



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Candida parapsilosis KÖKENLERİNDE ANTİFUNGAL DİRENCİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ÖZGE KURT

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖMER KÜÇÜKBASMACI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon No	Revizyon Tarihi	Sayfa No
414.1.17F	04.03.2020	00	00.00.0000	1/1

Bu çalışma 16.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI
İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU
İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Özlem GÜVEN
Medipol Üniversitesi
Tıp Fakültesi

BEYAN



İTHAF

Mücadele etmeyi bilen kadın ve çocuklara ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Eğitim sürecimin tamamında gelişimime çok büyük katkısı olan, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman beni eğiten ve yol gösteren, ilgi ve emeğini benden eksik etmeyen, desteğini her zaman hissettiğim, çok şey öğrendiğim danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni eğiten ve üzerimde çok fazla emekleri olan Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr. ERDAL POLAT, Doç. Dr. Suat SARIBAŞ'a teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden her zaman çok şey öğrendiğim, tez sürecimde bana yardımcı olan ve her zaman desteğini gördüğüm Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e ve tez çalışmama katkıda bulunan ve bu aşamada beni destekleyen, eğiten, emek veren Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya teşekkür ederim.

Bilgisi ve deneyimi ile tez aşamamda her daim bana yardımcı olan ve çok şey öğreten MSc. Zeynep YAZGAN'a; laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Uzm. Dr. Yeşim TOK'a; çalışma sürecimde desteğini benden esirgemeyen, yardımcı olan ve dostluğunu her zaman hissettiğim arkadaşım YLÖ Neşe ARSLAN'a; sürecin tüm zorluklarını beraber göğüslediğimiz YLÖ Rüveyda AKÇİN'e ve YLÖ Nigar MİRALİZADE'ye; tecrübelerini her zaman benimle paylaşan MSc. Metin YALÇIN'a, MSc. Seçil İSKENDER'e, MSc. Ebru YÜCEBAĞ'a, Anabilim Dalımızda ve laboratuvarımızda çalışan herkese teşekkür ederim.

Uzun ve zorlu bir süreç olacağını başından beri bildiğim bu yolda her daim beni cesaretlendiren, destekleyen, inanan arkadaşım Uzm. Dyt. Duygu GÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

Sevgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bu süreçte benden fazla fedakarlık yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her daim bana güç veren canım annem Habibe KURT'a ve ablam İlke ÖZER'e; mutluluk kaynağım, çok sevdiğim canım yeğenlerim Beril ÖZER ve Sare ÖZER'e ve tüm aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-36179



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Genel Özellikleri	4
2.3. Epidemiyoloji.....	6
2.4. Virülans Faktörleri	6
2.5. Klinik Tablolar.....	7
2.6. Laboratuvar Tanısı	7
2.7. Duyarlılık Testleri.....	10
2.8. Tedavide Kullanılan Azol Grubu Antifungaller ve Etki Mekanizmaları.....	11
2.9. Azol Grubu Antifungallere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Örneklerin Hazırlanması.....	14
3.2. ERG11 ve MRR1 Genlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	14
3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	15
3.4. Saflaştırma	16
3.4.1. Pürifikasyon Aşaması	16
3.4.2. Ölçüm Aşaması.....	17
3.5. Kütüphane Oluşturma	18
3.6. Denatürasyon ve Dilüsyon	20
3.7. Cihaza yükleme.....	20

3.8. Analiz	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Duyarlılık Profilleri.....	22
4.2. ERG11 ve MRR1 Genlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	23
4.3. Dizileme	25
5. TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR	32
ETİK KURUL KARARI	42
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	43
ÖZGEÇMİŞ	44



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>C. parapsilosis</i> 'in Karbonhidratları Asimilasyon Yetenekleri (24, 26)	5
Tablo 2. <i>C. parapsilosis</i> 'in karbonhidratları fermentasyon yeteneği (24,26).....	5
Tablo 3. <i>C. parapsilosis</i> 'de flukonazol için belirlenen MİK Sınır Değerleri (49,52) ...	11
Tablo 4. ERG11 ve MRR1 için kullanılan primerler.....	14
Tablo 5. PCR karışımı	15
Tablo 6. PCR protokolü	15
Tablo 7. Elektroforez aşamasında kullanılan malzemeler	16
Tablo 8. PCR protokolü	19
Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen izolatlara ait bilgiler	22
Tablo 10. ERG11 gen bölgesinde saptanan değişimler	26
Tablo 11. MRR1 gen bölgesinde saptanan değişimler	26
Tablo 12. Mutasyonlara göre kökenler	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. SDA’da üreyen <i>C. parapsilosis</i> kolonileri	9
Şekil 2. Mısır Unlu Agar’da <i>C. parapsilosis</i> psöдохifleri.....	9
Şekil 3. Görüntüleme Cihazı.....	16
Şekil 4. DeepM Aligner, CP_ERG11_MRR1 kaynak kodu.....	21
Şekil 5. Elektroforez görüntüleri	25
Şekil 6. ERG11’de gerçekleşen Y132F mutasyonları (BioEdit 7.2.5)	26



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μL: Mikrolitre

ABC: ATP Bağlayıcı Kaset

AFLP: Amplifiye fragman uzunluğu polimorfizmi

ATM: Amplicon Tagment Mix

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

EtOH: Etanol

EUCAST: Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği

FLU-I: Flukonazol doza bağımlı duyarlı

FLU-R: Flukonazol dirençli

FLU-S: Flukonazol duyarlı

gr: Gram

HT Buffer: Hybridization Buffer

I: Doza bağımlı duyarlı

ITS: Internal transcribed spacer

İCE: İnvaziv Candida enfeksiyonu

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

mL: Mililitre

Mb: Megabaz

NAC: albicans dışındaki Candida türleri

NFW: Nuclease Free Water (NFW- DNaz ve RNaz içermeyen su)

nM: Nanomolar

NPM: Nextera PCR Master Mix

NT: Neutralize Tagment Buffer

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

pM: Pikomolar

pMol: Pikomol

PNA-FISH: Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization

R: Dirençli

RAPD: Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi

RFLP: Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/ Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi

