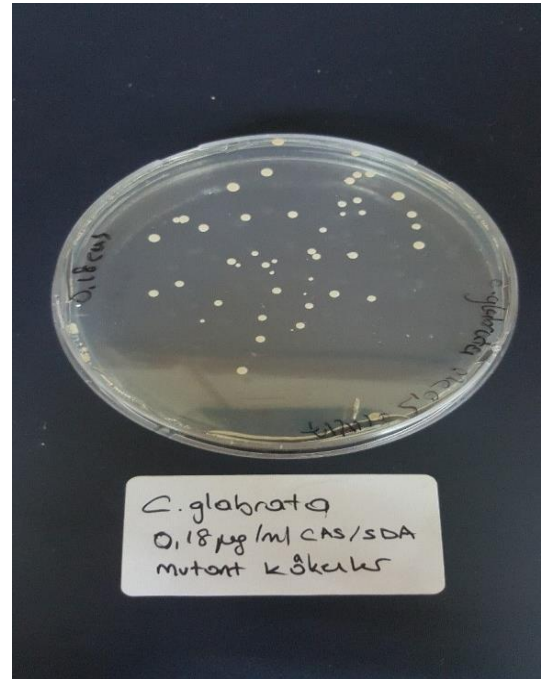
Çizelge 4.1. Kaspofungin maruziyeti sonrası elde edilen dirençli kökenlerin ürettiği konsantrasyon

Köken Adı	0,03 µg/ml	0,06 µg/ml	0,12 µg/ml	0,18 µg/ml	0,24 µg/ml	0,32 µg/ml	0,38 µg/ml	0,42 µg/ml	0,48 µg/ml	0,52 µg/ml	0,60 µg/ml	0,70 µg/ml	0,80 µg/ml	0,90 µg/ml	1 µg/ml	1,10 µg/ml	1,20 µg/ml	1,30 µg/ml	1,40 µg/ml	1,44 µg/ml	1,48 µg/ml	1,50 µg/ml	1,52 µg/ml	1,60 µg/ml	1,70 µg/ml	1,80 µg/ml	1,90 µg/ml	2 µg/ml
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<i>C.glabrata</i> MYA 2950	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

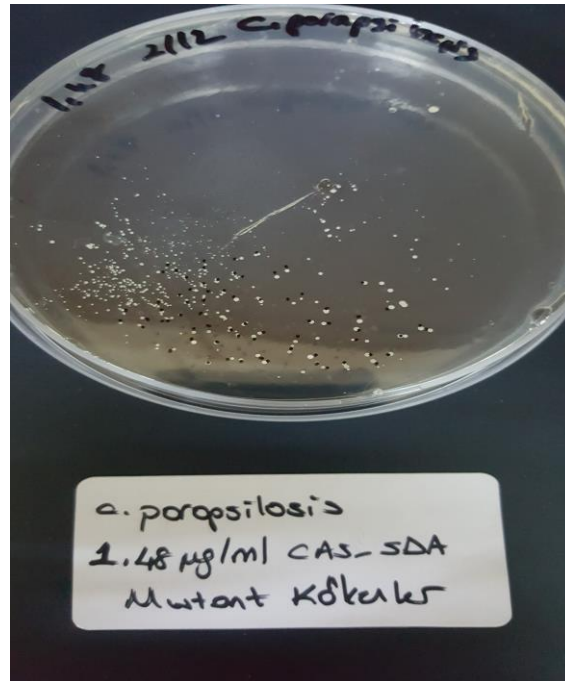
+: Üreme var Ø: Üreme Yok



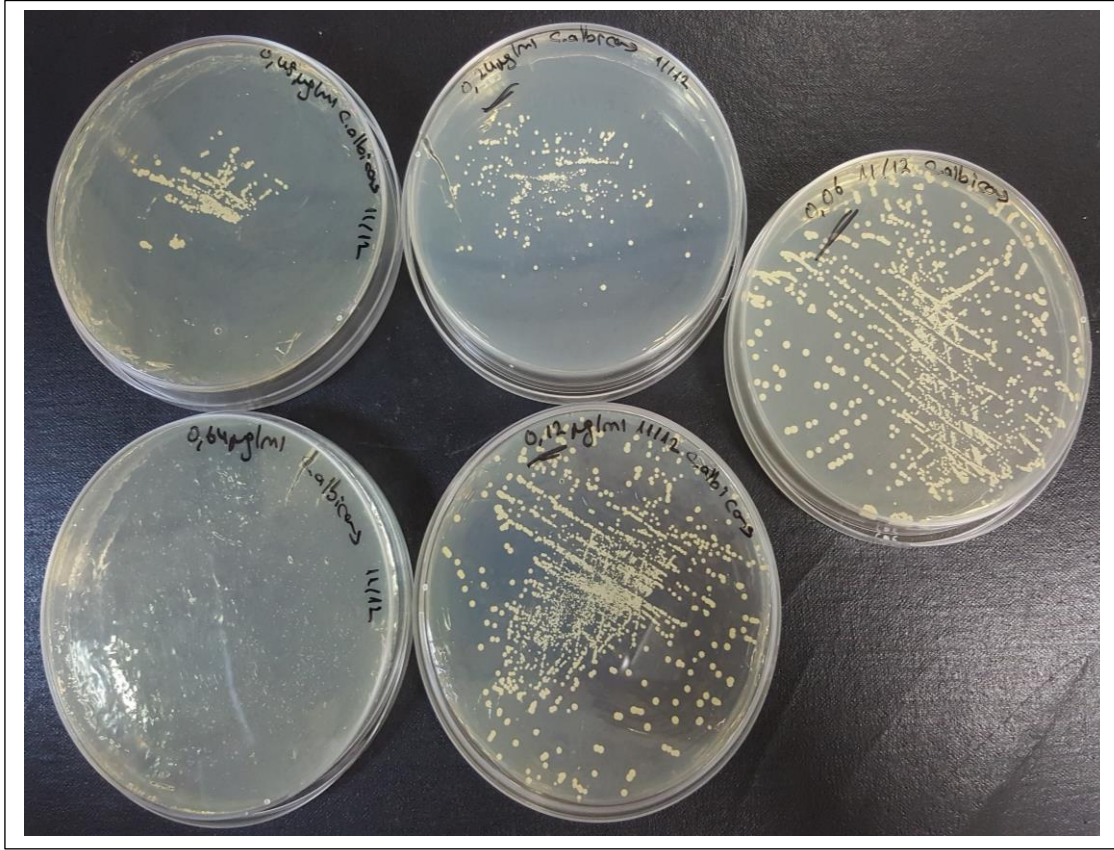
Resim 4.1. Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli yapılan *C. albicans* kökeni



Resim 4.2. Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli yapılan *C. glabrata* kökeni



Resim 4.3. Kaspofunine maruz bırakılarak dirençli yapılan *C. parapsilosis* kökeni



Resim 4.4.C. *albicans*'ın kaspofungin içeren SDA besiyerinde dirençli hale gelmesi

Kökenlerin artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz bırakılması sonucunda belirlenen direnç kazanmış kökenlerin mutasyon frekansları belirlenmiştir. *C. albicans* direnç kazanmış kökeni mutasyon frekansı $1,5 \times 10^{-5}$, *C. glabrata* mutant kökeni mutasyon frekansı 1×10^{-4} ve *C. parapsilosis* mutant kökeni mutasyon frekansı 1×10^{-4} olarak belirlenmiştir.

4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Candida albicans ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida glabrata* ATCC MYA-2950 referans kökenleri ve ardışık olarak artan konsantrasyonlarda sürekli kaspofungine maruz kalarak dirençli hale gelen kökenlerin 37°C’de 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrası minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. CLSI M27-S4 ve S3 standartlarına göre değerlendirildiğinde ATCC kökenlerinin dirençli mutant kökenleri ile karşılaştırıldığında 1 ya da 2 kat MİK değerlerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda *C. albicans* direnç kazanmış kökeninin vorikonazol MİK değeri 0,25 µg/ml, *C. parapsilosis* direnç kazanmış kökeninin 0,5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu köken orta seviye dirençli (I; intermediate) olarak belirlenirken, ATCC kökenleri ve mutant kökenler tüm antifungallere duyarlı olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Referans kökenler ve kaspofungine maruz bırakılan kökenlerin MİK sonuçları

Antifungal Adı	24 Saat Sonunda (µg/ml)						48 Saat Sonunda (µg/ml)					
	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>C.albicans</i> mutant	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C.parapsilosis</i> mutant	<i>C.glabrata</i> ATCC MYA 2950	<i>C.glabrata</i> mutant	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>C.albicans</i> mutant	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C.parapsilosis</i> mutant	<i>C.glabrata</i> ATCC MYA 2950	<i>C.glabrata</i> mutant
Amfoterisin B	0,03 (S*)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)
Flukonazol	0,5 (S)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	8 (S)	16 (S)	0,5 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	8 (S)	16 (S)
Vorikonazol	0,125 (S)	0,25 (I*)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,25 (I)	0,125 (S)	0,5 (I)	0,125 (S)	0,125 (S)
Itrakonazol	0,03 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	0,125 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)
Kaspofungin	0,03 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	0,5 (S)	0,03 (S)	0,03 (S)

*S: Duyarlı

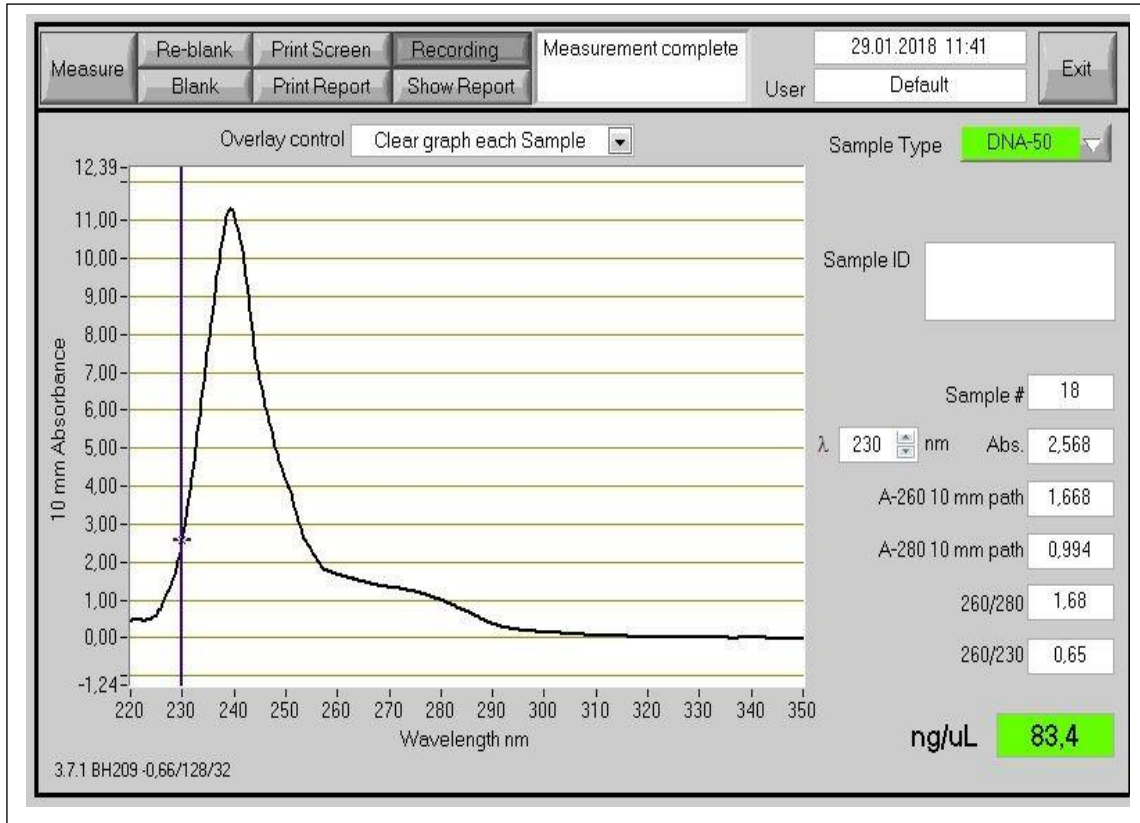
*I: Orta seviye dirençli (intermediate)

4.3. DNA Dizi Analizi İzolasyonu ve Nükleik Asit Ölçümü Sonuçları

Kaspofungine maruz bırakılarak dirençli hale gelen kökenlerin *FKS* gen bölgesindeki baz diziliminde değişime sebep olup olmadığını anlamak için dizi analizi yapılmıştır. Bu işlem için hem ATCC hem de mutant olduğu düşünülen *Candida* kökenlerinin DNA'sı The High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, İsviçre) kullanılarak izole edilmiştir. Genomik DNA izolasyon sonrasında DNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak (NanoDrop, Thermo Scientific, ABD) ölçülmüştür. DNA izolasyonu üç kere tekrar edilmiştir. DNA izolasyon çalışmaları sonucunda DNA miktarı ve saflığı (260/280 nm) en iyi olan izolatlar kullanılmıştır (Resim 4.5). Dizi analizinde kullanılmak üzere seçilen DNA izolatlarının ölçüm sonuçları Çizelge 4.3 de gösterilmiştir. DNA eldesi üç kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 4.3. Kökenlerden elde edilen DNA miktarları

Köken Adı	DNA Miktarı (ng/μL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	57,6
<i>C. albicans</i> mutant	106,6
<i>C.glabrata</i> ATCC MYA-2950	62,4
<i>C.glabrata</i> mutant	83,4
<i>C.paraspsilosis</i> ATCC 22019	39,5
<i>C.paraspsilosis</i> mutant	30,8



Resim 4.5. *C. glabrata* mutant kökene ait DNA analizinin NanoDrop analiz ekran görüntüsü

4.4. Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Candida kökenlerinde elde edilen DNA izolasyonu sonrasında PZR işlemi yapılmadan önce primer optimizasyonu ve primerin bağlanma sıcaklığının tespiti için her primer çifti için “gradient” PZR yapılmıştır. Primer listesinde de belirtilen *Candida* universal *FKS1 HS1* primeri için en iyi 62,1°C’de bant oluştururken, *C. albicans FKS1* Ca1-2105F primeri, *C. albicans fks1* hot spot 2 primeri ve *C. glabrata FKS1* primeri için 58,5°C’de en iyi bantları vermiştir (Resim 4.6).



Resim 4.6. *Candida* universal *FKS1 HS1* primeri için yapılan gradient PZR elektroforez sonucu

4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan 12 primer çiftinden 4 primer çifti (*Candida* universal FKS1 HS1 (1. primer), *Candida* universal FKS1 HS2F (2. primer) ve mutasyon primerleri olan *C. albicans* fks1 hot spot 2 (4. primer) ve *Candida glabrata* FKS1 (6. primer) primerleri, yapılan PZR ile bağlanabilmiştir. Bu nedenle DNA dizileme ve PZR işlemleri sadece bu primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

C. albicans ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 ATCC kökenlerinin ve tüm direnç kazandırılmış kökenlerin çalışmada kullanılan tüm primerler ile PZR ve dizileme işlemleri ayrı ayrı yapılmıştır. Dizi analizi işlemleri tamamlandıktan sonra elde edilen elektrogramlar SnapGene Viewer 4.1.9 (Chicago, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir. Kromotogram verileri NCBI gen bankasında “Blast” arama motoru (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak, gen bankasındaki veriler ile karşılaştırılmıştır.

Kaspofungin ile karşılaştırılmamış *C. albicans* ATCC 10231 kökenin 1., 2. ve 4. primerler kullanılarak dizi analizi yapılmıştır. Analizden elde edilen dizi gen bankası verileri ile karşılaştırıldığı zaman, her üç primer kullanılarak yapılan dizilemede herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Blast sonuçları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.4-4.8).