RSB: Resuspension Buffer

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

S: Duyarlı

SAP: Sekrete edilen aspartil amilaz

SDA: Sabouraud dekstroza agar

TD: Tagment DNA Buffer

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

ÖZET

Kurt, Ö. (2022). *Candida parapsilosis* Kökenlerinde Antifungal Direncin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Dünya'nın birçok yerinde flukonazol dirençli (FLU-R) *Candida parapsilosis* kökenlerinin sayısı artmaktadır. Ancak, dirence sebep olan mekanizmalar henüz netlik kazanmamıştır. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2018-2019 yıllarında kan kültüründen üretilen, identifikasyonları MALDI-TOF MS ve DNA dizi analizi ile yapılmış ve duyarlılıkları E-TEST ile saptanmış *C. parapsilosis* kökenlerinde flukonazol direncinin moleküler yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır. 17 FLU-R, 12 duyarlı, bir doza bağımlı duyarlı olmak üzere 30 kökene ait ERG11 ve MRR1 genleri Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi ile dizilendi. Dirençli kökenlerin 11 (%67,7)'inde ve bir doza bağımlı duyarlı izolatta gösterilen Y132F mutasyonu en sık saptanan mutasyondur. Y132F mutasyonu ile birlikte ERG11'de G307A (%52,9), Y132F+G307A (%47), K143R (%35,29), Y132F+K143R (%17,64), R398I (%5,8) mutasyonları tespit edildi. Duyarlı kökenlerin hiçbirinde Y132F tespit edilmedi. MRR1'de ise bir doza bağımlı duyarlıda R405K, dört dirençli kökende G927C mutasyonu tespit edildi. Çalışmada tespit edilen tüm mutasyonlar daha önce literatürde tanımlanmıştır ancak azol direnci ile ilişkileri henüz netlik kazanmamıştır. ERG11'in Y132F mutasyonu *C. parapsilosis* izolatlarında azol direncinde baskın mekanizma olarak kabul edilebilir ancak tam olarak mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışma gereklidir.

Anahtar Kelimeler: *Candida parapsilosis*, ERG11, flukonazol, MRR1, NGS

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-36179

ABSTRACT

Kurt, O. (2022). Investigation of antifungal resistance in *Candida parapsilosis* strains by molecular methods. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Medical Microbiology. Master Thesis. Istanbul.

The number of fluconazole resistant (FLU-R) *Candida parapsilosis* strains is increasing all over the world. However, the mechanisms that cause resistance have not been clarified yet. The aim of this study was to investigate fluconazole resistance in *C. parapsilosis* strains produced from blood culture, identified by MALDI-TOF MS and DNA sequence analysis and determined whose susceptibility by E-TEST at Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Medical Faculty Hospital in 2018-2019. ERG11 and MRR1 genes of 30 strains which include 17 FLU-R, 12 susceptible and one dose dependently susceptible were sequenced by Next Generation Sequencing (NGS). Y132F mutation was the most frequently detected mutation in 11 (67.7%) of the resistant strains and one dose-dependent susceptible isolate. Along with the Y132F mutation, G307A (52.9%), Y132F+G307A (47%), K143R (35.29%), Y132F+K143R (17.6%), R398I (5.8%) mutations were detected in ERG11. Y132F was not detected in none of the susceptible strains. In MRR1, R405K mutation was detected in one dose-dependent susceptible and G927C mutation in four resistant strains. All mutations detected in the study have been previously described in the literature, but their relationship with azole resistance has not yet been clarified. Y132F mutation of ERG11 can be considered as the dominant mechanism in azole resistance in *C. parapsilosis* isolates, but more studies are needed to elucidate the exact mechanisms.

Key Words: *Candida parapsilosis*, ERG11, fluconazole, MRR1, NGS

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2021-36179

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında 1 milyardan fazla insanın mantar enfeksiyonuna sahip olduğu tahmin edilmektedir ¹. Candida türleri insanlarda yaygın olarak bulunan mantarlardan bir tanesidir; mortalite, morbidite ve artan sağlık bakım maliyetleri ile ilişkilidir¹. Kandidemi ve invaziv candida enfeksiyonlarının (İCE) sayısı dünya çapında artmaktadır. Tanımlanmış bir çok Candida türü olmasına rağmen enfeksiyonlarının büyük bir kısmı sadece 5 Candida türü (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) tarafından kaynaklanmaktadır ². Antifungal ilaçların giderek artan kullanımı ile *C. albicans* dışındaki Candida türlerinin (NAC) görülme sıklığı artmaktadır ve *C. parapsilosis* en önemli etkenler arasında gösterilmektedir ^{2,3}. Enfeksiyona neden olan baskın tür ise coğrafyaya, hasta popülasyonuna ve antifungal direnç durumuna göre değişkenlik gösterir. *C. parapsilosis* şu anda İCE’de en sık izole edilen Candida türlerinden biridir ⁴.

C. parapsilosis kriptik bir tür olarak tanımlanır ve *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* ile birlikte *C. parapsilosis* kompleks’i oluşturur. Kompleks üyeleri fenotipik olarak ayırt edilemezler ancak epidemiyolojik özellikleri, antifungal duyarlılıkları ve virülans faktörleri birbirinden farklıdır ⁵. Klinik örneklerden en sık izole edilen *C. parapsilosis*’dir ⁶. Elde ve deride kolonize olabilmesi ile sağlık çalışanları aracılığı ile bulaşabilir ⁶. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ve yenidoğan ünitelerinde sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olur ⁷.

Azoller İCE’de birinci basamak tedavi olarak önerilen antifungallerdendir ⁸. Özellikle kolay ulaşılabilir ve tedavideki etkinliğinin iyi olması sebebi ile flukonazol sıklıkla tercih edilir. Son zamanlarda FLU-R *C. parapsilosis* kökenleri ile gerçekleşen YBÜ salgınlarının sayısı artmıştır. Bu sebeple, *C. parapsilosis*’in tür bazındaki duyarlılık profilleri ve antifungallere karşı geliştirdikleri veya geliştirebilecekleri direnç mekanizmalarının araştırılması gerekir. Candida’larda azol direnci genellikle 14- α -demetilaz enzimini kodlayan ERG11 genindeki bazı değişikliklere, artmış efluks etkisine sahip pompaları kodlayan CDR1, CDR2 ve MDR1’deki değişikliklere veya transkripsiyon faktörlerinden TAC1 ve MRR1’de gerçekleşen değişikliklerle ilişkilendirilmektedir ⁹. *C. parapsilosis*’de gelişen azol direncinde de sıklıkla bu gen bölgeleri çalışılmaktadır.

Mantar enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılabilecek ajanların kısıtlı olması antimikrobiyal bir direnç söz konusu olduğunda oldukça endişe vericidir. *C. parapsilosis*'de giderek artan flukonazol direncini ve mekanizmalarını daha iyi anlamak gelecek için uygun tedavi protokollerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Bu sebeple; bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2018-2019 yıllarında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan örneklerinden izole edilmiş ve Tıbbi Mikoloji Laboratuvarı'nda *C. parapsilosis* olarak tanımlanmış örneklerde, sıklıkla azol direnci ile ilişkilendirilen ERG11 ve MRR1 genlerinin moleküler yöntemler ile çalışılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Candida spp. çok eski zamanlardan beri bilinen mikroorganizmalardır. Modern tıpta ise bu konuda yapılan ilk çalışmalar 1800'lü yıllara dayanmaktadır ¹⁰. Geçmişte isimlendirmede standart olmadığı için o dönemlerde *Candida* türleri birçok farklı isimle adlandırılmış ve neredeyse 20. yüzyılın ilk yarı yılına kadar *Candida* türlerinin çoğu ‘‘*Monilia*’’ tanımlanmıştır ¹¹.