Çizelge 4.4. *C. albicans* ATCC 10231 blast analizi sonuçları

Köken Adı	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Kullanılan Primer	Candida universal HS2R (2. Primer)
Primer Dizisi	TAA TGG TGC TTG CCA ATG AG
Referans	[107]
Baz Sayısı	606
Request ID	G350KWSS01R

Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 1B Sequence ID: CP025158.
Length: 3186810 Number of Matches: 1

Query	7	AATC-ACATC-ATCTTGCT-CCATATAAATGGATGAATCAGCAAAACGTGAATACAAGAT	63
Sbjct	507209	AATCAACATCAATCTTGCTCCCATATAAATGGATGAATCAGCAAAACGTGAATACAAGAT	507268
Query	64	TGAAAATGGAATTCTTGAAGTGGCAAAACCTCTACCAGTGGAAATATATCTAGCACCACC	123
Sbjct	507269	TGAAAATGGAATTCTTGAAGTGGCAAAACCTCTACCAGTGGAAATATATCTAGCACCACC	507328
Query	124	AACGGTCAAATCAGTGAAAACCGATGATGAATAAATTTGAGCAACGAAAACCTTCGAAAAA	183
Sbjct	507329	AACGGTCAAATCAGTGAAAACCGATGATGAATAAATTTGAGCAACGAAAACCTTCGAAAAA	507388
Query	184	TGGTGACATGGAAATAAATGTCTAACAATCTTTGGAACGCTTTCCATACCCCTCTTTC	243
Sbjct	507389	TGGTGACATGGAAATAAATGTCTAACAATCTTTGGAACGCTTTCCATACCCCTCTTTC	507448
Query	244	AATCAATTCTTGTACAACCAATGGAATGAAAGAAATGAAGAAAACAATGAAAATAGACAA	303
Sbjct	507449	AATCAATTCTTGTACAACCAATGGAATGAAAGAAATGAAGAAAACAATGAAAATAGACAA	507508
Query	304	AGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCAATATTGTAACAACCAATGGATACAA	363
Sbjct	507509	AGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCAATATTGTAACAACCAATGGATACAA	507568
Query	364	AACATCAGTAACCTGGGACATCTTTGTTGTAAGAACACATGATAGCTTCATGAGCTAATGA	423
Sbjct	507569	AACATCAGTAACCTGGGACATCTTTGTTGTAAGAACACATGATAGCTTCATGAGCTAATGA	507628
Query	424	ATTCAAGTTAGCCAACACCAAAATAAACACTTGTAAGACAATTGAATAAACAAGTTATT	483
Sbjct	507629	ATTCAAGTTAGCCAACACCAAAATAAACACTTGTAAGACAATTGAATAAACAAGTTATT	507688
Query	484	AATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAATGACAAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGT	543
Sbjct	507689	AATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAATGACAAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGT	507748
Query	544	ACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTGTTCTCCCATAC-AGCCCCAA	595
Sbjct	507749	ACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTGTTCTCCCATACAGCACCAA	507801

* Query: Sorgulanan dizi, Subject: Gen Bankasında mevcut dizi

Çizelge 4.4.(devamı) *C. albicans* ATCC 10231 blast analizi sonuçları

Köken Adı	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Kullanılan Primer	<i>C. albicans</i> fks1 hot spot 2 (4. Primer)
Primer Dizisi	ACCTCTTTCAATCAATTCTTGAACAAC
Referans	[108]
Baz Sayısı	335
Request ID	G361MV68014

Candida albicans SC5314 1,3-beta-glucan synthase (GSC1), partial mRNA
Sequence ID: XM_716336.2 Length: 5694 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
577 bits(312)	9e-161	320/323(99%)	3/323(0%)
Query 13	ATGAAG--AACAATG-AAATAGACAAAGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCA	69	
Sbjct 4115	ATGAAGAAAACAATGAAAATAGACAAAGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCA	4056	
Query 70	ATATTGTAACAACCAAATGGATACAAAACATCAGTAACTGGGACATCTTTGTTGTAAGAA	129	
Sbjct 4055	ATATTGTAACAACCAAATGGATACAAAACATCAGTAACTGGGACATCTTTGTTGTAAGAA	3996	
Query 130	CACATGATAGCTTCATGAGCTAATGAATTCAAGTTAGCCAACACCAAAAATAAACACTTGT	189	
Sbjct 3995	CACATGATAGCTTCATGAGCTAATGAATTCAAGTTAGCCAACACCAAAAATAAACACTTGT	3936	
Query 190	AAAGACAATTGAATAAACAAGTTATTAATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAATGAC	249	
Sbjct 3935	AAAGACAATTGAATAAACAAGTTATTAATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAATGAC	3876	
Query 250	AAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGTACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTTGT	309	
Sbjct 3875	AAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGTACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTTGT	3816	
Query 310	TCTCCCATACCAGCACCAATCTT	332	
Sbjct 3815	TCTCCCATACCAGCACCAATCTT	379	

* Query: Sorgulanan dizi, Subject: Gen Bankasında mevcut dizi

Çizelge 4.4.(devamı) *C. albicans* ATCC 10231 blast analizi sonuçları

Köken Adı	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Kullanılan Primer	<i>C. albicans</i> fks1 hot spot 2 (4. Primer)
Primer Dizisi	AAGATTGGTGCTGGTATGGG
Referans	[108]
Baz Sayısı	333
Request ID	G32T4EVY01R

Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 1B

Sequence ID: CP025158.1 Length: 3186810 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
577 bits(312)	9e-161	320/323(99%)	3/323(0%)
Query 13	ATGAAG--ACAATG-AAATAGACAAAGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCA	69	
Sbjct 507483	ATGAAGAAAACAATGAAAATAGACAAAGTATAACGTCTAATCCAATCAACGGCAGGAGCA	507542	
Query 70	ATATTGTAACAACCAAATGGATACAAAACATCAGTAACTGGGACATCTTTGTTGTAAGAA	129	
Sbjct 507543	ATATTGTAACAACCAAATGGATACAAAACATCAGTAACTGGGACATCTTTGTTGTAAGAA	507602	
Query 130	CACATGATAGCTTCATGAGCTAATGAATTCAAGTTAGCCAACACCAAATAAACACTTGT	189	
Sbjct 507603	CACATGATAGCTTCATGAGCTAATGAATTCAAGTTAGCCAACACCAAATAAACACTTGT	507662	
Query 190	AAAGACAATTGAATAAACAAGTTATTAATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAAATGAC	249	
Sbjct 507663	AAAGACAATTGAATAAACAAGTTATTAATATGGAAACCTGGATGACCATAGTAAAATGAC	507722	
Query 250	AAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGTACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTGT	309	
Sbjct 507723	AAAAATCTATCCAATGGAAGTTGAGTACCCAAATAGAAATATTCTCTTGAAAGCATTGT	507782	
Query 310	TCTCCCATACCAGCACCAATCTT	332	
Sbjct 507783	TCTCCCATACCAGCACCAATCTT	507805	

* Query: Sorgulanan dizi, Subject: Gen Bankasında mevcut dizi

C. parapsilosis ATCC 22019 kökeninin dizi analizi sonucunda elde edilen verilerin NBCI “blast” motorunda tarama sonucunda bir mutasyona rastlanmamıştır. Buna karşılık kaspofungin ile karşılaştırılarak dirençli hale getirilen *C. parapsilosis* kökeninin “Candida universal FKS1 HS2F” (2.primeri) primeri ile yapılan çalışma sonrası gen bankasındaki eşleşmelerde *FKS1* geni Hot Spot 2 bölgesinin 69. pozisyonda bir nokta mutasyon meydana geldiği belirlenmiştir. Pozisyondaki delesyon yerine sitozin nükleotiti (C) değişmiştir. Böylece kaspofungin ile karşılaştırılarak dirençli hale getirilen *C. parapsilosis* kökeninin mutant olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.5. *C. parapsilosis* ATCC 22019 blast analizi sonuçları

Köken Adı	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Kullanılan Primer	Candida universal FKS1 HS1 (1. Primer)
Primer Dizisi	AAT GGG CTG GTG CTC AAC AT
Referans	[106], [107]
Baz Sayısı	772
Request ID	G2KJCDH8014

Candida parapsilosis beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit 1 (FKS1) gene, complete cds Sequence ID: EU221325.1 Length: 7670Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities
1363 bits(738)	0.0	745/748(99%)
Query 11	TTGA-TTTGATCTTTTTGGT-AACTTGGCTCCGGTTGTGTACACTTTTAAAGTTGCAGGA	68
Sbjct 2657	TTGATTTTGTATCTTTTTGGTAAACTTGGCTCCGGTTGTGTACACTTTTAAAGTTGCAGGA	2716
Query 69	TTGACTTTTATACTCCAAGTCCTCATATGCACTTTCTGTTGTTGGATTCTTCATTGCTGTT	128
Sbjct 2717	TTGACTTTTATACTCCAAGTCCTCATATGCACTTTCTGTTGTTGGATTCTTCATTGCTGTT	2776
Query 129	GCAACTTTGGTTTTCTTTGCTGTGCATGCCTTTGGGAGGTTTGTTCACCTCGTATATGAAC	188
Sbjct 2777	GCAACTTTGGTTTTCTTTGCTGTGCATGCCTTTGGGAGGTTTGTTCACCTCGTATATGAAC	2836
Query 189	AAGAGGTCGAGGAGGTACATCTCGTCTCATACTTTTACTGCAAACCTTTGTCAAGTTAAGA	248
Sbjct 2837	AAGAGGTCGAGGAGGTACATCTCGTCTCATACTTTTACTGCAAACCTTTGTCAAGTTAAGA	2896
Query 249	GGATTGGACATGTGGATGTCGATTTGTTGTTGGGTCTTGGTTTTCCTAGCAAAGTTGGTT	308
Sbjct 2897	GGATTGGACATGTGGATGTCGATTTGTTGTTGGGTCTTGGTTTTCCTAGCAAAGTTGGTT	2956
Query 309	GAATCTTATTTCTTCTTGACTTTGTGCATTGAGAGATGCTATTAGAAACTTGTCAAAGACC	368
Sbjct 2957	GAATCTTATTTCTTCTTGACTTTGTGCATTGAGAGATGCTATTAGAAACTTGTCAAAGACC	3016
Query 369	ACAATGAGATGTACCGGTGAAGTTTGGTATGGTGACATTGTCTGTAGACAACAAGCCAAG	428
Sbjct 3017	ACAATGAGATGTACCGGTGAAGTTTGGTATGGTGACATTGTCTGTAGACAACAAGCCAAG	3076
Query 429	ATTGTGTTGGGATTGATGTACGCTGTGCGATTGTTGTTGTTCTTTTGGATACCTACTTG	488
Sbjct 3077	ATTGTGTTGGGATTGATGTACGCTGTGCGATTGTTGTTGTTCTTTTGGATACCTACTTG	3136
Query 489	TGGTACATTATCTGTAATTGTATCTTTTCCATTGGTCGTTTCTTCTATTGGGTATCTCA	548
Sbjct 3137	TGGTACATTATCTGTAATTGTATCTTTTCCATTGGTCGTTTCTTCTATTGGGTATCTCA	3196
Query 549	ATCTTGACACCATGGAGAAACATCTTTACCAGATTACCAAAGAGAATTTACTCAAAGATT	608
Sbjct 3197	ATCTTGACACCATGGAGAAACATCTTTACCAGATTACCAAAGAGAATTTACTCAAAGATT	3256

Çizelge 4.6. *C. parapsilosis* mutant blast analizi sonuçları

Köken Adı	<i>C. parapsilosis</i> mutant
Kullanılan Primer	Candida universal FKS1 HS2F (2. Primer)
Primer Dizisi	AAG ATT GGT GCT GGT ATG GG
Referans	[106]
Baz Sayısı	607
Request ID	G31CPBM9014

Candida parapsilosis strain CDC317 annotated contig 005569

Sequence ID: HE605203.1 Length: 2235583 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
1061 bits(574)	0.0	589/595(99%)	6/595(1%)
Query 5	GTCTA-AG-AT-TTACTACTTGTCA-CTC-ATTGCCATTGGATAGGTTCTTGTCATTCTA	59	
Sbjct 1374330	GTCTAGAGAATATTACTACTTGTCAACTCAATTGCCATTGGATAGGTTCTTGTCATTCTA	1374271	
Query 60	CTACGGACAATCTCCTGGTTTCCATATCAATAACTTGTATTATCAATTGTCCTTGCAAGTCT	119	
Sbjct 1374270	CTACGGACAATCTCCTGGTTTCCATATCAATAACTTGTATTATCAATTGTCCTTGCAAGTCT	1374212	
Query 120	TTATGTTGGTGTGGCAAACCTGAACTCATTTGGCACACGAGTCAATTATTTGTTTCGTATG	179	
Sbjct 1374211	TTATGTTGGTGTGGCAAACCTGAACTCATTTGGCACACGAGTCAATTATTTGTTTCGTATG	1374152	
Query 180	ATAGAGATGTTCCAGTCACTGATGTCTTGTATCCATTTGGTTGTTACAACATTGCTCCTG	239	
Sbjct 1374151	ATAGAGATGTTCCAGTCACTGATGTCTTGTATCCATTTGGTTGTTACAACATTGCTCCTG	1374092	
Query 240	CTGTTGACTGGATTAGACGTTACACCTTGCTATCTTTATTGTGTTCTTCATTTTCGTTCA	299	
Sbjct 1374091	CTGTTGACTGGATTAGACGTTACACCTTGCTATCTTTATTGTGTTCTTCATTTTCGTTCA	1374032	
Query 300	TTCCATTGGTTGTTCAAGAGTTGATTGAAAGAGGTGTGTGGAAAGCTTGTCAAAGATTG	359	
Sbjct 1374031	TTCCATTGGTTGTTCAAGAGTTGATTGAAAGAGGTGTGTGGAAAGCTTGTCAAAGATTG	1373972	
Query 360	TTAGACATTTTCATTTTCGTTGTACACCTATGTTTGAAGTTTTTGTGTGCCCAAATTTATTCAT	419	
Sbjct 1373971	TTAGACATTTTCATTTTCGTTGTACACCTATGTTTGAAGTTTTTGTGTGCCCAAATTTATTCAT	1373912	
Query 420	CATCTGTTTTTCACCGATTTAACTGTTGGTGGTGCCAGGTATATTTCAACCGGTAGAGGTT	479	
Sbjct 1373911	CATCTGTTTTTCACCGATTTAACTGTTGGTGGTGCCAGGTATATTTCAACCGGTAGAGGTT	1373852	
Query 480	TTGCCACTTCAAGAAATCCCCCTTTCCATCTTGTACTCCCGTTTTGCTGACTCGTCAATTT	539	
Sbjct 1373851	TTGCCACTTCAAGAAATCCCCCTTTCCATCTTGTACTCCCGTTTTGCTGACTCGTCAATTT	1373792	
Query 540	ATATGGGTGCTAGATTGATGTTGATTTTGTGTTTGGAAACCGTTGCTCATTGGCA	594	

C. glabrata ATCC MYA 2950 kökeni ve ondan elde edilen kaspofungine dirençli köken için 1. 2. ve 6. primer ile çalışılarak mutasyon varlığı araştırılmıştır. *C. glabrata* ATCC MYA 2950 kökeninin *Candida glabrata FKS1* (6. primer) primer çifti kullanılarak PZR'si yapılmış ve ardından DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Kromotogram verilerinin blastlanması referans kökenin sonucunda gen bankası verilerine göre bir mutasyon ile karşılaşılmamıştır. *FKS1* gen bölgesinde yine aynı primer çifti (ileri ve geri) kullanılarak dirençli kökenle yapılan dizi analizinde, ileri (forward) primeri ile yapılan dizilemede 203. pozisyonundaki bazda timin nükleotidi (T) sitozin nükleotidine (C) dönüştüğü gözlemlenmiştir. Böylece kaspofungine maruz bırakılarak dirençli hale gelen *C.glabrata* kökeninin mutant olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.7. *C. glabrata* ATCC MYA 2950 blast analizi sonucu

Köken Adı	<i>C. glabrata</i> ATCC MYA 2950
Kullanılan Primer	<i>Candida glabrata FKS1</i> (6.primer)
Primer Dizisi	GTTGCTGCGGTCATGTTCTT
Referans	[110]
Baz Sayısı	544
Request ID	G33W3MU3014

Candida glabrata strain 66032uC.2b beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit (FKS1) gene, complete cds Sequence ID: HQ845283.1 Length: 5768Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
976 bits(528)	0.0	532/534(99%)	0/534(0%)
Query 10	ATTTTCTCAGTCATGCCATTGGGTGGTCTGTTACGTCCTACATGCAAAAGTCTACCAG	69	
Sbjct 1763	ATTTTCTCAGTCATGCCATTGGGTGGTCTGTTACGTCCTACATGCAAAAGTCTACCAG	1822	
Query 70	ACGTTACGTCGCTTCTCAAACCTTCACTGCCTCCTTTGCACCTTGCATGGTCTTGACAG	129	
Sbjct 1823	ACGTTACGTCGCTTCTCAAACCTTCACTGCCTCCTTTGCACCTTGCATGGTCTTGACAG	1882	
Query 130	ATGGTTGTCTTACCTGGTTTGGGTACTGTTTTTGCTGCTAAGTACGCTGAATCATACTA	189	
Sbjct 1883	ATGGTTGTCTTACCTGGTTTGGGTACTGTTTTTGCTGCTAAGTACGCTGAATCATACTA	1942	
Query 190	CTTCTTGATTCTATCTCTAAGAGATCCAATCAGAATTTTGTCTACCACTACCATGAGATG	249	
Sbjct 1943	CTTCTTGATTCTATCTCTAAGAGATCCAATCAGAATTTTGTCTACCACTACCATGAGATG	2002	
Query 250	TACTGGTGAATACTGGTGGGGTTCAAAGCTATGTAGACATCAATCAAAGATTGTTTGGG	309	
Sbjct 2003	TACTGGTGAATACTGGTGGGGTTCAAAGCTATGTAGACATCAATCAAAGATTGTTTGGG	2062	
Query 310	TTTGATGATTGCTACCGATTTTATCTGTCTTCTTGGATACCTATCTGTGGTACATTGT	369	
Sbjct 2063	TTTGATGATTGCTACCGATTTTATCTGTCTTCTTGGATACCTATCTGTGGTACATTGT	2122	
Query 370	TGTCAACACTGTCTTTTCCGTTGGTAAATCTTTCTACTTGGGTATTTCTATTTTGACTCC	429	
Sbjct 2123	TGTCAACACTGTCTTTTCCGTTGGTAAATCTTTCTACTTGGGTATTTCTATTTTGACTCC	2182	
Query 430	ATGGAGAAACATTTTCACTAGATTGCCAAAGAGAATTTACTCCAAGATTTGGCTACTAC	489	
Sbjct 2183	ATGGAGAAACATTTTCACTAGATTGCCAAAGAGAATTTACTCCAAGATTTGGCTACTAC	2242	
Query 490	TGATATGGAAATCAAATACAAGCCAAAGGTTTTAATTTCCCAAGCTTGGAAACGC	543	
Sbjct 2243	TGATATGGAAATCAAATACAAGCCAAAGGTTTTAATTTCCCAAGCTTGGAAACGC	2296	

Çizelge 4.8. *C. glabrata* mutant blast analiz sonuçları

Köken Adı	<i>C. glabrata</i> mutant
Kullanılan Primer	Candida glabrata <i>FKS1</i> (6.primer)
Primer Dizisi	GTTGCTGCGGTCATGTTCTT
Referans	[110]
Baz Sayısı	545
Request ID	G33W3MU3014

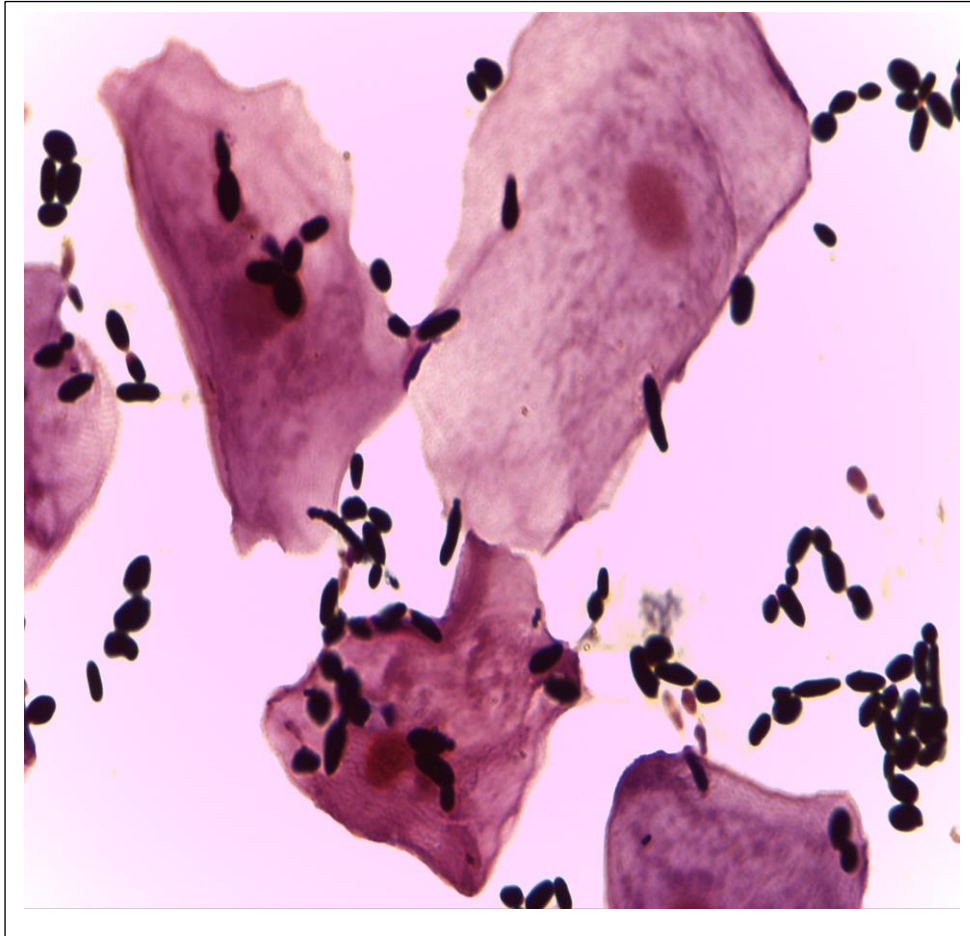
Candida glabrata strain 4872 beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit (FKS1) gene, complete cds Sequence ID: HM366439.1Length: 5592Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
970 bits(525)	0.0	531/534(99%)	0/534(0%)
Query 10	ATTTTCTCAGTCATGCCATTGGGTGGTCTGTTACGTCCTACATGCAAAAGTCTACCAG	69	
Sbjct 1692	ATTTTCTCAGTCATGCCATTGGGTGGTCTGTTACGTCCTACATGCAAAAGTCTACCAG	1751	
Query 70	ACGTTACGTCGCTTCTCAAACCTTCACTGCCTCCTTGCACCTTGCATGGTCTTGACAG	129	
Sbjct 1752	ACGTTACGTCGCTTCTCAAACCTTCACTGCCTCCTTGCACCTTGCATGGTCTTGACAG	1811	
Query 130	ATGGTTGTCTTACCTGGTTTGGGTTACTGTTTTTGCTGCTAAGTACGCTGAATCATACTA	189	
Sbjct 1812	ATGGTTGTCTTACCTGGTTTGGGTTACTGTTTTTGCTGCTAAGTACGCTGAATCATACTA	1871	
Query 190	CTTCTTGATTCTTCTTAAGAGATCCAATCAGAATTTTGCTTACCACTACCATGAGATG	249	
Sbjct 1872	CTTCTTGATTCTTCTTAAGAGATCCAATCAGAATTTTGCTTACCACTACCATGAGATG	1931	
Query 250	TACTGGTGAATACTGGTGGGTTCAAAGCTATGTAGACATCAATCAAAGATTGTTTTGGG	309	
Sbjct 1932	TACTGGTGAATACTGGTGGGTTCAAAGCTATGTAGACATCAATCAAAGATTGTTTTGGG	1991	
Query 310	TTTGATGATTGCTACCGATTTTATTCTGTTCTTCTTGGATACCTATCTGTGGTACATTGT	369	
Sbjct 1992	TTTGATGATTGCTACCGATTTTATTCTGTTCTTCTTGGATACCTATCTGTGGTACATTGT	2051	
Query 370	TGTCAACACTGTCTTTTCCGTTGGTAAATCTTCTACTTGGGTATTTCTATTTGACTCC	429	
Sbjct 2052	TGTCAACACTGTCTTTTCCGTTGGTAAATCTTCTACTTGGGTATTTCTATTTGACTCC	2111	
Query 430	ATGGAGAAACATTTTCACTAGATTGCCAAAGAGAATTTACTCCAAGATTTGGCTACTAC	489	
Sbjct 2112	ATGGAGAAACATTTTCACTAGATTGCCAAAGAGAATTTACTCCAAGATTTGGCTACTAC	2171	
Query 490	TGATATGGAATCAAATACAAGCCAAAGGTTTAAATTTCCCAAGCTTGGAACGC	543	
Sbjct 2172	TGATATGGAATCAAATACAAGCCAAAGGTTTAAATTTCCCAAGCTTGGAACGC	2225	

4.6. Virölans Deneylerinin Sonuçları

4.6.1. Adezyon deneyi sonuçları

Adezyon deneyi ile *Candida* ATCC kökenleri ile kaspofungine maruz bırakılarak dirençli hale gelen kökenlerin patojenitede önemli bir virölans faktörü olan adezyon özelliklerindeki değişim tespit edilmeye çalışılmıştır. *C. parapsilosis* ATCC 22019 kökeninin adezyon yüzdesi % 79, direnç kazandırılmış kökenin yüzdesi % 87, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 kökeninin adezyon yüzdesi % 78, direnç kazandırılmış kökenin adezyon yüzdesi % 85 olarak sayılmıştır (Resim 4.7, Çizelge 4.9). Çalışmada kullanılan tüm kökenler içinde adezyon yüzdesi en yüksek olan *C. parapsilosis* direnç kazandırılmış köken (%87) iken, en düşük adezyon yüzdesi *C. albicans* direnç kazandırılmış köken (%55) olarak tespit edilmiştir. *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın direnç kazandırılmış kökenlerinin referans kökenlerine göre tutunma yüzdesi daha yüksek olmuşken, *C. albicans*'ın referans kökeni direnç kazandırılmış kökene göre daha yüksek bir adezyon sergilemiştir.



Resim 4.7. Epitel hücrelerine tutunan *C. glabrata* mutant köken maya hücreleri

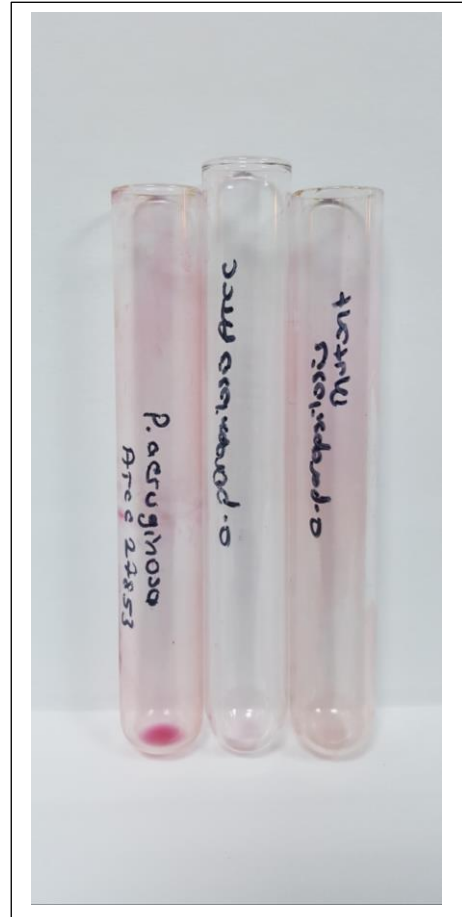
4.6.2. Biyofilm (Slaym) deneyi sonuçları

Çalışmada kullanılan *Candida* ATCC kökenlerinin ve elde edilen direnç kazandırılmış kökenlerin biyofilm yapma özellikleri araştırılmıştır. Deney sonuçlarında *C. parasilosis* direnç kazandırılmış kökeni biyofilm pozitif, diğer ATCC ve direnç kazandırılmış kökenlerin biyofilm negatif olduğu saptanmıştır (Resim 4.8, Çizelge 4.9).

Kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228 kökenlerinin kuvvetli biyofilm (+++) oluşturdukları gözlemlenmiştir. Kontrol grubunun yanında *C. parapsilosis* mutant kökeninin daha zayıf bir biyofilm (++) ürettiği belirlenmiştir (Resim 4.9).



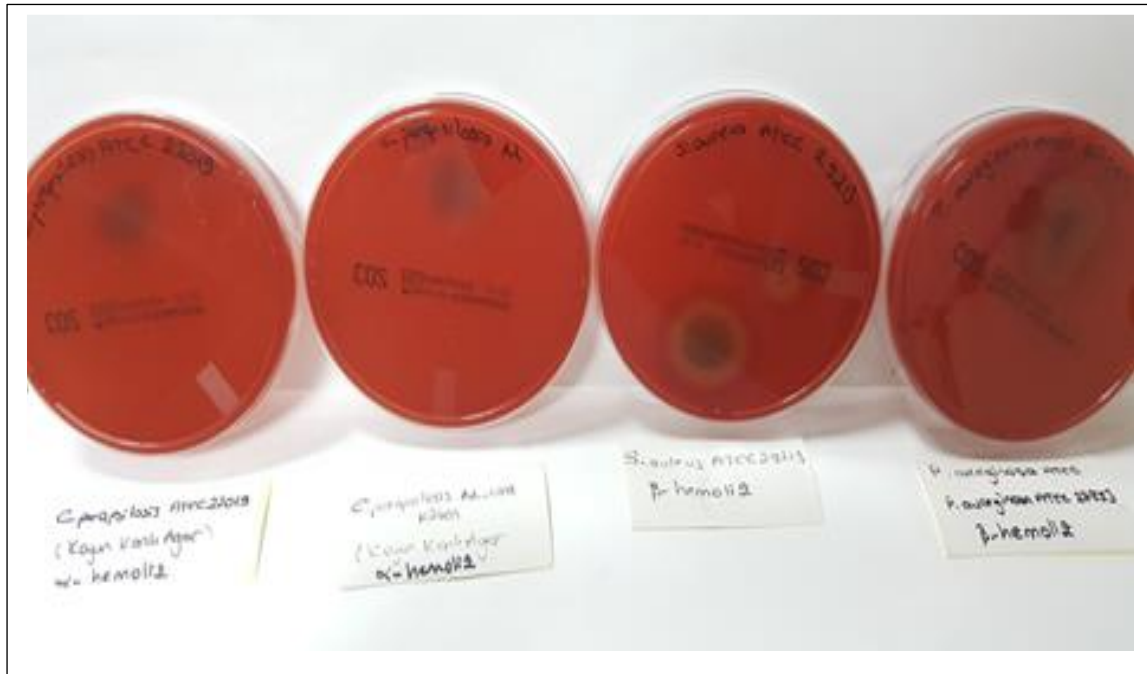
Resim 4.9. Biyofilm negatif *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* mutant



Resim 4.8. Biyofilm pozitif *C. parapsilosis* mutant ve biyofilm negatif *C. parapsilosis* ATCC 22019

4.6.3. Hemolitik aktivite deney sonuçları

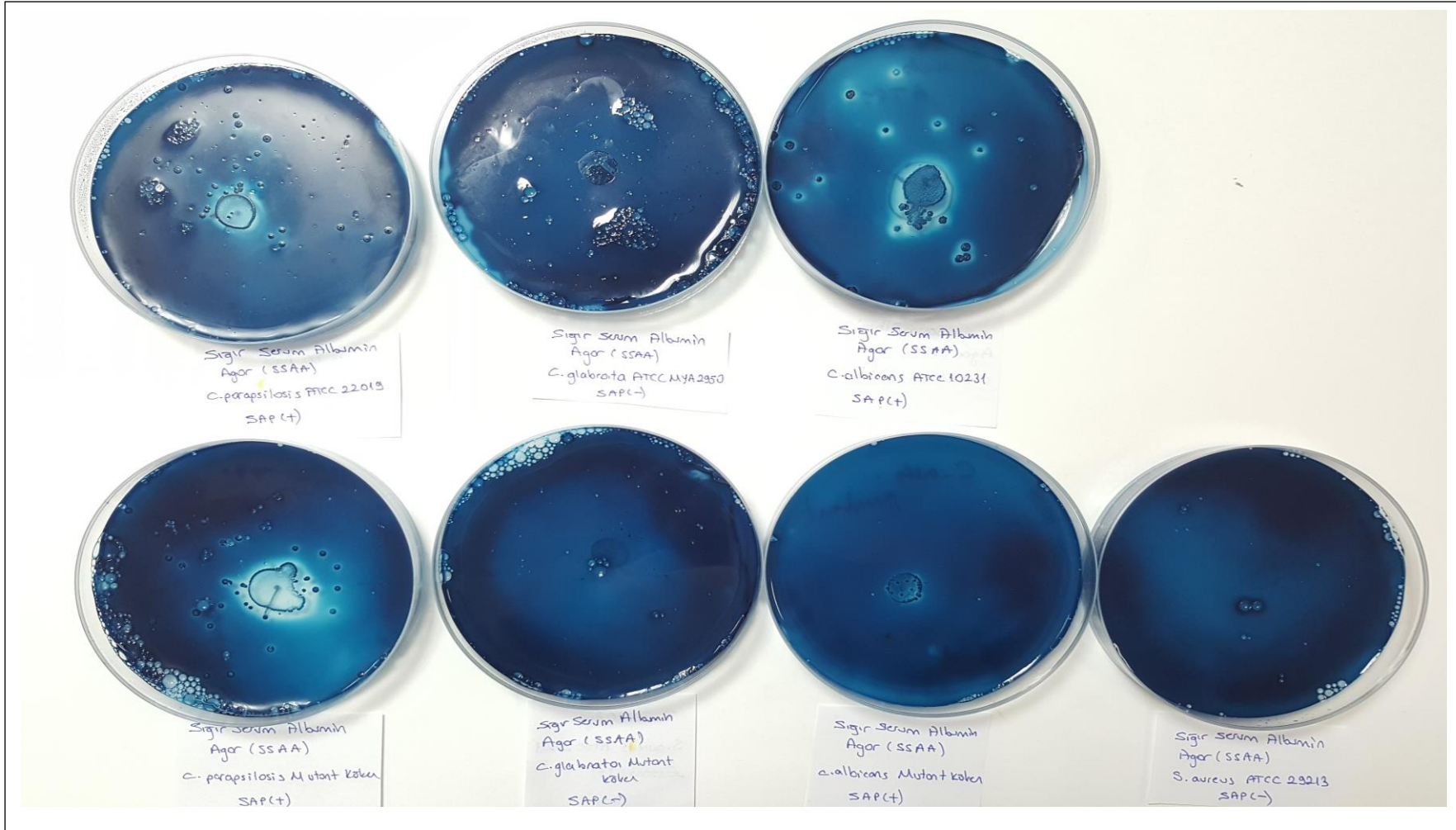
Çalışılan *Candida* kökenlerinin hemolitik aktiviteleri test edilmiştir. *C. albicans* ATCC 10231 alfa (α) hemoliz yaparken *C. albicans* direnç kazandırılmış köken hemoliz yapmamıştır. *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. parapsilosis* direnç kazandırılmış kökenin her ikisinde α hemoliz yapmıştır. *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. glabrata* mutant kökeni ise hemoliz yapamamıştır. Kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'nin α hemoliz ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 beta (β) hemoliz yaptığı tespit gösterilmiştir (Resim 4.10, Çizelge 4.9).