C. parapsilosis ilk kez 1928’de Porto Riko’da ishalleri bir hastanın dışkılarından izole edilmiş ve maltozu fermente edemeyen bir ‘‘*Monilia*’’ türü olarak tanımlanmıştır ¹². O zamanlar ‘‘*Monilia psilosis*’’ olarak da bilinen *C. albicans*’dan ayırt edilebilmesi için ‘‘*Monilia parapsilosis*’’ olarak isimlendirilmiştir ^{12,13}. *C. parapsilosis* terimi ise literatürde ilk kez 1932 yılında ‘‘Langeron ve Talis’’ tarafından kullanılmıştır ¹⁴. 1940’da intravenöz ilaç kullanımı olan bir hastada endokardit etkeni olarak saptandıktan sonra klinik önemi artmaya başlamıştır ¹⁵.

1980’lerden sonra *C. parapsilosis*’in etken olarak gösterildiği nozokomiyal enfeksiyonların sayısında artışlar görülmeye başlanmıştır. Bu tip salgınların etkenini daha iyi anlayabilmek için bu konuda yapılan genetik çalışmaların sayısı artmaya başlamıştır. Erken aşamada yapılan bir araştırmada; *C. parapsilosis*’in özellikle heterojen olduğu öne sürülmüş ve *C. parapsilosis* klinik izolatları RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/ Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) temelinde üç gruba ayrılmıştır ¹⁶. 1995’de Lin ve ark., izoenzimatik analizler ve DNA sekanslama ile *C. parapsilosis* suşları arasındaki genetik heterojenliği onayladıktan sonra buldukları genetik farklılıkları bu suşları farklı gruplar altında toplayabilmek için yeterli bularak sırasıyla Grup 1, 2 ve 3 isimlerini önerdiler ¹⁷. 2005’de Tavanti ve ark., *C. parapsilosis* Grup 1,2 ve 3’de buldukları birkaç gendeki DNA dizi farklılıklarının bu grupların alt tür olarak tanımlanmaya devam etmesi için oldukça büyük olduğunu ifade ettiler. Çalışmalarında; gruplar arası ITS (Internal transcribed spacer) dizilerindeki benzerlik oranını %90’dan az olduğunu ve bu sebeple daha önce belirlenen alt grupların ayrı bir tür olarak belirtilmesinin daha uygun olduğunu savundular. Grup 1, 2 ve 3’ e sırasıyla *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* isimlerini önerdiler ⁵. Şu anda bu üç tür, *C. parapsilosis* tür kompleksini oluşturmaktadırlar.

2.2. *Candida parapsilosis*'in Genel Özellikleri

C. parapsilosis; mantarlar alemi içinde *Saccharomycetes* sınıfında *Ascomycota* bölümünde bulunan bir mayadır ¹¹. Mantarlar ökaryot hücre yapısına sahip mikroorganizmalardır. Kitin ve glukandan oluşan sert bir hücre duvarına sahip olmaları ve yapısında sterol bileşeni olarak kolesterol yerine ergosterol içeren hücre zarına sahip olmaları ile diğer ökaryotik hücrelerden ayrılırlar ¹⁸.

Yapılarında bulunan hücre duvarı; hücrenin büyümesi, bölünmesi, şekil ve bütünlüğünün korunması gibi birçok işleve sahiptir ¹⁹. Bu sebeple, duvar yapısında herhangi bir bozulma olması hücreyi dış çevreye duyarlı hale getirir. Hücre duvarının yapısında kitin ve glukana ek olarak, farklı mantar türleri arasında farklılık gösterebilen bazı minör bileşikler bulunur ¹⁹. *C. parapsilosis*'deki hücre duvarı yapısının *C. albicans*'a benzer olduğu düşünülmektedir ancak yapıyı oluşturan bileşenlerin oranları ve organizasyonları iki mikroorganizma arasında farklılık göstermektedir ³.

Mantar hücrelerinin membran yapısı; gliserofosfolipidler, sfingolipidler ve steroller sınıfına ait çeşitli lipidleri ve sekonder transport proteinler, ATPaz ailesi ve hücre duvar ve iskeletin sentezinde rol alan birçok proteini içerir ²⁰. Yapıda bulunan ergosterol, membran akışkanlığında ve yapı düzenlenmesinde görev alır ²¹. Biyosentezi ise çok aşamalı bir süreçtir ve lanosterolden ergosterol üretilmesi ile sonuçlanır ²². Sentez sürecinde birçok enzim görev alır ve bu enzimleri kodlayan genlerde gerçekleşen çeşitli mutasyonlar antifungal direnç ile ilişkilendirilmektedir ^{21,23}.

Mantarlar seksüel veya aseksüel üreme gerçekleştirebilir. *C. parapsilosis*'de şu ana kadar seksüel üreme gözlemlenmemiştir ve bu sebeple diploid olduğu kabul edilir ¹¹. Yaklaşık olarak 12.6-13.3 Mb boyutunda bir genoma sahiptir ve 5700-6300 gen kodlar ¹⁴.

Hücre morfolojisi olarak oval, yuvarlak veya silindirik yapıda olabilir ¹³. Kolonileri kremi, parlak ve bazen dantelimsi görünümündedir ²⁴. Gerçek bir hif yapısı oluşturmaz ancak karakteristik olarak büyük (giant cells), kavisli psödohif (yalancı hif) yapıları oluşturur ^{24,25}. Bu psödohifler; septasyon bölgesinde birbirine bağlı çoğunlukla elipsoid şekilli hücrelerden oluşur ve Mısır Unlu Agar'a ekim sonrası ışık mikroskopunda gözlemlenebilirler ^{13,14}. *Candida* türlerinde psödohif yapıları farklılık gösterir ve bu fenotipik farklılık tanımlamada kullanılan fenotipik bir özelliktir.

Tanımlamada kullanılabilen diğer bir özellik ise biyokimyasal özellikleridir. *C. parapsilosis*; glikoz, laktoz ve maltoz gibi birçok karbonhidratı asimile edebilir. Bunun yanı sıra, glikozu fermente edebilirken diğer karbonhidratları fermente edebilme yeteneği yoktur^{24,26}. Çeşitli karbonhidratlara karşı asimilasyon ve fermentasyon yetenekleri Tablo 1 ve Tablo 2’de gösterilmiştir. Üreaz ve fenoloksidaz negatif olması, %0,1 Sikloheksimid varlığında üreyememesi gibi özellikleri de identifikasyona yardımcı olan diğer fenotipik özellikleri arasındadır.