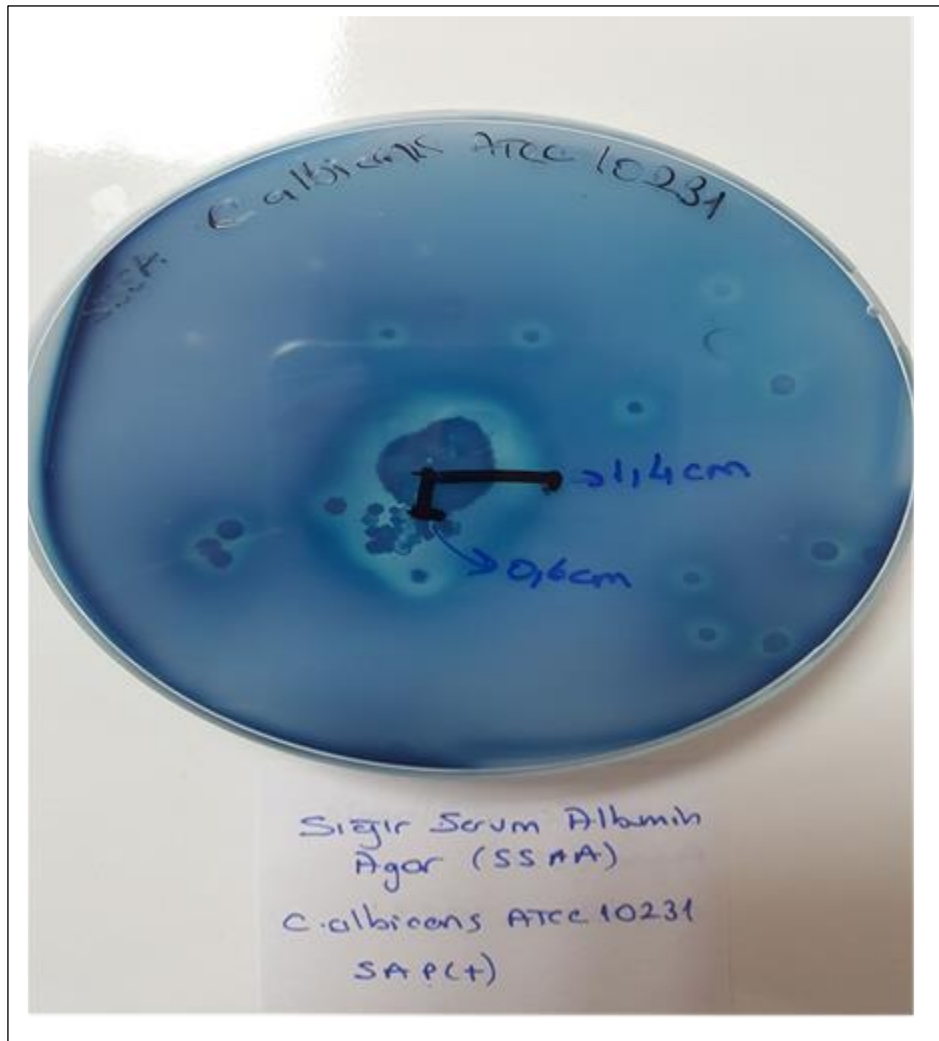
Resim 4.10. α -hemolitik *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. parapsilosis* mutant kökenler ve kontrol grupları

4.6.4. Salgısal aspartil proteinaz (SAP) deneyi sonuçları

Salgısal aspartil proteinaz varlığının gösterilmesi için yapılan deneyde *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C.glabrata* mutant köken SAP hidroliz zonu oluşturmamıştır ve SAP aktivitesi göstermemiştir. Deneyde kullanılan diğer ATCC ve direnç kazandırılmış *Candida* kökenleri ise SAP aktivitesi sergilemiştir (Resim 4.11). SAP enzim aktivitesinin şiddetinin değerlendirilmesi için yapılan koloni çevresindeki hidroliz zonunun koloni çapına oranı sonucunda en yüksek oran sırasıyla *C.albicans* ATCC 10231 (1,4 mm/0,6 mm=2,3) (Resim 4.12) ve *C.parapsilosis* mutant (1,3 mm/ 0,6 mm= 2,16) kökenlerinde saptanmıştır (Çizelge 4.9). Kontrol grubu olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'nin ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökenleri negatif sonuç vermiştir.



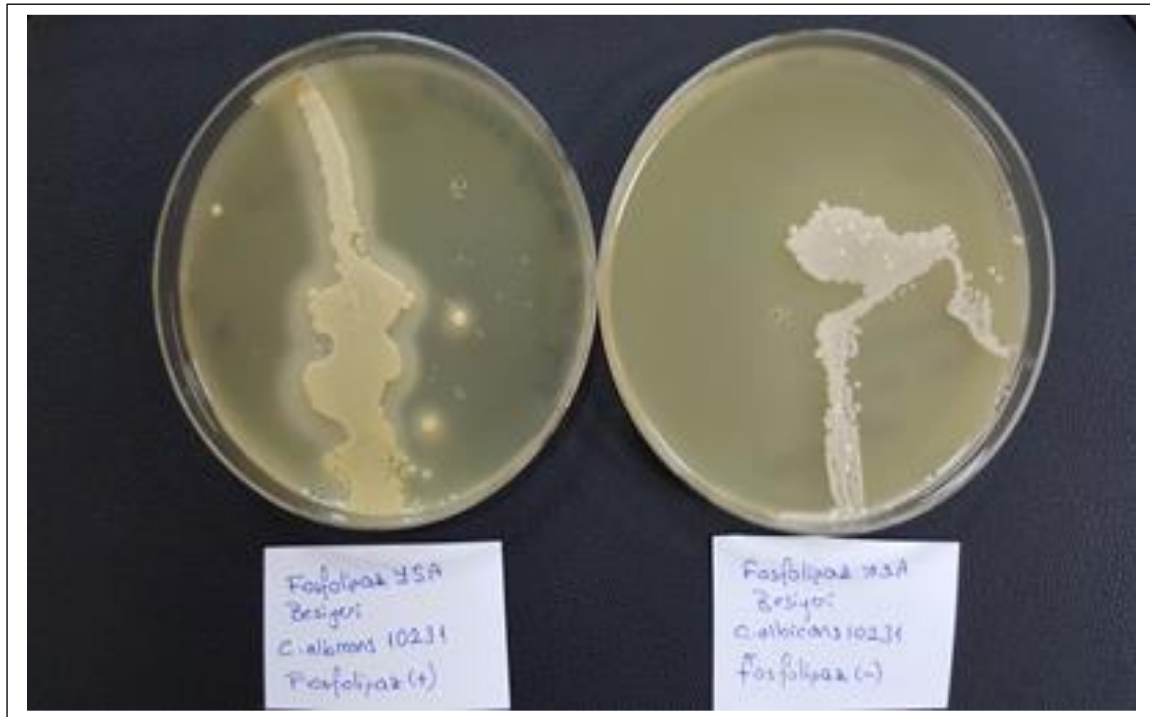
Resim 4.11. SAP aktivitesi sonuçları



Resim 4.12. *C. albicans* ATCC 10231 (+) SAP aktivitesi

4.6.5. Fosfolipaz deneyi sonuçları

Yumurta Sarılı Besiyeri (YSA) besiyeri kullanılarak yapılan deneyde sadece *C. albicans* ATCC 10231 fosfolipaz enzim aktivitesi gösterirken, test edilen diğer kökenler fosfolipaz negatif olarak belirlenmiştir (Resim 4.13, Çizelge 4.4). Kontrol grubu olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökenleri fosfolipaz negatif sonuç vermiştir.



Resim 4.13. Fosfolipaz pozitif *C.albicans* ATCC 10231, fosfolipaz negatif *C. albicans* mutant

4.6.6. Esteraz deneyi sonuçları

Tween 80 besiyerinde yapılan esteraz aktivitesinin değerlendirildiği deneyde *C. albicans* ATCC 10231 esteraz enzim aktivitesi pozitif bulunurken, test edilen diğer kökenler negatif olarak belirlenmiştir (Resim 4.14 ve Resim 4.15, Çizelge 4.9). Kontrol grubu olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kökenleri esteraz pozitif sonuç vermiştir.



Resim 4.14. Esteraz pozitif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Resim 4.15. Esteraz pozitif *Candida albicans* ATCC 10231

4.6.7. *Galleria mellonella* in vivo virölans deneyi sonuçları

In vitro virölans deneylerinin yanında *in vivo* virölans deneyi olarak *Galleria mellonella* larvalarında enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Ölümler 24 saatten itibaren başlamış, en yüksek ölüm oranına 192. saatte (8.gün) ulaşılmıştır (Çizelge 4.10). Direnç kazandırılmış kökenlerin ATCC kökenlere göre mortalite ortalamaları daha yüksektir. *C. albicans* ATCC 10231 mortalite ortalaması (% 67) *C. albicans* direnç kazandırılmış kökenin mortalite ortalamasına (%71) daha düşüktür. Benzer durum *C. parapsilosis* ATCC 22019 mortalite ortalaması (% 58) ve *C.parapsilosis* direnç kazandırılmış köken mortalite ortalaması (% 80) arasında da mevcuttur. *C. glabrata* ATCC MYA 2950 kökeni (% 64) ve *C. glabrata* direnç kazandırılmış köken mortalite ortalaması (% 68) arasında çok büyük bir artış meydana gelmemiştir. Kökenler birer tane olduğu için elde edilen sonuçlar kesin yargıya varmaya yeterli değildir.

Enfeksiyon modeli yapılırken kontrol grubu olarak hiç işlem uygulanmamış larvalar kullanılmıştır (Resim 4.16). Çalışmada kullanılan ATCC ve mutant kökenler ile enfekte edilen ve deneyin son gününe kadar canlı kalan larvaların sayısı ile Kaplan-Meier eğrileri oluşturulmuştur. *Candida* kökenlerine ait grafik verileri grafik 4.1, 4.2 ve 4.3 de aşağıda verilmiştir.



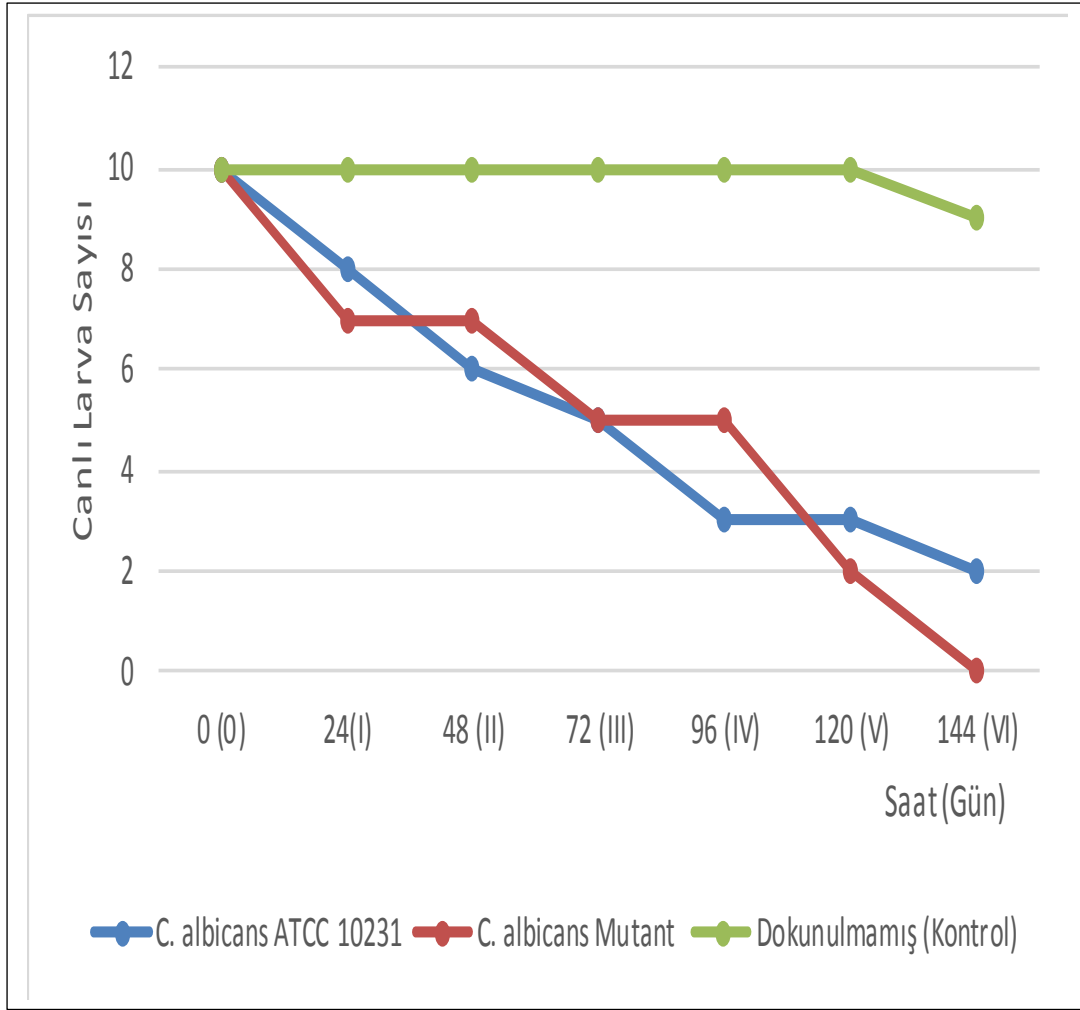
Resim 4.16. Referans kökenler ile kaspofungine maruz bırakılan dirençli kökenlerin *G. mellonella* larvalarında virölans özelliklerinin gösterilmesi

Çizelge 4.10. *Candida* ATCC ve dirençli kökenler ile oluşturulan enfeksiyon modeli, deney saatlerine göre canlı kalan larva sayısı, mortalite oranları ve mortalite ortalamaları

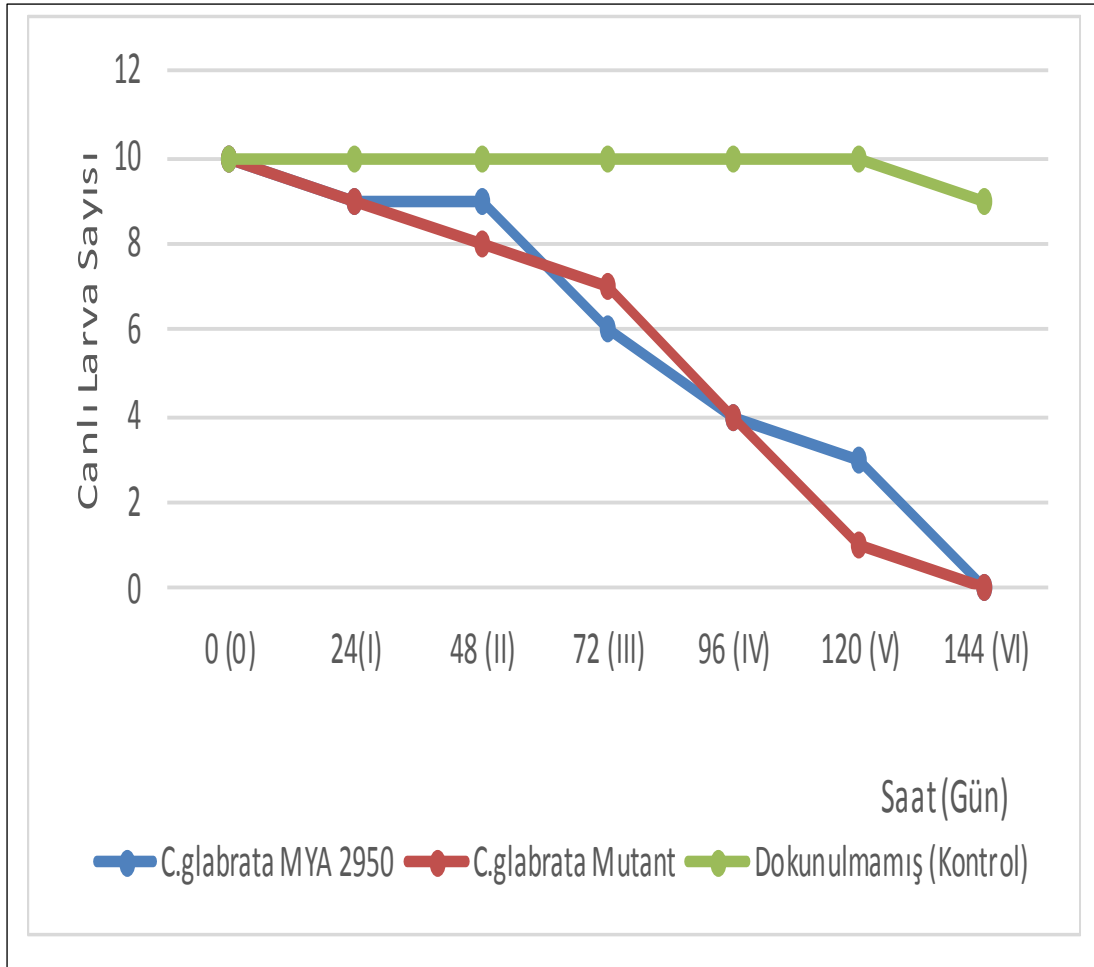
Saat Köken Adı	24	48	72	96	120	144	168	192	Mort Ort
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	8*(20)**	6 (40)	5 (50)	3 (70)	3 (70)	2 (80)	2 (80)	1 (90)	%67
<i>C. albicans</i> Mutant	7 (30)	7 (30)	5 (50)	5 (50)	2 (80)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	%71
<i>C. glabrata</i> ATCC MYA 2950	9 (10)	9 (10)	6 (40)	4 (60)	3 (70)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	%64
<i>C. glabrata</i> Mutant	9 (10)	8 (20)	7 (30)	4 (60)	1 (90)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	%68
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	8 (20)	7 (30)	7 (30)	6 (40)	4 (60)	4 (60)	3 (70)	1 (90)	%58
<i>C. parapsilosis</i> Mutant	5 (50)	4 (60)	2 (80)	2 (80)	2 (80)	2 (80)	1 (90)	0 (100)	%80
Dokunulmamış (Kontrol)	10 (0)	10 (0)	10 (0)	10 (0)	10(10)	9 (10)	7 (30)	6 (40)	%16