Tablo 1. *C. parapsilosis*’in Karbonhidratları Asimilasyon Yetenekleri (24, 26)

Glukoz	+	Eritritol	-
Maltoz	+	Ribitol	+,y
Sukroz	+	Galaktitol	-
Laktoz	-	D-Mannitol	+
D-Glukonat	+,y	D-Glucitol	+
DL-Laktat	-	Sorboz	+,y
2-K-D-Glukonat	+	Melezitoz	+
D-Glukuronat	-	L-Arabinoz	+
Galaktoz	+	D-Arabinoz	-
Melibiyoz	-	D-Riboz	d
Sellobiyoz	-	L-Ramnoz	-
N-A-D-Glukozamin	+	Çözünebilen nişasta	-
α-M-D-Glukozid	+	Raffinoz	-
Inositol	-	Trehaloz	+
D-Ksiloz	+	D-Glukozamin	d
Dulcitol	-	Gliserol	+

+: Pozitif, -: Negatif, d: Değişken, y:Yavaş

Tablo 2. *C. parapsilosis*’in karbonhidratları fermentasyon yeteneği (24,26)

Glikoz	+
Maltoz	-
Sukroz	-
Laktoz	-
Galaktoz	-
Trehaloz	-

+: Pozitif, -: Negatif

2.3. Epidemiyoloji

C. parapsilosis; insan gastrointestinal sisteminin doğal bir üyesidir ²⁷. Cilt ve tırnaklardan, kataterler ve tıbbi cihazlar üzerinden ve bazı çevresel kaynaklardan (toprak, böcek, tatlı ve tuzlu su) izole edilebilir ^{3,28,29}. Horizontal bulaşma özelliği sayesinde kontamine tıbbi ekipmanlar ve sağlık çalışanları aracılığı ile hastalar arasında kolaylıkla yayılabilir ⁶.

Santral venöz kateter, parenteral nütrisyon ve kalıcı üriner kateter kullanımı İÇE gelişmesini sağlayan risk faktörleridir. Bu sebeple; yenidoğanlar, transplant alıcıları, onkoloji hastaları ve parenteral beslenen hastalar arasında oldukça yaygındır ⁹. Ana enerji kaynağı olarak lipidleri kullanması ve yüksek glikoz ve lipid varlığında biyofilm oluşturması gibi özellikleri sayesinde özellikle parenteral nütrisyon desteği alan hastalarda sıklıkla etken olarak saptanır ^{30,31}.

C. parapsilosis kompleks'e ait 3 türün insidansları, virülans faktörleri ve duyarlılıklar birbirinden farklıdır ve coğrafyaya göre farklılık gösterir ⁵. Kompleksin üyeleri içinde, klinik izolatlardan en sık izole edilen tür *C. parapsilosis*'dir ve sıklıkla kandan izole edilir. *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'in klinik önemi henüz tam olarak anlaşılamamıştır ³². Doğru epidemiyolojik veriler elde edebilmek için kompleksin üyeleri arasında ayırım yapabilmek oldukça önemlidir.

2.4. Virülans Faktörleri

C. parapsilosis'in patogeneze katkıda bulunan; hidrolitik enzimler, adezin ve biyofilm oluşturması gibi virülans faktörleri vardır ³³.

Enfeksiyonun başlayabilmesi için mikrobiyal yapışmanın gerçekleşmesi ön koşuldur ³⁴. *C. parapsilosis* adezyon yeteneği sayesinde kataterler, tıbbi cihazlar ve konak epitel hücrelerinde kolonize olabilir ³.

Tutunma aşaması biyofilm oluşumu açısından bir ön aşamadır. Biyofilm oluşturabilme yeteneği sayesinde mikroorganizmalar antimikrobiyal tedaviye karşı daha dirençli hale gelir ve böylelikle kalıcı enfeksiyonların varlığı güçlenir ³⁵. *C. albicans* biyofilmlerine benzer direnç mekanizmaları *C. parapsilosis* biyofilmlerinde de gözlemlenmiştir ³⁶.

Konağın savunma mekanizmasından kaçmasını sağlayan bir başka özelliği ise morfolojik yapısıdır. *C. parapsilosis*'in oluşturduğu psödohif yapıları makrofajlar tarafından öldürülmeye karşı dirençlidir³.

Patogeneze etki eden hidrolitik enzimler arasında; sekrete edilen aspartil amilazlar (SAP), lipazlar ve fosfolipazlar bulunur. Bu enzimlerin varlığı sayesinde etken konak bariyerini bozabilir; hücreye tutunmayı, biyofilm oluşturmayı ve hücre içinde hayatta kalmayı sağlayabilir³.

2.5. Klinik Tablolar

Candida'lar vücutta farklı bölgelerde enfeksiyon oluşturabilir ve bu enfeksiyonlar; oral kandidiyaz, mukozal kandidiyaz, kutanöz kandidiyaz ve sistemik kandidiyaz olarak adlandırılabilir. *Candida* spp. öncelikli olarak insanda mukozal yüzeysel enfeksiyonlara neden olsa da kan dolaşımı enfeksiyonları ve derin doku enfeksiyonları gibi invaziv kandidiyazis ile sonuçlanabilir^{37,38}.

C. parapsilosis yaklaşık %50'lik bir ölüm oranıyla, fungal endokarditin ikinci en yaygın nedenidir¹¹. Menenjit, peritonit, artritis, oküler enfeksiyonlar, otomikoz, onikomikoz, vulvovajinit ve idrar yolu enfeksiyonlarında etken olarak saptanabilse de menenjit, artritis, oküler ve idrar yolu enfeksiyonu nadiren görülür^{11,13}.

2.6. Laboratuvar Tanısı

Tıbbi Mikoloji Laboratuvarları'nda; enfeksiyon etkeni olan mantar tanımlamasını yapabilecek uzman sayısı ve kullanılacak testlerin kısıtlı olması, mevcut bazı testlerde duyarlılık ve özgüllük sorunlarının yaşanması gibi problemler sebebiyle etken tanımlamalarında zorluklar yaşanır^{1,39}. Tanıya kadar geçen süre ölüm için en önemli risk faktörleri arasında bulunmuştur¹. Buna ek olarak, *Candida* türlerinin kendi içinde virülansları ve duyarlılıkları birbirinden farklıdır ve identifikasyonlarının doğru yapılması klinik seyir için oldukça önemlidir²⁵.

İdentifikasyonlarında; fenotipik, biyokimyasal, serolojik veya moleküler testler kullanılabilir. Laboratuvarlarda kullanılan konvansiyonel yöntemler fenotipik ve biyokimyasal özelliklerin değerlendirilmesini baz alır. Bu kapsamda, tanıda direkt mikroskopik, kültür, morfolojik değerlendirme ve karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri sıklıkla kullanılır. Kullanılan testlerin çoğu yalnız başına istenen

verimi sağlamamaktadır . Bu sebeple, tanıda optimum verime ulaşabilmek için birkaç tanı testinin bir arada uygulanması gerekebilir ⁴⁰.

Enfeksiyon yüzeysel, doku veya steril bir bölgede veya vajinal bir enfeksiyonsa; kültür, direkt mikroskopik ve histopatolojik inceleme kullanılan temel yöntemlerdir ⁴¹. İCE’de ve kandidemilerde ise temel tanı yöntemi olarak kan kültürü kullanılır ⁴². Kan kültürü için; BacT/Alert, BACTEC, Versa-TREK gibi otomatize sistemler kullanılır ²⁴. Sistemlerin etkeni saptama süreleri 72 saati bulabilir. Sürenin uzun olması ve bazı duyarlılık sorunlarının olması gibi dezavantajları vardır. Klinik örneklerden Candida izolasyonunu sağlayabilmek için sıklıkla kullanılan besiyerleri; Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA), Yeast Potato Dextrose (YPD) Agar, CHROMagar, Mısır unu-Tween 80 Agar’dır ⁴³. CHROMagar, kromojenik içeriğinden dolayı oluşan renk farklılığı ile tür bazında tanımlamayı hızlandırır.