* Hayatta kalan larva sayısı

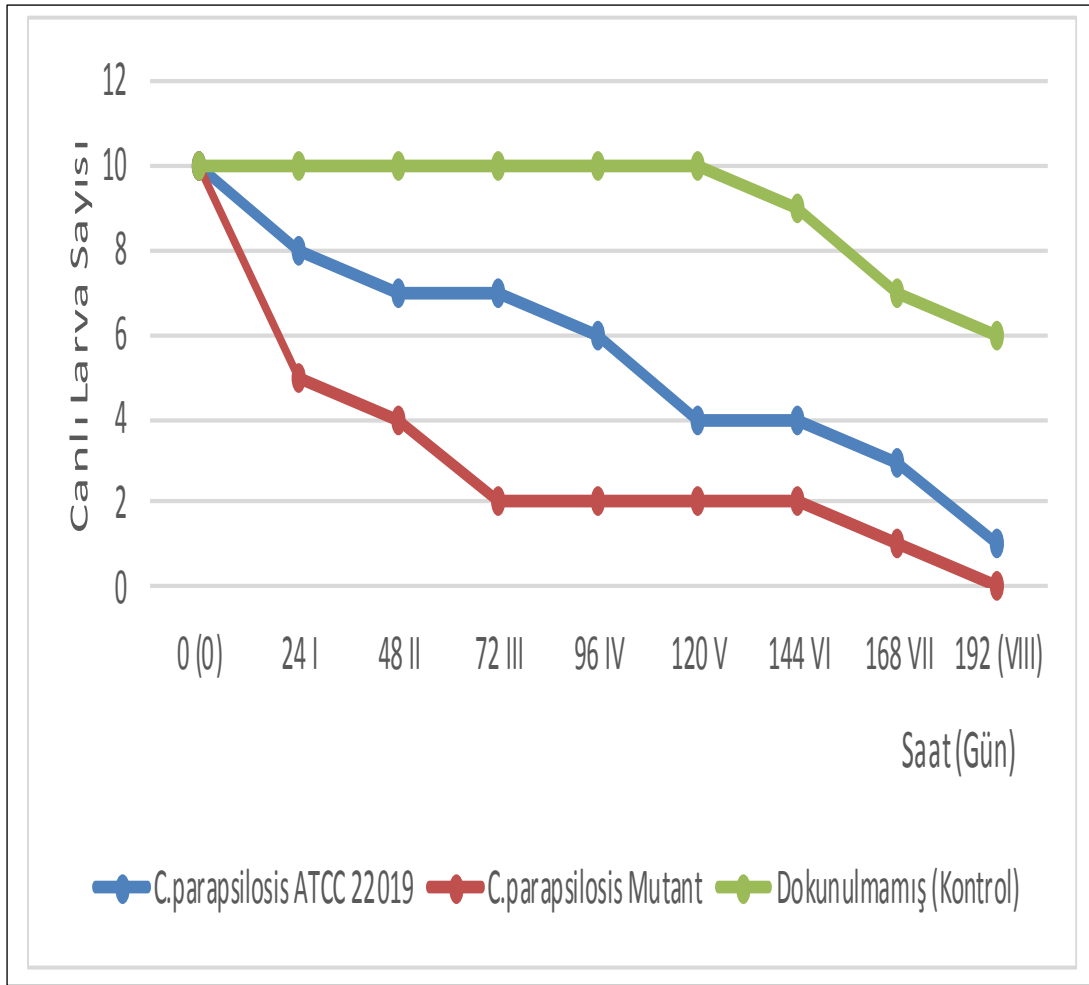
** Yüzde mortalite oranı



Şekil 4.1. *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri



Şekil 4.2. *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C.glabrata* mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri



Şekil 4.3. *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. parapsilosis* mutant köken ile enfekte edilen larvaların yaşam eğrileri

4.7. İstatiksel Analiz Sonucu

Daha önce kaspofungine maruz kalmamış referans kökenler ile artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz kalan kökenler ile enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarının referans köken ile mutant köken arasında virulans açısından bir artış olup olmadığını anlamak ve virulansın larvaların hayatta kalma ortalamalarının farkının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını olduğunu ortaya koymak amacıyla SPSS 22.0 (Statistical Progame for the Social Sciences, Chicago, ABD) programı ile bağımsız örneklem T testi (independent samples T test) yapılmıştır. Bağımsız örneklem T testi iki ana kütle örnekleme ortalaması arasındaki farkı araştırmada kullanılan en yaygın yöntem olduğu için çalışmada tercih edilmiştir.

Candida albicans ATCC 10231 ve *Candida albicans* mutant larvaları arasında yapılan bağımsız örneklem testleri neticesinde elde edilen p (test istatistiği) değeri 0,05'ten büyük çıkmış olup ($p=0,784>0,05$), hayatta kalma ortalamaları açısından referans kökenler ile kaspofungine maruz bırakılan kökenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. albicans* mutant kökenler ile enfekte edilmiş *G. mellonella* larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu

		Varyansların Eşitliği İçin Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği İçin T Tesit						
		F	Sig	t	df	p değeri	Ortama ların farkı	Standart Hata Farkı	%95 Güven aralığındaki değişim	
									Taban	Tavan
Hayatta Kalan Larva	Eşit varyanslar tespit edildi	,701	,415	,279	16	,784	,444	1,591	-2,928	3,817
	Eşit varyanslar tespit edilemedi			,279	15,47	,784	,444	1,591	-2,937	3,826

Candida glabrata ATCC MYA 2950 ve *Candida glabrata* mutant larvaları arasında yapılan bağımsız örneklem testleri neticesinde elde edilen p (test istatistiği) değeri 0,05'ten büyük çıkmış olup ($p=0,911>0,05$), hayatta kalma ortalamaları açısından referans kökenler ile kaspofungine maruz bırakılan kökenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *Candida glabrata* ATCC MYA 2950 ve *Candida glabrata* mutant kökenler ile enfekte edilmiş *G. mellonella* larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu

		Varyansların Eşitliği İçin Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği İçin T Testi						
		F	Sig	t	df	p değeri	Ortama ların farkı	Standart Hata Farkı	%95 Güven aralığındaki değişim	
									Taban	Tavan
Hayatta Kalan Larva	Eşit varyanslar tespit edildi	,064	,804	,113	16	,911	,222	1,966	-3,945	4,389
	Eşit varyanslar tespit edilemedi			,113	15,99	,911	,222	1,966	-3,945	4,390

Candida parapsilosis ATCC 22019 ve *Candida parapsilosis* mutant larvaları arasında yapılan bağımsız örneklem testleri neticesinde elde edilen p (test istatistiği) değeri 0,05'ten büyük çıkmış olup ($p=0,091>0,05$), hayatta kalma ortalamaları açısından referans kökenler ile kaspofungine maruz bırakılan kökenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. *Candida parapsilosis* ATCC MYA 2950 ve *Candida parapsilosis* mutant kökenler ile enfekte edilmiş *G. mellonella* larvalarının bağımsız örneklem testi sonuç tablosu

		Varyansların Eşitliği İçin Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği İçin T Testi						
		F	Sig	t	df	p değeri	Ortama ların farkı	Standart Hata Farkı	%95 Güven aralığındaki değişim	
									Taban	Tavan
Hayatta Kalan Larva	Eşit varyanslar tespit edildi	,024	,878	798	16	,091	2,444	1,359	-,4380	5,3269
	Eşit varyanslar tespit edilemedi			798	15,932	,091	2,444	1,359	-,4390	5,3279

Çizelge 4.14. *Candida* referans kökenleri ve kaspofungine maruz bırakılan kökenlerinin *in vivo* ve *in vitro* özellikleri özet tablo

Köken Adı	Kaspofungin MİK Değeri (48 saat sonunda)	Dizi nalizi Mutasyon Varlığı	İn Vitro Virülans Deney Sonuçları							In Vivo Virulans Deneyi Mortalite Ortalaması (%)
			Fosfolipaz Deneyi	Esteraz Deneyi	Sap Deneyi	Sap Çapı Deneyi mm/mm	Biyofilm Deneyi	Adezyon Deneyi (%)	Hemoliz Deneyi	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,03 (S)*	Yok	+++	+	+	1,4/0,6=2,3	-	%73	α hemoliz	%67
<i>C. albicans</i> Mutant	0,03 (S)	Tespit edilemedi	****	-	+	0,6/0,4=1,5	-	%55	Non hemolitik	%71
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,125 (S)	Yok	-	-	+	0,8/0,5=1,6	-	%79	α hemoliz	%64
<i>C. parapsilosis</i> Mutant	0,5 (S)	69. pozisyonda nokta mutasyon tespit edildi	-	-	+	1,3/0,6=2,16	++	%87	α hemoliz	%68
<i>C. glabrata</i> ATCC MYA 2950	0,03 (S)	Yok	-	-	-	-	-	%78	Non hemolitik	%58
<i>C. glabrata</i> Mutant	0,03 (S)	203. pozisyonda nokta mutasyon tespit edildi	-	-	-	-	-	%85	Non hemolitik	%80

*S: Duyarlı **Var **** Yok

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kaspofungine dirençli hale getirilen *Candida* kökenlerinin virülans özellikleri araştırılmıştır. *Candida* cinsi mayaların virülansı ile ilgili çalışmalar çoktur. Ancak direnç ile virülans arasındaki ilişkinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın hipotezi, dirençli kökenlerin daha virulan olduğu şeklinde kurulmuştur.

Günümüzde bilinen 100 000'den fazla mantar türü bulunmaktadır. Bunların sadece çok düşük bir yüzdesi insanlarda enfeksiyon yapabilmektedir. Buna rağmen, fungal enfeksiyonlar son zamanlarda insanlarda meydana gelen enfeksiyonların başlıca nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu patojenler fırsatçı patojen olup, konak immün sisteminde meydana gelen bozulmalar sonrasında enfeksiyonlar meydana getirmektedir [118]. Fungal enfeksiyonlar, organ transplantasyonu nedeniyle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda, kanserli bireylerde, AIDS hastalarında, ameliyat sonrası ya da antibiyotik kullanımına bağlı olarak mikrobiyotası değişen insanlarda görülebilmektedir [119].

Candida cinsi mantarlar içinde yer alan ve moleküler seviyeden sürveyans analizine kadar pek çok alanda üzerinde çalışılmış bir cinstir. Bu cinse ait türler insanlar hayvanlar ve bitkiler üzerinde çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır [120]. Günümüzde *Candida* türlerinden en az 15 tanesinin insanlarda hastalık yaptığı bilinmektedir, ancak bunlar içinde önemli invaziv enfeksiyonlara sebep olanlar *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei*'dir. Ayrıca daha önce daha nadir rastlanan ancak günümüzde daha çok karşılaştığımız *Candida auris*'in de gün geçtikçe önem kazanan bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır [121]. *Candida* türleri içinde en çok enfeksiyon etkeni olarak *C. albicans* türü saptanmaktadır. *C. albicans*' in neden olduğu enfeksiyonlar yaygın olarak kandidaz olarak bilinmektedir. *C. albicans* basit mukozal enfeksiyonlardan kan dolaşım enfeksiyonlarına kadar oldukça geniş spektrumda etken olarak saptanabilmektedir [122].

Candida türleri global olarak özellikle hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının en önemli sebeplerinden biridir [123]. Her yıl dünya çapında 250 000 kişi kandidemiden etkilenmekte ve 50 000 kişiden fazlası ölmektedir. Populasyon temelli çalışmalarda her 100 000 kişiden 2 ile 14 arasında değişen rakamlarda kandidemiden geliştiği bildirilmiştir [39].

Geçtiğimiz yirmi yıl boyunca kandidemiden korunma stratejilerinin geliştirilmesi, tedavi prosedürlerinde gelişmelerin olması, yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi ve ticarileştirilmesine rağmen kandidemi oranında artış olmuştur. Kandidemiye bağlı mortalite oranının artmasında antifungal tedavinin uygulanamaması, antifungal tedaviye başlamada gecikme ya da uygun olmayan antifungal ajanın kullanılmasının etkisi büyüktür [124] .

Candida türlerine bağlı olarak gelişen fungal enfeksiyonların tedavisinde hala çok sınırlı sayıda ilaç bulunmaktadır. Poliyen, azol, ekinokandin, nükleotid analogları ve alilamin sınıfı antifungaller, *Candida* türünün duyarlılığına, enfeksiyonun yeri ve tipine bağlı olarak kullanılmaktadır [125]. Ekinokandin sınıfı antifungaller (kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin) kandidoz tedavisinde tercih edilmektedir. Rehberlerde ekinokandinler yetişkin hastalarda ilk tedavi seçeneği olarak önerilmektedir. Ekinokandinler mantar hücre duvarının oluşması için gereken β -D-glukan sentaz enzimini inibe ederek fungisidal etki göstermektedirler. Pek çok *Candida* türlerine karşı güvenli, etkili ve ilaç-ilaç etkileşimi çok sınırlı olan ekinokandinler, intravenöz olarak uygulanmaktadır [123]

Candida enfeksiyonlarının değişen epidemiyolojisinin nedeni olarak azol grubunun yaygın olarak profilaktik ve terapötik olarak kullanılmasının katkısı olduğu düşünülmektedir [40]. Değişen epidemiyoloji ile birlikte çoklu ilaç direnci ve genişlemiş ilaç direncinin de ortaya çıkması endişe vermektedir [115]. Diğer antifungal sınıflarına göre daha yeni olan ve azole dirençli *Candida* türlerinde ilk tedavi seçeneği olarak kullanılması, ekinokandin sınıfı antifungalleri daha değerli kılmaktadır [126]. Dolayısıyla günümüzde ekinokandin sınıfı antifungallerin direnç gelişiminin takibi önem kazanmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalarda artık ekinokandin ile karşılaşmaya bağlı olarak direnç gelişiminin de ortaya çıktığı bildirilmiştir [127]. Lortholary ve arkadaşlarının (2011) Fransa’da yaptıkları çalışmada otuz günden fazla süre kaspofungin tedavisi gören kişilerden duyarlılığı azalmış ya da dirençli *Candida parapsilosis* kökenlerinin izole edildiği bildirilmiştir [128].

Çalışmamızda ekinokandin sınıfı bir antifungal olan kaspofungin ile karşılaştırılmış duyarlı *Candida* türlerinin (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC MYA 2950 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019) direnç geliştirme özellikleri araştırılmış ve direnç geliştiren kökenlerin virülansında duyarlı kökenlere göre nasıl bir değişim olduğu saptanmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda tüm özellikleri bilinen lisanslı laboratuvar kökenleri olan *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 kullanılmıştır. Kökenler ardışık olarak artan konsantrasyonlarda (0,03 µg/ml- 2 µg/ml aralığı) kaspofungine maruz bırakılmıştır. *C. albicans* 0,48 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda ve *C. parapsilosis* 1,48 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda dirençli hale gelmiştir. *C. glabrata* 0,18 µg/ml kaspofungin konsantrasyonu ile en düşük konsantrasyonda ve *C. parapsilosis* ise en yüksek konsantrasyonda direnç kazanan köken olmuştur. Benzer bir çalışma olan Chassot ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmada, duyarlı 30 *C. parapsilosis* hasta izolatu sürekli olarak artan konsantrasyonlarda kaspofungine maruz bırakılmıştır. Dirençli kökenler ortama 4,2 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda elde edilmiştir. Otuz duyarlı kökenden 19 tane dirençli 5 tane de orta sevide dirençli köken elde edilebilmiştir [101]. Bu çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda kullandığımız ATCC kökeninin daha düşük bir konsantrasyonda direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebinin Chassot ve arkadaşlarının (2016) klinik köken kullanması olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamız ve öncesinde yapılan Chassot ve arkadaşlarının çalışması dışında *Candida* kökenlerini in vitro olarak kaspofungine maruz bırakarak dirençli hale getirerek, direnç konsantrasyonlarını belirleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır [101]. Bu nedenle sonuçlarımız sadece bu çalışma ile karşılaştırılabilmiştir. Diğer ekinokandin grubu antifungaller ile yapılan Bordallo-Cardona ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında, ekinokandine duyarlı *C. glabrata* klinik izolatları mikafungine ve anidulafungine 0,015-2 µg/ml artan konsantrasyonlarında maruz bırakılmıştır. İlaç ile maruziyet öncesinde MİK değeri mikafungin için 0,015 µg/ml ve anidulafungin için 0,062 µg/ml olarak belirlenirken, maruziyet sonrasında mikafungin için 1,15 µg/ml ve anidulafungin için 2,30 µg/ml olarak belirlenmiştir [129].

Çalışmamızda kaspofungine *in vitro* direnç geliştirilen kökenlerin duyarlı ATCC kökenlerine göre minimum inhibisyon konsantrasyonlarında (MİK) değişim olup olmadığı araştırılmıştır. *Candida* ATCC kökenler ve kaspofungine dirençli hale getirilen kökenler CLSI M27-A3 ve M27-S4 protokollerine göre amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, itraconazol ve kaspofungin kullanılarak MİK değerleri 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında tespit edilmiştir. Antifungallerin MİK sonuçları değer aralıkları sırasıyla amfoterisin B için 0,03-0,06 µg/ml, flukonazol için 0,5-16 µg/ml, vorikonazol için 0,12-0,5 µg/ml, itraconazol için 0,03-0,125 µg/ml ve kaspofungin için 0,03-0,5 µg/ml şeklinde belirlenmiştir. ATCC ve dirençli hale getirilen kökenler 24 ve 48 saatin sonunda çoğunlukla

duyarlı olarak belirlenirken sadece *C. albicans* dirençli hale getirilen köken ve *C. parapsilosis* dirençli hale getirilen köken doza bağımlı dirençli (orta seviye dirençli) olarak tespit edilmiştir. MİK değerlerine bakıldığında kaspofungine maruz bırakılan kökenlerin MİK değerlerinin genellikle ATCC'lere göre her ilaç grubunda bir ya da iki kat arttığı gözlemlenmiştir. Kaspofunginin MİK değerlerinin *C. parapsilosis* dirençli kökenin ATCC kökenine göre 24 saat sonucunda bir kat arttığı gözlenirken (sırasıyla 0,25 µg/ml- 0,125 µg/ml), 48 saat sonucunda ise iki kat (0,5 µg/ml) artmıştır. Bu artışın *C. parapsilosis* kökeninin kaspofungine direnç geliştirmesi ile doğru orantılı olduğu düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada 14 günden fazla süre 8 µg/ml flukonazol kullanan hastalardan elde edilen 10 dirençli *C. parapsilosis* kökeninin flukonazol MİK₅₀ konsantrasyonu 0,5 µg/ml ve vorikonazol MİK₅₀ konsantrasyonu 0,03 µg/ml olarak tespit edilmiştir [127]. Kaspofungine maruz bırakılarak 8 µg/ml kaspofungin konsantrasyonunda dirençli *C. parapsilosis* elde edilerek yapılan başka bir çalışmada ise dirençli kökenlerin MİK değerinin 0,03-0,25 µg/ml arasında değiştiği bildirilmiştir [101].