İCE’lerin teşhisinde kültürden bağımsız olarak yapılabilen mannan-antimannan, β -D-glukan ve T2 Candida manyetik rezonans testleri kullanılabilen serolojik testlerdir ⁴⁴. Mannan ve antimannan antikorlarının kombinasyon halinde tespiti Candida’lar için spesifik olmasına rağmen β -D-glukan testi Candida’lara özgü değildir ⁴².

Candida’ların tanısında PCR tabanlı ve PCR tabanlı olmayan testler kullanılabilir. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu), RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), AFLP (Amplifiye fragman uzunluğu polimorfizmi), RFLP, RAPD (Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi), Multipleks PCR Candida türlerinin teşhisi ve tanımlanması için uygun olan PCR tabanlı testlerdir ⁴⁵. Tanıda kullanılan PCR tabanlı olmayan yöntemlere ise PNA-FISH (Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) ve MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) örnek olarak verilebilir. MALDI-TOF MS Candida’ları tanımlamada konvansiyonel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve basit bir yöntem olması açısından rutin kullanıma hızlı bir şekilde girmiştir ⁴⁶. MALDI-TOF MS’nin çalışma prensibi kütle spektrometrisine dayanır. Analiz edilen deneysel spektrumlar daha önceden ölçülen referans spektrumlar ile kıyaslanır ve hızlı tanıyı mümkün kılar ⁴³.

***C. parapsilosis*'in Tür Bazında Tanımlanması**

C. parapsilosis, rutin besiyerine ekimi yapıldıktan sonra 48-72 sa içinde büyür. Kolonileri kremsi bazen dantelimsi görünüme sahiptir ²⁴ (Şekil 1). Mısır unlu Tween 80 Agar'a ekimi yapıldıktan sonra 25 C°'de 72 saatlik inkübasyon sonrası karakteristik psödohif yapıları gözlemlenebilir (Şekil 2). Psödohifler uzun, ince ve dallıdır. Tek veya küçük kümeler halinde blastosporlar psödohif boyunca görülür ²⁴.



Şekil 1. SDA'da üreyen *C. parapsilosis* kolonileri



Şekil 2. Mısır Unlu Agar'da *C. parapsilosis* psödohifleri

C. parapsilosis germ tüp ve üreaz negatiftir. Glikozu, maltozu, sukrozu, galaktozu ve ksilozu asimile edebilir ancak laktozu edemez ²⁶. Sadece glikozu fermente edebilme yeteneği vardır. Biyokimyasal özellikler manuel olarak değerlendirilebilmesinin yanısıra API 20C AUX, Fungichrom, Auxacolor, Fungifast gibi hız kazandıran ticari testler de bulunmaktadır ve rutin kullanımda sıklıkla tercih edilmektedir ⁴³.

Candida'ları konvansiyonel yöntemler ile tür bazında tanımlamak oldukça zordur ⁴⁷. Buna ek olarak; *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* fenotipik yöntemlerle birbirinden ayırt edilemez. Bu sebeple, tür bazında tanımlama yapmak için PCR bazlı yöntemler veya MALDI-TOF MS sıklıkla tercih edilir.

2.7. Duyarlılık Testleri

Antifungal duyarlılık testleri, tedavide kullanılacak uygun antifungalın seçilmesine yardımcı olan testlerdir. Bu testler; bir mikroorganizmayı belirli bir dereceye kadar inhibe etmek için kullanılması gereken ilaç konsantrasyonunu belirlemeye yönelik yapılır ⁴⁸. Duyarlılık testleri rutinde her mantar için kullanılsa da özellikle invaziv bir enfeksiyon varlığında veya tekrarlayan/geçmeyen bir enfeksiyon varlığında sıklıkla kullanılır. Ayrıca, epidemiyolojik çalışmalarda ve yeni antifungal ajanların etkinliğini araştırmak için de kullanılır ⁴⁹. Bu testlerin standardizasyon çalışmaları CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) ve EUCAST (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği) tarafından yürütülür.

CLSI ve EUCAST'in mevcut rehberlerine göre broth dilüsyon testleri altın standarttır ⁵⁰. Belirlemiş oldukları sınır değerleri (breakpoint) ile mantarın duyarlı (S), doza bağımlı duyarlı (I) veya dirençli (R) olduğu belirlenir. Aynı zamanda belirledikleri epidemiyolojik eşik değerleri (EUCAST; ECOFF) ile mantarı vahşi tip (wild type) veya vahşi olmayan tip (non-wild type) olarak kategorize etmeyi olanak kılarlar. Fenotipik olarak saptanabilen, sonradan kazanılan veya mutasyon kaynaklı bir direnç bulundurmayan maya izolatlarını tanımlamak için vahşi tip terimi kullanılır ⁴⁹. Vahşi tip olmayan izolat ise fenotipik olarak saptanabilecek kazanılmış veya mutasyon kaynaklı direnç bulunduran izolatları tanımlamak için kullanılır ⁴⁹.

EUCAST ve CLSI sınır değerlerini tür düzeyinde belirlemişlerdir. Bu sebeple, klinik uygulamada sınır değerlerinden verim alabilmek için özellikle kriptik türlerin tanımlamasının doğru yapılması oldukça önemlidir ⁵¹. *C. parapsilosis*' e ait ECOFF ve sınır değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir ^{49,52}.

Tablo 3. *C. parapsilosis*'de flukonazol için belirlenen MİK Sınır Değerleri (49,52)

Antifungal Ajan	EUCAST				CLSI	
	ECOFF(mg/L)	MİK Değerleri(mg/L)			MİK Değerleri (mg/L)	
	WT	S≤	I	R>	S≤	R>
Flukonazol	2	2	4	4	2	4

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, WT: Vahşi tip, S: Duyarlı, I: Doza Bağımlı Duyarlı, R: Dirençli

Broth dilüsyon testleri teknik açıdan zordur ve rutin kullanım açısından uygun değildir ⁵³. Bu sebeple dilüsyon testlerine alternatif olarak; Gradyan Difüzyon Testi (E-TEST), VITEK 2, Sensititre Yeast One gibi ticari yöntemler yaygın olarak kullanılır ⁵¹. Her yöntemin güçlü ve zayıf yönleri vardır. Ancak mevcut testler arasındaki ortak problem test okuma sürelerinin uzun olmasıdır. Bu sebeple; MALDI-TOF MS gibi kütle spektrometrisi bazlı veya moleküler yöntemlere dayalı testler üzerinde çalışmalar devam etmektedir ⁵⁴. Ayrıca, son zamanlarda dirençle ilişkilendirilebilecek genlerdeki mutasyonları saptayabilmek için Yeni Nesil Dizileme (NGS) yaklaşımları da kullanılmaya başlamıştır ⁵⁵. NGS aynı zamanda gözden kaçabilen ve dirençle ilişkilendirilebilecek yeni mutasyonları tespit edebilme potansiyeline sahiptir ⁵⁵. Her ne kadar avantajlı olsa da çok fazla veri üretmesi, maliyetli olması ve veri yorumlaması açısından uzman ihtiyacı olmasından dolayı rutin laboratuvarlara henüz girememektedir ⁵⁶.