Pfaller ve arkadaşları (2008) dünya çapında 90 merkezden 2001 ve 2006 yılları arasında topladıkları 5,346 *Candida* kökenlerinin anidulafungin, kaspofungin ve mikafungine karşı in vitro özelliklerinin incelendiği bir surveyans çalışması yapmışlardır [130]. Çalışma sonucunda 2,869 *C. albicans* kökeninin % 97,1'nin 0,06 µg/ml'de, 759 *C. parapsilosis* kökeninin % 98,6'sının 1 µg/ml'de ve 747 *C. glabrata* kökeninin ise % 95'nin, 0,06 µg/ml'de kaspofungin için MİK değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Alexander ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları bir çalışmada ise günlük 35 mg kaspofungin ile tedavi edilmiş ve başarılı olunamamış dirençli *C. glabrata*'nın kaspofungin MİK değeri 0,06 µg/ml, flukonazol MİK değeri ise 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir [131]. SENTRY antimikrobiyal surveyans programı kapsamında (2006-2010) *C. glabrata* kökenlerinin flukonazol, vorikonazol, anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin MİK değerleri incelenmiştir. Sonuçlarda flukonazol için ≥ 64 µg/ml, anidulafungin ve kaspofungin için $\geq 0,5$ µg/ml ve mikafungin için $\geq 0,25$ µg/ml değerler dirençli kabul edilmiştir. 669 izolattan % 9,3'ü (62) kaspofungine dirençli olarak belirlenmiştir. %11'i hem flukonazole direnç gösterirken, aynı zamanda bir ya da daha fazla ekinokandine de direnç göstermiştir [132]. Kuveyt'te 10 yıllık dönem (1996-2005) içinde yapılan bir çalışmada 607 kan dolaşım enfeksiyon etkeni *Candida* türü izole edilmiştir. Bunlardan 240 tanesi *C. albicans*, 186 tanesi *C. parapsilosis*, 75 tanesi *C. tropicalis* 34 tanesi *C. glabrata*, 10 tanesi *C. krusei* ve 62 tanesi diğer türler olarak tanımlanmıştır. MİK değerleri CLSI kriterleri içinde değerlendirilip amfoterisin B >

1 µg/ml, flukonazol $\geq$ 64 µg/ml, 5-flusitozin $\geq$ 32 µg/ml ve vorikonazol > 4 µg/ml kabul edilmiştir. Buna göre çalışmada izole edilen *Candida* türlerinin flukonazole dirençli olanlarının % 3,8'i *C. albicans* , % 5,8 *C. glabrata* ve % 40 *C. krusei* olarak belirlenmiştir [123].

Ekinokandinler mantar hücre duvarının oluşumunda görev alan β -1,3-D- gluklan sentaz enzimini inhibe etmektedir. β -1,3-D- gluklan sentaz enziminin iki alt ünitesi bulunmaktadır. Bunlardan biri Fksp iken, diğeri Rho1p'dir. Fkps bölgesinde *FKS1*, *FKS2* ve *FKS3* olmak üzere üç gen bulunmaktadır. Ekinokandinler bu genlerin kodladığı enzimi inhibe etmektedir. Bunun sonucunda hücre duvarının yapısını bozmakta ve ozmatik kararsızlık sonucunda hücre ölümünü gerçekleştirmektedir [133]. Hücre duvarının oluşumunda görev alan β -1,3-D- gluklan sentaz enzimini kodlayan *FKS1* ve *FKS2* genlerinin hot spot bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonlar ekinokandin direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Ekinokandine maruziyet nedeniyle *FKS* mutasyonlarının oluştuğu ve direnç gelişiminin bu nedenle gerçekleştiği bilinmektedir [134].

Çalışmamızda, artan konsantrasyonlarda ardışık olarak kaspofungine maruz bırakılarak dirençli hale gelen *Candida* kökenlerinin *FKS* gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda mutant köken haline gelip gelmediği araştırılmıştır. Bu amaçla *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 ile bunlardan elde edilen kaspofungine maruz bırakılmış kökenlerin DNA izolasyonu yapılmış ve ardından dizi analizi için optimizasyon çalışmaları uygulanmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen veriler NCBI gen bankalarındaki mevcut veriler ile karşılaştırılarak mutasyon taraması yapılmıştır. Referans kökenler *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019'de beklenildiği üzere herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır. *C. albicans* ATCC 10231'den elde edilen kaspofungine maruz bırakılmış kökenin verileri gen bankası ile karşılaştırıldığında mutasyon gözlenmemiştir.

C. glabrata ATCC MYA 2950 referans kökeniden elde edilen kaspofungine maruz bırakılmış kökenin *FKS1* gen bölgesinde nokta mutasyonu olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda sonuçlara benzer olarak Beyda ve arkadaşları (2014) yaptıkları bir çalışmada daha önce ekinokandine maruz kalan 13 *C. glabrata* izolatında, *FKS* bölgesinde mutasyon olduğunu göstermiştir [135]. Başka bir çalışmada daha önce ekinokandine maruz kalan hastalardan izole edilen *C. glabrata* kökenlerinin % 32'sinin *FKS* mutasyonu taşıdığı

gösterilmiştir. Bu durumun, ekinokandinin tedavi ya da profilaksi amacıyla kullanımı sırasında büyük salgınlara sebep olabileceği bildirilmiştir [134]. Yine ekinokandin maruziyeti ile ilgili bir çalışmada, öncesinde ekinokandine duyarlı (anidulafungin ve mikafungin) olan kökenlerin ekinokandinlere maruz bırakılarak dirençli hale getirilen mutantlarının *FKS2* geninde S663P mutasyonu tespit edilmiştir [103]. Duke hastanesinde 2001-2010 yılları arasında kan dolaşım enfeksiyonu olan 293 hastadan 313 *C. glabrata* izole edilmiştir. 2001 yılından 2010 yılına kadar ekinokandine direnç % 4,9'dan % 12,3'e çıkmıştır. 78 flukonazole dirençli izolatın % 14,1'i 1 ya da daha fazla ekinokandine direnç göstermiştir. Ayrıca % 7,9 (75) izolatta *FKS* mutasyonu tespit edilmiştir. Artık *C. glabrata* kökenlerinin klinik olarak önemli *FKS1/FKS2* mutasyonları taşıdığı gösterilmektedir. Bu nedenle ekinokandin tedavisine başlamadan önce duyarlılık tespitinin yapılması gerektiği görüşü oluşmuştur [131]. Başka bir çalışmada, kan dolaşım enfeksiyonu olan 1380 hastadan izole edilen *C. glabrata* izolatının 77 tanesi MİK değerlerine göre ekinokandin sınıfı antifungallere orta seviyede dirençli ve dirençli bulunmuştur. Bunlardan 15 tanesinde *FKS1* HS1 bölgesinde ve 35 tanesinde *FKS2* HS1 bölgesinde çeşitli mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir [136].

Fransa'da bir olgu sunumunda 9 yaşında fankoni anemisi olan bir çocukta *C. glabrata*'ya bağlı enfeksiyon tespit edilmiştir ve hasta flukonazol ile tedavi edilmeye başlanmıştır. Daha sonra tedavisine flukonazol, flusitozin ve lipozomal amfoterisin B kombinasyonu ile devam edilmiştir. Sekiz günlük bu tedavinin ardından, vorikonazol tedavisi uygulanmıştır. Hastadan izole edilen *C. glabrata* ile yapılan çalışmada kaspofungin MİK değerlerine bakılmıştır. Kaspofungin MİK'i tedavinin ilk günü 0,19 µg/ml iken, beşinci günün sonunda 32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ekinokandin direnci ile ilgili olan *FKS2* gen bölgesinde S663P pozisyonunda mutasyon tespit edilmiştir [137].

Bizim çalışmamızda, *C. parapsilosis* ATCC 22019'den kaspofungine maruz bırakılarak oluşturulan kökenin *FKS1* geni Hot Spot 2 bölgesinin 69. pozisyonunda bir nokta mutasyon olduğu anlaşılmıştır. Oldukça korunmuş bölgeler olan hot spot bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar MİK konsantrasyonlarının artmasına, β -1,3-D-glukan sentaz enzimini duyarlılığının azalmasına, ekinokandiler arasında çapraz direnç gelişimine neden olmaktadır. Ancak *C. parapsilosis* türünün *FKS1* mutasyonları nedeniyle ekinokandinlere daha az duyarlı olduğu bilinmektedir [40]. Çalışmada kullandığımız *C. parapsilosis* ATCC 22019 kökeninin DNA dizi analizinde mutasyon tespit edilmemesi nedeniyle, kaspofungin

ile karşılaştırılarak mutant hale getirilen kökenin dizi analizinde tespit edilen mutasyonların kaspofungin maruziyetine bağlı olarak geliştiğini göstermektedir. Bu nedenle çalışmamız *C. parapsilosis FKS1* mutasyonunun gösterilmesi açısından öncülük etmektedir.

Klinik *C. albicans* izolatlarında yüksek kaspofungin MİK değerlerine sahip olanlarda *FKS1* geninin hot spot 1 bölgesinde baz değişikliğine bağlı olarak tedavi başarısızlığı meydana geldiği gösterilmiştir; ancak bu kökenler çok yaygın değildir. Genellikle bu baz değişiklikleri Hot Spot 1 bölgesinin S645Pve S645Y pozisyonlarına meydana gelen mutasyonlardan oluşmaktadır [126]. Kendi çalışmamızda *C. albicans* kökeni için dizi analizi ile mutasyon gösteremediğimiz için bu konuda yorum yapılamamıştır. Park ve arkadaşlarının (2005) yılında *C. albicans* klinik izolatları ve laboratuvar kökenlerinin *FKS1* mutasyonları üzerine yaptıkları çalışmada, laboratuvar kökenine *CaFKS1* geni pGSC8a plazmidi ile eklenmiştir ve mutant olması sağlanmıştır. Mutasyon sonucunda mutant *C. albicans* kökeninin ekinokandine daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir [138].

Candida referans kökenlerinden kaspofungine maruziyet sonucunda elde edilen mutant dirençli kökenlerin dizi analiz verileri ile diğer çalışmalardan elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda duyarlı bir kökenin düşük dozlarda kaspofungin ile karşılaşması sonucunda, *FKS* gen bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonların, kökenin direnç kazanmasına neden olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla sonuçlarımız kaspofungin maruziyetinin direnç gelişimine katkısı olduğunu doğrulamıştır.

Çalışmamızda mutant olduğu belirlenen kökenlerin virülans özelliklerindeki değişimin saptanması için *in vitro* ve *in vivo* virülans çalışmaları yapılmıştır. *In vitro* olarak adezyon, hemoliz özellikleri, salgısal aspartil proteinaz (SAP), esteraz, fosfolipaz enzimleri ve biyofilm oluşturmaları araştırılmıştır. Çalışmamızın sonucunda, incelenen kökenlerde, *C. albicans* dışındaki referans kökenlerin ve mutant kökenlerin hemoliz yapma etkilerinde, fosfolipaz, esteraz ve SAP etkinliklerinde kayda değer bir farklılık bulunmamıştır. Fakat *C. albicans* ATCC 10231 referans kökeni ile mutant köken arasında fosfolipaz ve esteraz özellikleri açısından farklılık bulunmaktadır. Adezyon özelliğinde olduğu gibi *C. albicans* ATCC 10231 referans köken fosfolipaz ve esteraz enzimlerine sahipken mutant kökenin bu özelliklerini kaybettiği gözlenmiştir.

Referans ve mutant kökenlerin adezyon özellikleri incelendiğinde *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* referans kökenlerinin adezyon özellikleri mutant olan kökenlerine göre daha düşükken, *C. albicans* referans kökene göre mutant kökenin tutunma özelliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Kyselgof ve arkadaşları (2007), *C. albicans*'ın kaspofungine 1-2 saat süreyle maruziyeti sonrasında adezyon deneyi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *C. albicans* kökenlerinin insan hücre hattına (Human keratinocytic cell line, HaCat) tutunmasının % 40-90 arasında azaldığını gözlemlemişlerdir [139]. Bu azalmanın sebebinin kaspofungine maruziyetin sadece 1-2 saat gibi kısa süre ile gerçekleşmesi ve direnç oluşmasına imkan verilememiş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Adezyon ile ilgili başka bir çalışmada ise kaspofungine maruz bırakılan *C. albicans*'ın, ilacın hücre yüzeyindeki hücre adezyon proteini olan Als1'i indükleyerek adezyonu ve agregasyonu tetiklediği bildirilmiştir. Als1'e sahip olmayanlarda ise bu durumun tespit edilmediği belirtilmiştir [140]. Bizim çalışmamızda adezyon özelliğinin referans ve mutant kökenler arasında kısmen değiştiği gösterilmiştir.

Virülans özelliklerinden biri de hemoliz yapma yeteneğidir. Referans kökenlerde ve onlardan elde ettiğimiz direnç kazanmış kökenlerin hemoliz yapma özellikleri test edilmiştir. *C. albicans* ATCC 10231 α -hemoliz gösterirken direnç kazanmış olan hemoliz yapma özelliğini kaybetmiştir. *C. parapsilosis* (α -hemoliz), *C. glabrata* (non-hemoliz) referans ve mutant kökenlerinin hemoliz karakterlerinde ise bir değişim meydana gelmemiştir. Ellepola ve arkadaşlarının (2015) yapmış oldukları bir çalışmada sağlıklı ve çeşitli hastalıklara sahip bireylerin oral kaviterlerinden aldıkları *C. albicans* kökenleri ile yapılan çalışmada kökenler, sublethal konantrasyonda kaspofungin, amfoterisin B, nistatin, ketakonazol ve flukazole 1 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Kısa maruziyet sonunda hemoliz özelliklerinde bir değişim meydana gelmediği bildirilmiştir [141]. Bu çalışma sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Referans ve mutant kökenlerin SAP enziminin varlığı *in vitro* olarak araştırılmıştır. SAP enziminin *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. glabrata* mutant köken hariç diğer test edilen tüm kökenlerde mevcut olduğu saptanmıştır. Çalışmada SAP inhibisyon zonunun iç ve dış çapları ölçülmüştür. Buna göre, diğer virülans özelliklerinde olduğu gibi, *C. albicans* ATCC 10231 kökeninin mutant köken ile karşılaştırıldığında zon çapında bir düşme yaşanırken, *C. parapsilosis* mutant kökenin zon çapının *C. parapsilosis* 22019 referans kökenine göre arttığı tespit edilmiştir. Dirençli kökenlere ait SAP aktivitesinin irdelendiği çalışmalarda,

SAP aktivitesinin maruziyete bağılı olarak arttığı gözlenmiştir. Örneğin itrakonazole dirençli *C. albicans* kökenlerinin daha güçlü SAP aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir [142]. Amerika’da yapılan bir çalışmada 4 µg/ml’den 16 µg/ml’ye kadar uzanan 7 saatlik kaspofungine maruziyet sonrasında, 1 saat içinde *SAP5* ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [143]. Çalışmamızda elde ettiğimiz *C. parapsilosis* mutant kökeni, benzer olarak daha yüksek bir SAP aktivitesi sergilemiştir. Bu sonuçlara göre direncin SAP aktivitesini arttırdığı söylenebilir.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yetenekleri önemli bir virülans faktördür. Biyofilm matriksi fiziksel bariyer görevi görmektedir. İç kısmında yer alan hücreleri korurken antifungal ilaçların bağlamasını engellemektedir. Böylece antifungal konsantrasyonunu düşürmektedir [144]. Planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında biyofilm yapısının ekinokandin grubu antifungallere göre 2 ile 20 kat daha fazla dirençli olduğu saptanmıştır [145]. Virülans özelliklerini araştırdığımız *C. albicans* referans köken ve direnç kazandırılmış köken biyofilm oluşturmamıştır. Ancak *C. parapsilosis* referans köken biyofilm yapamazken, direnç kazandırılmış köken orta seviyede bir biyofilm özelliği göstermiştir. *C. glabrata* diğer *Candida* kökenleri arasında biyofilm içinde en az aktivite gösteren türdür. Bu nedenle *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*’e göre daha az biyokütle oluşturduğu bilinmektedir [54]. İspanya’da yapılan bir çalışma *FKS2* mutasyonuna sahip *C. glabrata* kökeninin diğer *Candida* kökenlerine göre daha düşük oranda biyofilm yaptığı bildirilmiştir [146]. Başka bir çalışmada *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* kökenleri 24 saat mikafungin ve kaspofungine 24 saat muamele edildikten sonra biyofilm yapma özelliklerine bakıldıklarında *Candida* kökenlerinin biyofilm yapma özelliklerinde düşüş olduğu gözlenmiştir [147]. Ancak Nett ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada, *FKS1* yüksek ifadesine bağılı olarak biyofilm oluşumunun ve antifungallere karşı direncin arttığını göstermişlerdir [148]. Bizim çalışmamızda, biyofim üretimi ile antifungal direnç arasında sınırlı bir ilişki gösterilmiştir. Dolayısıyla konuda kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

Çalışmamızda, esteraz ve fosfolipaz özellikleri bakımından dirençli mutant kökenler ile referans kökenler arasında belirgin farklılıklar bulunmamıştır. Çeşitli antifungallerin direncinin virülans özelliklerine etkisi araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır, ancak kaspofungine direnç geliştirilerek mutant yapılmış kökenlerin virülans özellikleri ile ilgili yapılan çalışma olmadığı için yeterli karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızın literatüre önemli katkısı olacağına inanılmaktadır.