2.8. Tedavide Kullanılan Azol Grubu Antifungaller ve Etki Mekanizmaları

Azol grubu ilaçlar 1960'ların sonunda keşfedilen tamamen sentetik yapıda ilaçlardır. Azol halkasında 2 veya 3 Nitrojen içermelerine göre imidazoller (mikonazol, ekonazol ve klotrimazol) ve triazoller (flukonazol, vorikonazol, itrokonazol) olmak üzere iki gruba ayrılırlar ^{18,57}. ERG11 geni tarafından üretilen, sitokrom P-450'ye bağımlı enzim lanosterol demetilazı (14- α sterol demetilaz veya P-450 DM) inhibe ederek etki gösterirler ^{18,58}. Enzimin inhibe edilmesi ile mantar plazma membran bileşeni olan ergosterol sentezi önlenir. Böylelikle ortamdaki ergosterol miktarı azalırken, 14- α metillenmiş sterol miktarı artar ⁵⁹. Bunun sonucunda; zar yapısında, besin taşınmasında ve kitin sentezinde bazı işlevsel bozukluklar meydana gelir ve bu sayede mantar büyümesi engellenmiş olur ^{60,61}. Azoller (özellikle flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol) invaziv mantar enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılır ⁶². İyi tolere

edilmelerine rağmen, hepatotoksisiteye sebep olmaları ve dirençli organizmaların görülmesi sebebiyle kullanımlarında sınırlamaları vardır ⁵⁷.

2.9. Azol Grubu Antifungallere Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Mantarların bir antifungale karşı geliştirdikleri direnç doğal veya sonradan kazanılmış olabilir. Doğal direnç; daha önce bir ilaca maruziyetle ilgisi olmayan, bir türe ait bütün üyelerde görülür. Kazanılmış direnç ise mantarın ilaca uzun süre maruz kalması sonucu sonradan kazanılır. Klinik müdehalenin optimum düzeyde yapılabilmesi için antifungal direncin varlığını tespit edebilmek kadar mevcut dirence sebep olan mekanizmanın da anlaşılması elzemdir ⁴⁶.

Candida türlerinde azollere karşı gelişen direnç; türler arası farklılık gösterir ve sıklıkla 3 mekanizma ile ilişkilendirilir. Bu mekanizmalardan ilki; mantar hücresinde bulunan ve hücre içindeki ilaç konsantrasyonunda azalmaya sebep olan pompaların aktive olmasıdır ^{9,63}. Şu ana kadar azol direncine sebep olan ve bu artmış efluks etkisine sebep olan iki tip membran taşıyıcı tanımlanmıştır ⁶⁴. Bunlar ATP bağlayıcı kaset taşıyıcılar (ABC) ve MFS (major facilitator superfamily) taşıyıcılarıdır ⁶⁴. ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıların CDR genleri (CDR1/CDR2) ve MFS taşıyıcılarının MDR (MDR1) genlerinin artan ekspresyonu azol direncini artırırken, genlerin silinmesi ile duyarlılığın arttığı görülmüştür ^{64,65}. Gösterilen ikinci mekanizma; azol grubu ilaçların hedef aldığı enzimi kodlayan ERG11 geninde herhangi bir değişim veya ekspresyon seviyelerinde artış olmasıdır ⁹. Bu sayede enzimin bağlanma bölgesinde değişiklik olur ve ilaç afinitesi azalır. Son mekanizma ise; mantar hücresinin bazı mutasyonları sonucu dirence sebep olabilecek yan yolların gelişmiş olmasıdır ⁹. Buna örnek olarak ERG3 geni verilebilir. ERG3p bir C5 sterol desatüراز enzimidir ve ergosterol biyosentezinde rol oynar ⁶⁴. Azole maruziyet sonucu ergosterol üretimi azalır ve bu da ortamda toksik etki gösteren 14- α -metil-3,6-diolün artması ile sonuçlanır. ERG3 geninde gerçekleşen bazı mutasyonlar aracılığı ile 14- α -metilfekosterolden 14- α -metil-3,6-diolün oluşması engellenir. Bu sayede azollerin zar bozucu özelliği ortadan kalkar ⁶³.

Yukarıda bahsedilen ERG11, MDR1 ve ABC genlerin ekspresyon seviyelerindeki artış aslında UPC2, MRR1 ve TAC1 gibi çinko parmak transkripsiyon faktörlerini (Zn2-Cys6) kodlayan genlerin işlev kazanımı ile gerçekleşir ⁶⁶. CDR1/CDR2 ve MDR1 sırasıyla TAC1p ve MRR1p transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir ⁶⁴. TAC1 ve

MRR1’ de fonksiyon kazanımı sağlayan mutasyonlar azol direncinin artması ile sonuçlanır ⁶⁴.

C. albicans’ ta azol direnci kapsamlı bir şekilde çalışıldığı için *C. parapsilosis*’de oluşan antifungal direnç mekanizmalarını aydınlatabilmek adına çalışmalara ortolog genlerin araştırılması ile başlanmıştır ⁶⁷. *C. parapsilosis*’de karşılaşılan azol direncinin odak noktası ERG11 ve MRR1 transkripsiyon faktörü genindeki mutasyonlar ve CDR1, MDR1 genlerinin aşırı ekspresyonudur ⁶⁸.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, 2018-2019 yılları arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı- Tıbbi Mikoloji Laboratuvarı'nda *C. parapsilosis* olarak tanımlanmış, duyarlılıkları E-TEST ile çalışılmış, stok halde bulunan 32 örnek çalışmaya dahil edildi. İzolatların hepsi kan kültüründen izole edilmişlerdi. İzolatların tanımlanması merkezimizde SDA ve kromojenik agara değerlendirmeleri ve Mısır unlu Tween 80 Agar'daki morfolojik yapıları incelenerek yapılmakta ve öncelikle *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanmaktadır. Ön tanımlaması yapılan kökenler doğrulama amaçlı MALDI-TOF MS (Bruker, Almanya) aracılığıyla analiz edilmekte ve genotipik karakterizasyonu ITS1-2 bölgelerinin analizi yapıldıktan sonra arşivlenmektedir. Çalışmaya dahil edilen izolatların hepsi *C. parapsilosis* olarak tanımlanmıştır. Kompleksin diğer iki üyesi *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* çalışmada yer almamıştır. Aynı hastadan sadece bir örnek çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya kadar -80 °C'de saklanan kökenler uygun prosedüre göre çözdürüldü ve SDA'ya (biolab, Macaristan) pasajlandı. Pasajlanan kökenler; 37 °C'de 48-72 saat inkübasyon ile yeniden canlandırıldı. *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart olarak kullanıldı.

3.2. ERG11 ve MRR1 Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

ERG11 ve MRR1 gen bölgeleri Tablo 4'de gösterilen primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı^{69,70}. PCR karışımı hazırlanmadan önce primerler nükleaz içermeyen su (NFW; Wisent, Inc., Kanada) ile çözdürülerek 100 pMol stok çözeltileri içeren stoklar hazırlanarak kullanılmıştır.

Tablo 4. ERG11 ve MRR1 için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Hedef	Bağlanma Sıcaklığı	Baz Sayısı
CPERG11F1	CTTAGTAGTGGGATCGGTGGA	ERG11	60 °C	21
CPERG11R4	CATTCTGCATTAAACCCCATTTGA	ERG11	57 °C	23
MRR1-Fext	CTGTATGGAGAGTGAGAT	MRR1	51 °C	18
MRR1-Rext	GTTACAGGTGTATAGTGG	MRR1	51 °C	18

Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için koloni PCR yöntemi kullanıldı. SDA'da saf bir şekilde elde edilen *C. parapsilosis* kolonileri ile 200 µL NFW (Wisent, Inc., Kanada) kullanılarak 1 McFarland yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. Her bir süspansiyondan 2 µL, PCR için hedef olarak kullanıldı ve PCR işlemi koloni PCR şeklinde gerçekleştirildi. Tablo 5'de gösterilen miktarlarda, son hacmi 20 µL olan PCR karışımı hazırlandı. Hazırlanan örnekler Tablo 6'da gösterilen PCR protokolüne göre BioRad CFX96 (BioRad, Almanya) ile çoğaltıldı.

Tablo 5. PCR karışımı

Bileşenler	Miktar
Distile Su	6.8 µL
Master Mix (BioRad, Almanya)	10 µL
F Primer (25 pMol)	0.4 µL
R Primer (25 pMol)	0.4 µL
Eva Green	0.4 µL
Hedef	2 µL
Toplam Hacim	20 µL

Tablo 6. PCR protokolü

Döngü	Aşama	Sıcaklık	Süre
	Taq Polimeraz Aktivasyonu	98 °C	3 dk
39 Döngü	Denatürasyon	95 °C	30 sn
	Bağlanma	52 °C	30 sn
	Uzama	72 °C	2 dk

3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezinde yürütme işlemi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 7'de verilmiştir. Agar (Sigma- Aldrich, ABD)+ TBE Buffer+ SYBR Green (BioRad, ABD) ile hazırlanan agar tanka döküldü. Agar soğuduktan sonra PCR ürünleri bir miktar DNA Loading (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Yürütme işlemi 90-100 Volt elektrik yükünde 20 dk gerçekleştirildi.

Tablo 7. Elektroforez aşamasında kullanılan malzemeler

Malzemeler	Miktar
Agar	0,8 gr
TBE Buffer	90 mL
SYBR Green	20 µL
DNA Loading	Bir miktar
DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD)	5 µL
PCR ürünü	5 µL

Görüntüleme işlemi için Şekil 3’de gösterilen BIO-RAD Gel Doc XR+ (BioRad, ABD) kullanılmıştır.

**Şekil 3. Görüntüleme Cihazı**

Görüntüleme işleminden sonra, ERG11 için 1569 bp ve MRR1 için 3312 bp bant oluşturan örnekler pozitif olarak not edilerek dizilemeye alındı. Tek gen bölgesi çoğalmayan (ERG11 ya da MRR1) iki örnek dizileme işlemine alınmamıştır.

3.4. Saflaştırma

3.4.1. Pürifikasyon Aşaması

İşlem öncesi BEAD (Kapa Pure Beads, Roche, Güney Afrika), oda ısısına getirildi. %80’lik EtOH hazırlandı ve kullanım aşamasına kadar -20 °C’de bekletildi.

- Ependorflar isimlendirildikten sonra, her birinin içine 30 µL NFW +20 µL PCR ürünü +30 µL BEAD sırasıyla eklendi (pipetaj yapıldı) ve oda ısısında 8 dk bekletildi.
- Ependorflar manyetik tablaya alındı ve 2 dk bekletildi.

- Süre sonunda BEAD haricindeki sıvı atıldı ve 200 μ L EtOH (%80) eklendi (30 sn bekledikten sonra alkol atıldı ve bu işlem tekrarlandı).
- En son eklenen alkol atıldıktan sonra 3 dk kurumaya bırakıldı.
- Ependorf içindeki BEAD, 40 μ L NFW ile çözdürüldü.
- Bütün tüplere pipetaj yapıldıktan sonra 2 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Tüpler manyetik tabla üzerinde 2 dk bekletildi.
- Her bir örnekten 36 μ L başka bir ependorfa ölçüm için aktarıldı.

3.4.2. Ölçüm Aşaması

Birim hacme düşen DNA miktarını ölçmek amacıyla Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

Hazırlık aşaması;

- Her örnek için 199 μ L, standartlar (Standart 1 ve Standart 2) için ise 190 μ L Buffer (Biotium, ABD) hazırlandı. n=örnek sayısı olmak üzere;
-Pipet kaybı düşünülerek (n+1) hesaplandı.

$[(199 \times (n+1)) + (190 \times 2)] \mu\text{L Buffer} + [((n+1)+2) \times 1] \mu\text{L SYBR Aqua Green}$ ile karışım hazırlandı.

- Karışım kısa bir vortekse tabi tutuldu.
- Her örnek için mikrosantrifüj tüpü (500 μ L) etiketlendi. Standartlar, Standart 1 ve Standart 2 olmak üzere etiketlendi.
- Hazırlanan karışımından her örnek için 198 μ L, her standart için 190 μ L olmak üzere etiketlenen tüplere aktarıldı.
- Standart 1 için etiketlenen tüpe 190 μ L Buffer + 10 μ L standart eklendi (Aynısı Standart 2 için de yapıldı).
- Örnekler için etiketlenen her tüpe 198 μ L Buffer dağıtıldı. Örneklerden 2 μ L alınarak kendi etiketine sahip olan tüplere aktarıldı.
- İşlem sonrası, tüpler karanlık ortamda 2 dk bekletildi.

Ölçüm aşaması;

- İlk önce standartların ölçümü yapıldı ve ölçüm sonuçları kaydedildi.
- Daha sonra örnekler ölçümü yapıldı ve ölçüm sonuçları kaydedildi.

Ölçüm sonrası; kütüphane aşamasına hazırlık için, her örnek Excel Dilüe Programı kullanılarak 2 ng/mL'ye ayarlandı. Ölçüm sonuçlarına göre eşit ng'ye dilüe edilen örnekler her gen bölgesinden eşit miktarda alınarak birleştirilmiştir.