Duyarlı ve mutant kökenlerin *in vivo* olarak virülans özellikleri *Galleria mellonella* larvası kullanılarak araştırılmıştır. Memeli hayvanlar yerine maliyet, etik kurallar ve çalışma süresi göz önünde bulundurularak mini deney hayvanı modeli tercih edilmiştir. Bu nedenle literatürde öncü çalışmalardan biridir. Referans kökenler ile bunların kaspofungine artan dozlarda maruz bırakılması sonucunda elde edilen mutant dirençli kökenler *G. mellonella* larvasına verilerek, larvaların sağ kalımları takip edilmiştir. Referans kökenler ve mutant kökenlerin larva enfeksiyon modelindeki mortalitelerine bakıldığında, birbirlerine yakın oldukları gözlemlenmiştir. Kaspofungin direncinin virülans faktörlerinden bağımsız olduğu görülmüştür. Kaspofungin dirençli kökenler ile oluşan enfeksiyonların mortalitesi, kaspofungin duyarlı kökenden farklı bulunmamıştır. Kaspofungin direncinin virülansı ve mortaliteyi etkilemediği anlaşılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* sonuçlarımız bu bağlamda paralellik göstermiştir.

Çalışmamız referans kökenlerden kaspofungine maruz bırakılarak elde edilen dirençli mutant kökenlerinin, *G. mellonella* larva enfeksiyon modelinde *in vivo* olarak virülansının değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu nedenle maruziyete bağlı direnç gelişen *Candida* kökenlerinin virülans özelliklerini karşılaştırabileceğimiz çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte bakteriler üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda, virülans ile antibiyotik direncinin birbirinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Chusri ve arkadaşları (2014), 222 adet *Acinetobacter* türleri üzerinde çalışmışlardır. *G. mellonella* virülans deneyi sonucunda, karbepenem dirençli olan kökenler ile duyarlı olan kökenlerin virülansları arasında bir farklılık bulunmamıştır [149]. Wand ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen kolistin dirençli *A. baumannii* kökenlerinin virülansı, *G. mellonella* larvalarında değerlendirilmiştir. Kökenler 6 hafta süreyle kolistine maruz bırakılmıştır. *PMR*, *IPX* genlerinde mutasyon oluşan kökenlerin virülansı ile duyarlı vahşi kökenlerin virülansı arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir [150]. Başka bir çalışmada, *G. mellonella* modelinde karbapenemaz üretmeyen ve üreten *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin virülansları incelenmiştir. Karbapenemaz üretmeyen *K. pneumoniae* kökeninin, üreten kökene göre daha virulent olduğu tespit edilmiştir [151]. Kalkancı ve arkadaşları (2015), antibiyotiklere dirençli ve duyarlı mantar ve bakteri kökenleri ile larva modelleri oluşturmuşlardır. Çalışmada, antibiyotik ve antifungal direncinin larvalardaki enfeksiyonun mortalitesini değiştirmediği sonucuna ulaşılmıştır [94]. *In vivo* ve *in vitro* virülans çalışmalarımızın sonuçları birbirleri ile paralellik göstermiştir. Direnç ile virülans arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Direncin, virülanstan farklı bir kavram olduğu, hastalık patogenezinde virülans faktörleri gibi etkili olmadığı düşünülmüştür. Direnç gelişimi, virülansı düşük kökenlerde tedaviyi engelleyebilen ve mortaliteyi kendi başına arttıran bir özelliktir. Virülansı yüksek bir köken ile oluşan duyarlı bir enfeksiyonun tedavisi kolaylıkla yapılabilirken, düşük virülansa sahip ancak dirençli bir *Candida* kökeni ile oluşan enfeksiyon hasta için ölümcül sonuçlanabilmektedir.

6. SONUÇ

Ekinokandinler rehberlerde çeşitli *Candida* enfeksiyonlarında ilk tedavi seçeneği olarak önerilen direnç gelişimi yeni tanımlanmaya başlamış ve azol direnci gelişmiş kökenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla başvurulanan yeni nesil antifungallerdir. Ekinokandin kullanımı sırasında direnç gelişen olguların bildirilmesi, çalışmamızın temel hipotezini oluşturmuştur.

Çalışmamız ekinokandin sınıfı içinde en çok tercih edilen antifungal olan kaspofungine direnç kazanan *Candida* türlerinin virülans özelliklerinin nasıl değiştiğinin anlaşılması amacıyla yapılmıştır. Kaspofungine duyarlı olan *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 referans kökenleri, artan konsantrasyonlarda ardışık pasajlar ile kaspofungine (0,03 µg/ml- 16 µg/ml) maruz bırakılarak dirençli hale getirilmiştir. Maruziyete bağlı olarak *C. albicans* 0,48 µg/ml'de *C. glabrata* 0,18 µg/ml'de ve *C. parapsilosis* 1,48 µg/ml'de dirençli hale gelmiştir. Referans ve dirençli kökenlerin çeşitli antifungaller ve kaspofungin için MİK değerleri belirlenmiştir. Maruziyet sonucunda dirençli olarak kabul edilen kökenlerin MİK değerleri CLSI M27-A3 ve S4 formunda yer alan verilerde duyarlı ya da orta dirençli olarak belirlenmiştir; buna rağmen duyarlı referans kökenlere göre dirençli kökenlerde bir ya da iki kat MİK artışı olduğu belirlenmiştir.

Kaspofungin maruziyeti sonrasında gelişen dirençli kökenlerdeki etkinin ekinokandinlerde dirençten sorumlu *FKS1* ve *FKS2* genlerinin çok iyi korunmuş Hot Spot1 ve Hot Spot2 bölgelerindeki mutasyonlara bağlı olup olmadığı anlaşılması için dizi analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarında *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC MYA 2950 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 referans kökenlerinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. *C. albicans* ATCC 10231 referans kökeninin verilerini gen bankasındaki veriler ile eşleşmemiştir. Direnç kazandırılan *C. glabrata* kökeninin *FKS1* gen bölgesinde mutasyon tespit edilirken, *C. parapsilosis* dirençli kökeninin *FKS1 HS2* bölgesinde nokta mutasyonlar bulunmuştur. Böylece kökenlerde mutasyon olduğu doğrulanmıştır.

Referans kökenler ve mutant kökenlerin virülans seyrinde dirence bağlı olarak değişim olup olmadığı anlaşılması için *in vivo* ve *in vitro* virülans deneyleri yapılmıştır. *In vitro*

deneylerde elde edilen verilerde virölans özelliklerinde mutasyona ve dirence bağlı olarak belirgin bir değişim tespit edilmemiştir. *In vivo* virölans deneyi olarak *Galleria mellonella* larvası kullanılmıştır. *G. mellonella* larvalarının mortalitelerinde mutant ve referans kökenler arasında önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. *In vivo* ve *in vitro* deneyler sonucunda kaspofungin direncinin virölans faktörlerinden bağımsız olduğu görülmüştür. Kaspofungin dirençli kökenler ile oluşan enfeksiyonların mortalitesi, kaspofungin duyarlı kökenden farklı bulunmamıştır. Kaspofungin direncinin virölansı ve mortaliteyi etkilemediği anlaşılmıştır.

Antifungallerin kısıtlı olması ve hızla gelişen direnç mekanizmaları nedeniyle direnç gelişimlerinin aydınlatılması konusu, tedavi uygulamaları için önem arz etmektedir. Her ne kadar yeni nesil bir ilaç olarak kabul edilse de profilaktik ve terapötik olarak kullanımına bağlı olarak kaspofungine direnç gelişmektedir. Çalışmamızda kaspofungine maruz kalmaya bağlı gelişen direnç ile virölans arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamız sonuçları topluca değerlendirildiğinde, bundan sonra benzer bir çalışma yürütecek araştırmacılar için bazı öneriler sıralanmıştır;

1. Kaspofungin tedavisi sırasında direnç gelişebilir. Bu direnç klinik cevabı değiştirebilir, tedavi başarısını azaltabilir. Bu konuda dikkatli olunmalıdır.
2. *In vitro* koşullarda, düşük dozda ilaç ile uzun süre karşılaşma sonrasında direnç geliştirilebilir. Bu dirençli kökenlerin virölans özelliklerine bakılması bu alandaki bilgi ve veriyi arttıracaktır.
3. *In vivo* model olarak larvaların kullanımı yaygınlaşmalıdır.
4. Bakteri enfeksiyonları için de direnç-virölans ilişkisine dayalı modeller geliştirilmelidir

KAYNAKLAR

1. Perlin, D. S. (2015), Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 1-11.
2. Howell, S., A., Hazen, K., C. (2011). *Candida, Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edition. Washington DC: ASM pres, 1793-1821.
3. Sardi, J., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. Giannini, M., M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *Journal of Medical Microbiology*. 62, 10-24.
4. Yiğit, N. Benli, M. (2005). Maya hücre duvar yapısının dinamikleri. *Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(3):11-17.
5. Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M. (2002). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri. Bölüm 118, 4, 123, 180.5.
6. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller. (2014). Tıbbi mikrobiyoloji. (Çev. ed. M. A., Başustaoglu, A. C., Yıldiran, Ş. T., Tanyüksel, M. Yapar, M). Altıncı baskı., Ankara: Atlas Kitapçılık, 679-791.
7. MacCallum, D., M. (2011). Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1-12.
8. de Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., de Sousa Cartágenes, M. d. S., Filho, A. K. D. B., do Nascimento, F. R. F., Ramos, R. M., Pires, E. R. R. B., de Andrade, M. S., Rocha, F. M. G. de Andrade Monteiro, C. (2018). *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents, *Frontiers in Microbiology*. 9, 1351.
9. Calderone, R. A., Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335.
10. Sellam, A., Whiteway, M. (2016). Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *F1000 Research*, 5, 2582-2582.
11. Höfs, S., Mogavero, S. Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54, 149-169.
12. Moyes, D. L., Richardson, J. P. Naglik, J. R. (2015). *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*, 6, 338-346.
13. Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 595-601.
14. Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R. Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10, 85-93.

15. Badur S., Abacıoğlu H., Ongen B. (2015). Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık, İstanbul: Akademi Yayınevi, 675-686.
16. Soll, D. R. (2009). Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Research*, 9, 973-989.
17. Tao, L., Du, H., Guan, G., Dai, Y., Nobile, C. J., Liang, W., Cao, C., Zhang, Q., Zhong, J. Huang, G. (2014). Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: Roles of Non-genetic Diversity in Host Adaptation. *PLOS Biology*, 12(8), 1-14 (e1001830).
18. Deorukhkar, S. C., Saini, S. Mathew, S. (2014). Non-albicans *Candida* infection: an emerging threat. *Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases*, 2014,1-8
19. Mattei, A. S., Alves, S. H., Severo, C. B., Guazzelli, L. d. S., Oliveira, F. d. M. Severo, L. C. (2013). Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 340-342.
20. Silva-Rocha, W. P., de Brito Lemos, V. L., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., Svidzinski, T. I. E., Milan, E. P. Chaves, G. M. (2015). Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 6.
21. das Mohan, V. Ballal, M. (2008). Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 25, 208-210.
22. Mayer, F. L., Wilson, D. Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4, 119-128.
23. Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 19.
24. Satılmış, Ö. K., Akkaya, Y., Ergin, Ç. Kaleli, İ. (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* sp. kökenlerinde slime faktör üretimi. *Pamukkale Tıp Dergisi*. 25-29.
25. Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C. Lopez-Ribot, J. (2009) Our current understanding of fungal biofilms, *Critical Reviews in Microbiology*. 35, 340-355.
26. Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D. Azeredo, J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47, 681-689.
27. Harriott, M., Lilly, E., Rodriguez, T., Fidel Jr, P. Noverr, M. (2010). *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology*, 156, 3635-3644.
28. Nobile, C. J., Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71-92.

29. Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. Ghannoum, M. A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, 71, 4333-4340.
30. Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., Walsh, T. J. (2015). The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm–Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clinical Infectious Diseases*, 61, 618-621.
31. Concia, E., Azzini, A. M. Conti, M. (2009). Epidemiology Incidence and Risk Factors for Invasive Candidiasis in High-Risk Patients. *Drugs*, 69, 5-14.
32. Borman, A. M., Szekely, A., Linton, C. J., Palmer, M. D., Brown, P. Johnson, E. M. (2013). Epidemiology, antifungal susceptibility and pathogenicity of *Candida africana*; isolates from the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3):967-972.
33. Azoulay, E., Cohen, Y., Zahar, J. R., Garrouste-Orgeas, M., Adrie, C., Moine, P., de Lassence, A. Timsit, J.-F. (2004). Practices in non-neutropenic ICU patients with *Candida*-positive airway specimens. *Intensive Care Medicine*, 30, 1384-1389.
34. Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10, 95-105.
35. Viscoli, C., Girmenia, C., Marinus, A., Collette, L., Martino, P., Vandercam, B., Doyen, C., Lebeau, B., Spence, D., Krcmery, V., De Pauw, B. Meunier, F. (1999). Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28, 1071-1079.
36. Cisterna, R., Ezpeleta, G. Telleria, O. (2010). Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain,. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 4200-4206.
37. Yapar, N., Pullukcu, H., Avkan-Oguz, V., Sayin-Kutlu, S., Ertugrul, B., Sacar, S., Cetin, B. Kaya, O. (2011). Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study. *Medical Mycology*, 49, 26-31.
38. Wilson, L. S., Reyes, C. M., Stolpman, M., Speckman, J., Allen, K. Beney, J. (2002). The Direct Cost and Incidence of Systemic Fungal Infections. *Value in Health*, 5, 26-34.
39. Kullberg, B. J. Arendrup, M. C. (2015). Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373, 1445-1456.
40. Sanguinetti, M., Posteraro, B. Lass- Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58, 2-13.
41. Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K. Yamaguchi, H. (2009). *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*, 53, 41-44.

42. Vallabhaneni, S. (2016) Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus-United States, May 2013–August 2016, *American Journal of Transplantation*, 17(1), 296-299.
43. Kniemeyer, O., Schmidt, A. D., Vödisch, M., Wartenberg, D. Brakhage, A. A. (2011). Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 368-377.
44. McPherson, R. A. Pincus, M. R. (2017). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*, 21st edition. Elsevier Health Sciences, 1207-1208.
45. da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B. Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 111-118.
46. Childers, D. S., Raziunaite, I., Avelar, G. M., Mackie, J., Budge, S., Stead, D., Gow, N. A., Lenardon, M. D., Ballou, E. R. MacCallum, D. M. (2016). The rewiring of ubiquitination targets in a pathogenic yeast promotes metabolic flexibility, host colonization and virulence. *PLoS Pathogens*, 12, 1-26.
47. Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. L. Burton, G. R. W. (2011). *Burton's microbiology for the health sciences*. Philadelphia:Lippincott Williams Wilkins, 81-396.
48. Makanjuola, O., Bongomin, F. Fayemiwo, S. (2018). An Update on the Roles of Non-albicans *Candida* Species in Vulvovaginitis. *Journal of Fungi*, 4, 121.
49. Odds F. C. (2018). Pathogenesis of fungal disease. In:Kibbler, C. C., Barton, R., Gow, N. A., Howell, S., MacCallum, D. M. Manuel, R. J. (Eds) *Oxford Textbook of Medical Mycology*. First edition. England:Oxford University Press, 56-61.
50. Maertens, J. A., Girmenia, C., Brüggemann, R. J., Duarte, R. F., Kibbler, C. C., Ljungman, P., Racil, Z., Ribaud, P., Slavin, M. A. Cornely, O. A. (2018). European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(12), 3221-3230.
51. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. Azeredo, J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 288-305.
52. Warren N. G., Hazen K. C. (1999). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Murray P R, Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H., *Manual of clinical microbiology*. Seventh edition., Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1184-1199.
53. Trofa, D., Gácsér, A. Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 606-625.

54. Rodrigues, C. F., Silva, S. Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 33, 673-688.
55. Ames, L., Duxbury, S., Pawlowska, B., Ho, H.-l., Haynes, K. Bates, S. (2017). *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. *Virulence*, 8, 1909-1917.
56. Şahiner, F., Ergünay, K., Özyurt, M., Ardıç, N., Hoşbul, T. Haznedaroğlu, T. (2011). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 45, 478-88.
57. Khan, Z., Ahmad, S., Joseph, L. Chandy, R. (2012). *Candida dubliniensis*: An Appraisal of Its Clinical Significance as a Bloodstream Pathogen. *Plos One*, 7(3),1-6.
58. Larone, H. (2002). Medically important fungi: a guide to identification. *American Society for Microbiology*. 4th edition. Washington; ASM press, 266-268.
59. Yılmaz, E., Erdoğan, N. A., Özcan, A., Uçan, G., Atalay, A., Karakükçü, M., Patiroğlu, T. Ünal, E. (2018). *Candida kefyr* (Kluyveromyces Marxianus) As A Notable Yeast in Patients Receiving Treatment For Childhood Cancer, *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tıp Dergisi*. 40(1), 1-2.
60. Li, R., Zhang, L., Zhang, H., Yi, Y., Wang, L., Chen, L. Zhang, L. (2017). Protective effect of a novel antifungal peptide derived from human chromogranin a on the immunity of mice infected with *Candida krusei*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13, 2429-2434.
61. Savini, V., Catavittello, C., Di Marzio, I., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Bianco, A., Pompilio, A., Di Bonaventura, G. D'Amario, C. (2010). Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. *Mycopathologia*, 169, 457-459.
62. Chen, Y., Peng, H.-M., Wang, X., Li, B.-Q., Long, M.-Y. Tian, S.-P. (2017). Biodegradation mechanisms of patulin in *Candida guilliermondii*: An iTRAQ-based proteomic analysis. *Toxins*, 9, 48.
63. Kirby, J. E., Branch-Elliman, W., LaSalvia, M. T., Longhi, L., MacKechnie, M., Urman, G., Baldini, L. M., Muriel, F. R., Sullivan, B. Yassa, D. S. (2017). Investigation of a *Candida guilliermondii* pseudo-outbreak reveals a novel source of laboratory contamination. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(4), 1080-1089.
64. Girmenia, C., Pizzarelli, G., Cristini, F., Barchiesi, F., Spreghini, E., Scalise, G. Martino, P. (2006). *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2458-2464.
65. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S. C., Gibbs, D. L. Newell, V. A. (2006). *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3551-3556.

66. Moran, G., Coleman, D. Sullivan, D. (2012). An introduction to the medically important *Candida* species in *Candida and Candidiasis*, R. A. Calderone, C. J. Clancy (Eds.), *American Society of Microbiology*. Second Edition. Washington DC: ASM pres, 11-25
67. Tsay, S., Kallen, A., Jackson, B. R., Chiller, T. M. Vallabhaneni, S. (2018). Approach to the Investigation and Management of Patients With *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. *Clinical Infectious Diseases*, 66, 306-311.
68. Lamoth, F. Kontoyiannis, D. P. (2018). The *Candida auris* Alert: Facts and Perspectives. *The Journal of Infectious Diseases*, 217, 516-520.
69. Yeğenoğlu, Y. (2012). Antifungal direnci gösteren mantarlar. *Ankem Dergi*, 26, 254-260.
70. Somer, A. Pediatrik Hastalarda Antifungal Tedavi Stratejileri. *Ankem Dergi*, 2012, 26 (Ek2), 298-304.
71. Ali, M. F., Rezaei, A. A. Raiesi, O. (2018). Antifungal agents: polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journals of Basic Research in Medical Sciences*, 5(2), 48-55.
72. Vandeputte, P., Ferrari, S. Coste, A. T. (2011). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012, 1-26.
73. Karthaus, M. (2011). Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin-review of the literature. *European Journal of Medical Research*, 16, 145.
74. Mayr, A., Aigner, M. Lass- Flörl, C. (2012). Caspofungin: when and how? The microbiologist's view. *Mycoses*, 55, 27-35.
75. Noor, A. Pellegrini, M. V. (2018). Antifungal, Membrane Function Inhibitors (Amphotericin B). *Europe PMC*, PMID:29493952.
76. Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N. Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 70-76.
77. Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A. Monk, B. C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 291-321.
78. Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R. Fadda, G. (2005). Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 668-679.
79. Arendrup, M. C. Patterson, T. F. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216, 445-451.
80. Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125, 3-13.

81. Sanglard, D. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3, 11.
82. Morio, F., Jensen, R. H., Le Pape, P. Arendrup, M. C. (2017). Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50, 599-606.
83. Anderson, J. B. (2005). Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 547.
84. Robbins, N., Caplan, T. Cowen, L. E. (2017). Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annual Review of Microbiology*, 71, 753-775.
85. Hori, Y. Shibuya, K. (2018). Role of *FKS* gene in the susceptibility of pathogenic fungi to echinocandins. *Medical Mycology Journal*, 59, 31-40.
86. Wiederhold, N. P. (2016). Echinocandin resistance in *Candida* species: a review of recent developments. *Current Infectious Disease Reports*, 18, 42.
87. Perlin, D. S., Shor, E. Zhao, Y. (2015). Update on antifungal drug resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2, 84-95.
88. Levinson, W. E. (2018). Genetik. In: Şener B., Esen B., Review of Medical Microbiology and İmmünology. 14th edition. New York: McGraw Hill Professional, 18-19.
89. Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, 2012(70), 4392.
90. Selim, A., Yang, E., Rousset, E., Thiéry, R. Sidi-Boumedine, K. (2018). Characterization of *Coxiella burnetii* strains from ruminants in a *Galleria mellonella* host-based model. *New Microbes and New Infections*, 24, 8-13.
91. Li, Y., Spiropoulos, J., Cooley, W., Khara, J. S., Gladstone, C. A., Asai, M., Bossé, J. T., Robertson, B. D., Newton, S. M. Langford, P. R. (2018). *Galleria mellonella*-a novel infection model for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 9, 1126-1137.
92. Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A. Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella*, as a model system for studying *Listeria* pathogenesis, *Applied and Environmental Microbiology*. 76, 310.
93. Karaman, M. (2016). *In vivo* enfeksiyon modellerinin yükselen yıldızı: *Galleria mellonella* larvası. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 46(1): 1-7.
94. Kalkancı, A., Fouad, A., Erdoğan, M., Altay, A., Aliyeva, Z., Bozdayı, G. Çağlar, K. (2015). Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın *in vivo* model olarak kullanılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 49, 366-76.
95. Lee, K. K., MacCallum, D. M., Jacobsen, M. D., Walker, L. A., Odds, F. C., Gow, N. A. Munro, C. A. (2012). Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 208-217.

96. Ozkan, S., Kaynak, F., Kalkanci, A., Abbasoglu, U. Kustimur, S. (2005). Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 319-324.
97. Yıldırım, M., Mumcuoğlu, İ., Kurşun, Ş., Koldaş, K., Yetener, V. Balaban, N. (2009). Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-*albicans* *Candida* suşlarındaki bazı virölans faktörlerinin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39(3-4), 62-68.
98. Fatahinia, M., Poormohamadi, F. Mahmoudabadi, A. Z. (2015). Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 1-4.
99. GunTang, W., Kamonvoradej, N., Chomchat, C., Suriyakan, S., Sanit, S., Wongwigkarn, J., Bunchu, N., Thongwat, D. Lamlertthon, S. (2017). Prevalence and virulence factors of *Candida* spp. associated with blow flies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 428-431.
100. Etiz, P., Kibar, F., Ekenoğlu, Y. Yaman, A. (2015). Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımının ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Ankem Dergisi*, 29, 105-113.
101. Chassot, F., Venturini, T. P., Piasentin, F. B., Rossato, L., Fiorini, A., Svidzinski, T. I. E. Alves, S. H. (2016). Exploring the in vitro resistance of *Candida parapsilosis* to echinocandins. *Mycopathologia*, 181, 663-670.
102. Fekete- Forgács, K., Gyüre, L. Lenkey, B. (2000). Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, 43, 273-279.
103. Bordallo-Cardona, M. Á., Marcos-Zambrano, L. J., Sánchez-Carrillo, C., de la Pedrosa, E. G. G., Cantón, R., Bouza, E., Escibano, P. Guinea, J. (2018). Mutant prevention concentration and mutant selection window of micafungin and anidulafungin in clinical *Candida glabrata* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(3), 1-11.
104. Fothergill, A. W. (2012). Antifungal susceptibility testing: clinical laboratory and standards institute (CLSI) methods. In: Hall G. S. (Eds.), *Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents*. First edition. London: Humana Press. 65-74
105. Pfaller, M. Diekema, D. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of candida spp. using clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010-2012. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2846-2856.
106. Castanheira, M., Woosley, L. N., Diekema, D. J., Messer, S. A., Jones, R. N. Pfaller, M. A. (2010) Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 2655-2659.

107. Lackner, M., Tscherner, M., Schaller, M., Kuchler, K., Mair, C., Sartori, B., Istel, F., Arendrup, M. Lass-Flörl, C. (2014). Position and numbers of *FKS* mutations in *C. albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibility to echinocandin treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3626- 3635.
108. Cheung, Y.-Y. Hui, M. (2017). Effects of Echinocandins in combination with Nikkomycin Z against invasive *Candida albicans* bloodstream isolates and the *FKS* mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), 1-4.
109. Ben-Ami, R., Garcia-Effron, G., Lewis, R. E., Gamarra, S., Leventakos, K., Perlin, D. S. Kontoyiannis, D. P. (2011). Fitness and virulence costs of *Candida albicans FKS1* hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *Journal of Infectious Diseases*, 204, 626-635.
110. Dudiuk, C., Gamarra, S., Leonardeli, F., Jimenez-Ortigosa, C., Vitale, R. G., Afeltra, J., Perlin, D. S. Garcia-Effron, G. (2014). Set of classical PCR reactions for the detection of mutations in *Candida glabrata FKS* genes linked with echinocandin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2609 –2614.
111. Ben-Ami, R., Garcia-Effron, G., Lewis, R., Gamarra, S., Leventakos, K., Perlin, D. Kontoyiannis, D. (2011). The fitness and virulence cost of *fkf1* mutations causing echinocandin-resistance in *Candida albicans*. *Journal of Infection Disease*, 204, 626-35.
112. Gökdal, I., Kalkancı, A., Paçal, G. Altuğ, Z. (2002). *Candida* colonization on the surface of orthodontic brackets and the adhesion of these strains to buccal epithelial cells. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 36, 65-69.
113. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. Beachey, E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37, 318-326.
114. Demirbilek, M., Timurkaynak, F., Azap, F. C. Ö. Arslan, H. (2007). Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 41, 261-269.
115. Khan, Z., Ahmad, S., Mokaddas, E., Meis, J. F., Joseph, L., Abdullah, A. Vayalil, S. (2018). Development of echinocandin resistance in *Candida tropicalis* following short-term exposure to caspofungin for empiric therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), 1-7.
116. Mandelblat, M., Frenkel, M., Abbey, D., Ben Ami, R., Berman, J. Segal, E. (2017). Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. *Mycoses*, 60, 534-545.
117. Deepa, K., Jeevitha, T. Michael, A. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 7, 28-32.
118. Shoham, S. Levitz, S. M. (2005). The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129, 569-582.

119. Parente-Rocha, J. A., Bailão, A. M., Amaral, A. C., Taborda, C. P., Paccez, J. D., Borges, C. L. Pereira, M. (2017). Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-17.
120. Seyedmousavi, S., Bosco, S. d. M. G., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Jacobsen, I. D., Jensen, H. E., Martel, A., Mignon, B., Pasmans, F., Piecková, E., Rodrigues, A. M., Singh, K., Vicente, V. A., Wibbelt, G., Wiederhold, N. P. Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology*, 56, 165-187.
121. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L. Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18026.
122. Kabir, M. A., Hussain, M. A. Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. *International Scholarly Research Network Microbiology*, 2012, 1-16.
123. Mokaddas, E. M., Al-Sweih, N. A. Khan, Z. U. (2007). Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 255-259.
124. Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 5-10.
125. Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S. Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2173.
126. Chen, S. C.-A., Slavin, M. A. Sorrell, T. C. (2011). Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. *Drugs*, 71, 11-41.
127. Jensen, R., Johansen, H., Søes, L., Lemming, L. E., Rosenvinge, F., Nielsen, L., Olesen, B., Kristensen, L., Dzajic, E. Astvad, K. (2016). Posttreatment antifungal resistance among colonizing *Candida* isolates in candidemia patients: results from a systematic multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 1500-1508.
128. Lortholary, O., Desnos-Ollivier, M., Sitbon, K., Fontanet, A., Bretagne, S., Dromer, F. Group, F. M. S. (2011). Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 532-538.
129. Bordallo-Cardona, M. Á., Escribano, P., de la Pedrosa, E. G. G., Marcos-Zambrano, L. J., Cantón, R., Bouza, E. Guinea, J. (2017) In vitro exposure to increasing micafungin concentrations easily promotes echinocandin resistance in *Candida glabrata* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 1-5.
130. Pfaller, M., Boyken, L., Hollis, R., Kroeger, J., Messer, S., Tendolkar, S. Diekema, D. (2008) In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 150-156.

131. Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jiménez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S. A., Perlin, D. S. Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 56, 1724-1732.
132. Pfaller, M., Castanheira, M., Lockhart, S., Ahlquist, A., Messer, S. Jones, R. (2012). Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2010) and the Centers for Disease Control and Prevention Population-Based Surveillance (2008-2010). *Journal of Clinical Microbiology*, 1199 –1203.
133. Garcia-Effron, G., Park, S. Perlin, D. S. (2009). Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fkp1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*, implications for interpretive breakpoints. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 112.
134. Shields IV, C. W., Reyes, C. D. López, G. P. (2015). Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a Chip*, 15, 1230-1249.
135. Beyda, N. D., John, J., Kilic, A., Alam, M. J., Lasco, T. M. Garey, K. W. (2014). *FKS* mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 59, 819-825.
136. Pham, C. D., Iqbal, N., Bolden, C. B., Kuykendall, R. J., Harrison, L. H., Farley, M. M., Schaffner, W., Beldavs, Z. G., Chiller, T. M. Park, B. J. (2014). The role of *FKS* mutations in *C. glabrata*: MIC values, echinocandin resistance and multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4690-4696.
137. Chapeland-Leclerc, F., Hennequin, C., Papon, N., Noël, T., Girard, A., Socié, G., Ribaud, P. Lacroix, C. (2010). Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1360-1362.
138. Park, S., Kelly, R., Kahn, J. N., Robles, J., Hsu, M. J., Register, E., Li, W., Vyas, V., Fan, H., Abruzzo, G., Flattery, A., Gill, C., Chrebet, G., Parent, S. A., Kurtz, M., Teppler, H., Douglas, C. M. Perlin, D. S. (2005). Specific substitutions in the echinocandin target *Fks1p* account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 3264.
139. Kyselgof, G., Sandovsky-Losica, H., Berdicevsky, I. Segal, E. (2007). Caspofungin affects adhesion of *Candida* to a human cell line. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 17, 1-7.
140. Gregori, C., Glaser, W., Frohner, I. E., Reinoso-Martín, C., Rupp, S., Schüller, C. Kuchler, K. (2011). *Efg1* controls caspofungin-induced cell aggregation of *Candida albicans* through the adhesin Als1. *Eukaryotic Cell*, 10, 1694.

141. Ellepola, A. N., Khajah, R., Jayatilake, S., Samaranayake, L., Sharma, P. Khan, Z. (2015) Impact of brief exposure to antifungal agents on the post-antifungal effect and hemolysin activity of oral *Candida albicans*. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*. 23, 412-8.
142. Feng, W., Yang, J., Pan, Y., Xi, Z., Qiao, Z. Ma, Y. (2015). The correlation of virulence, pathogenicity, and itraconazole resistance with SAP activity in *Candida albicans* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 62, 173-178.
143. Ripeau, J.-S., Aumont, F., Belhumeur, P., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H. de Repentigny, L. (2002). Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 3096.
144. Walker, L. A., Gow, N. A. Munro, C. A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 117-126.
145. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8, 1325-1337.
146. Marcos-Zambrano, L. J., Gómez-Perosanz, M., Escribano, P., Zaragoza, O., Bouza, E. Guinea, J. (2016). Biofilm production and antibiofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin B in echinocandin-resistant yeast species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 3579.
147. Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E. Henriques, M. (2018). Susceptibility of *Candida glabrata* biofilms to echinocandins: alterations in the matrix composition. *Biofouling*, 1-10.
148. Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K. Andes, D. R. (2010). Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3505.
149. Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J. I., Silpapojakul, K., Singkhamanan, K., McNeil, E. Doi, Y. (2014). Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 4172.
150. Wand, M. E., Bock, L. J., Bonney, L. C. Sutton, J. M. (2015). Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2209-2216.
151. McLaughlin, M. M., Advincula, M. R., Malczynski, M., Barajas, G., Qi, C. Scheetz, M. H. (2014). Quantifying the clinical virulence of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* with a *Galleria mellonella* model and a pilot study to translate to patient outcomes. *BMC Infectious Diseases*, 14, 31.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Nurnehir BALTACI
 Uyruğu : Türkiye
 Doğum tarihi ve yeri : 03/07/1987 Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0538 418 42 19
 e-mail : nurnehirgazi@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji AD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji AD	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-Devam ediyor	Yüksek İhtisas Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Japonca

Yayınlar

1. **Baltacı N.**, Kalkancı A.,(2018) Characterization of Candida strains exposed to caspofungin, First Balkan Conference of Medical Mycology and Mycotoxicology (BALKAN FUNGUS 2018),Romania 2018
2. **Baltacı, N.**; Kalkancı, A. (2018) The pathogenes potential of Archaea. Acta Medica Alanya, 2.2: 131-135.
3. Çiçek Ç., **Baltacı N.**, (2018) Obesity And Endoplasmic Reticulum Stress, 1st International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology,Nevşehir, Turkey 997-998 (PP-ID- 444).
4. **Baltacı N.**, Çiçek Ç., (2018) Obesity And Methanogenic Archaea, 1st International Congress on Sports, Anthropology, Nutrition, Anatomy and Radiology,Nevşehir, Turkey 999-1000 (PP-ID- 445).
5. **Baltacı, N.**; Yuksekdag, Z.; Aslim, B. (2017) Biodegradation of petroleum hydrocarbon pollutants by halophilic bacteria and archaea strains. *Fresenius Environmental Bulletin*, , 26.1 A: 686-694.

6. Yüksekdağ Z., **Baltacı N.**, Aslim B.,(2015) Türkiye’den İzole Edilen Halofilik Mikroorganizmaların BTX Bileşenlerini Karbon ve Enerji Kaynağı Olarak Kullanımlarının Belirlenmesi, Ekoloji 2015 Sempozyumu, Sinop, Turkey, 446 (ID-239).
7. **Baltacı, N.**; Yüksekdağ, Z. (2014). Organik Kirleticilerin Tuzcul Çevrelerde Biyodegradasyonu. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3.2: 48-56.
8. Yüksekdağ, Z.; **Baltacı, N.** (2013). *Staphylococcus aureus* Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 43(3), 77-83.

Hobiler

Dil öğrenmek, Yüzme, Halk Dansları



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