3.5. Kütüphane Oluşturma

Kütüphane aşaması için Nextera XT Library Prep Kit (96 Samples) ve Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes- 19 samples) (Illumina, ABD) kullanıldı.

- Sırasıyla 5 μ L TD (Tagment DNA Buffer) ve 2.5 μ L 2 ng/ml'ye dilüe edilmiş örnekler plate kuyucuklarına eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 5 μ L ATM (Amplicon Tagment Mix) her kuyucuğa eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Kuyucuklara multichannel ile yüksek volüm pipetaj yapıldı.
- Kısa bir santrifüj yapıldı. Önceden 55 °C hazır bekletilen Thermal Cycler'da (BioRad, ABD) 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Cihazdan alındıktan sonra her kuyucuğa 2,5 μ L NT (Neutralize Tagment Buffer) eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Kısa bir santrifüj sonrası oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda soğuk bloğa geçildi.
- Protokole uygun bir şekilde indeksler (2,5 μ L) kuyucuklara dağıtıldı.
- İndeks eklenen kuyucuklara 7,5 μ L NPM (Nextera PCR Master Mix) eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Kısa bir santrifüj ardından Tablo 8'de gösterilen protokole göre Thermal Cycler'a (BioRad, ABD) yüklendi.

Tablo 8. PCR protokolü

Döngü	Sıcaklık	Süre
	72 °C	3 dk
	95 °C	30 sn
12 Döngü	95 °C	10 sn
	55 °C	30 sn
	72 °C	30 sn
	72 °C	5 dk
	10 °C	

Pürifikasyon Aşaması;

- %80'lik EtOH hazırlandı.
- Cihazdan alınan PCR ürünlerine üzerine bir kuyucuğa 15 µL BEAD eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Plate manyetik tabla üzerine alındı ve 2 dk bekletildi.
- Supernatantlar uzaklaştırıldı.
- Herbir kuyucuğa %80'lik EtOH eklendi ve manyetik tablada 30 sn bekletildi. Ardından alkol uzaklaştırıldı. (Alkolle yıkama işlemi iki kez yapıldı).
- Oda ısısında 3 dk kurumaya bırakıldı. Bu aşamada 10 µL pipet ile alkol kalıntıları iyice uzaklaştırıldı.
- Süre sonunda plate manyetik tabla üzerinden alındı ve her bir kuyucuğa 26,25 µL RSB (Resuspension Buffer) eklendi. Eklenen RSB ile çeperdeki BEAD çözdürüldü.
- Tekrar manyetik tabla üzerine yerleştirildi 2 dk bekletildi.
- Her kuyudan 24 µL supernatant çekildi yeni bir tüpe aktarıldı.

Ölçüm aşaması için Qubit 3 Fluorometer (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. 3.4.2.'de anlatılan ölçüm protokolüne göre gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçları kaydedildi. Sonuçlar Nextera Dilüe Programı kullanılarak 10 nM'e getirildi.

3.6. Denatürasyon ve Dilüsyon

Hazırlanan bütün örnekler bir tüp içerisinde megapool oluşturacak şekilde eşit miktarlarda (4 μ L) alınarak birleştirildi.

- 10 nM'lık megapoolu 1 nM'a düşürebilmek için; 10 μ L megapool, 90 μ L su içine eklendi ve mini vorteks yapıldı.
- 1,5 ml'lik ependorfa önce 450 μ L su, üzerine 1 N stok NaOH'dan 50 μ L ilave edilerek 0,1 N NaOH elde edildi.
- Hazırlanan 1 nM'lık megapooldan 5 μ L alınıp yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine hazırlanan 0,1 N NaOH' den 5 μ L eklendi (mini vorteks ve spin). Oda ısısında 5 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 5 μ L Tris-HCl eklenerek ortam nötrlendi.
- Ardından 15 μ L'lik karışıma 985 μ L HT Buffer (Hybridization Buffer) eklendi ve ardından 10-12 kez alt üst edilip, mini vorteks yapıldı. Böylelikle 5 pM'lık megapool elde edildi.
- Yeni bir tüpe 380 μ L HT Buffer eklendi ve üzerine bir önceki aşamada hazırlanan 5 pM'lık megapooldan 120 μ L ilave edildi.
- Mini spin yapıldı. İşlem sonunda 1,2 pM'lık megapool elde edildi.
- Hazırlanan 1,2 pM'lık megapool soğuk bloğa alındı ve 20 μ L'si çekilip atıldı. Atılan 20 μ L yerine, 20 μ L Phix control eklendi. Mini spin yapıldı.

3.7. Cihaza yükleme

- Cihaza yüklenecek olan Miniseq Mid Output Reagent (Illumina, ABD) oda ısısında çözdürüldü.
- Hazırlanan 500 μ L'lik 1,2 pM'lık megapool reagentta bulunan yükleme bölmesine aktarıldı.
- Reagent ve Miniseq Mid Output- Flow Cell (Illumina, ABD) cihaza yerleştirildi. Dizileme için Miniseq Sequencing Systems (Illumina, ABD) kullanıldı.

3.8. Analiz

Cihazdan elde edilen ham okuma verilerinin analizi için (*.fastq dosyalarının) Linux ortamında (Ubuntu 20.04.2) çalışma iş akışına yönelik program Perl dili kullanılarak bu tez çalışması için özel olarak yazıldı (DeepM Aligner, CP_ERG11_MRR1, Şekil 4) . Hazırlanan programda ham veri dosyalarındaki dizilerin hizalanması için ERG11 geni için KY967266 dizisi ve MRR1 geni için MT019524 dizisi referans olarak alındı. Bu diziler hazırlanan yazılım içinde kullanılan Burrows-Wheeler Aligner (bwa) paketi ile indekslendi. Hazırlanan indeks dosyaların ve ham okuma verilerinin hizalanması yine bwa paketinin maksimum kesin eşleşmeler (maximal exact matches, MEM) parametresi kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan hizalama dosyasının sıralama işlemi samtools paketi “sort” parametresi ile gerçekleştirildikten sonra elde edilen sıralanmış ve hizalanmış dosyadan ortak dizinin (consensus sequence) oluşturulması i-Var paketi ile kalite düzeyi Q=20 ve varyant düzeyi %20 olacak biçimde gerçekleştirildi. Her örnek için elde edilen ortak dizi*.fasta uzantısı ile kaydedildikten sonra örneklere ait dizilerin birleştirilmesi ve toplu hizalaması BioEdit 7.2.5 yazılımı ile gerçekleştirildi. Yine elde edilen DNA dizilerinin protein transkripsiyon işlemleri BioEdit 7.2.5 yazılımı ile gerçekleştirildi.

```

11 print "Lütfen örnek numarasını giriniz: ";
12 my $sample = <STDIN>;
13 chomp($sample);
14
15 my $directory = "/home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample";
16 unless (-d $directory) {
17     die "Bilinmeyen örnek numarası ($sample) mevcut, Lütfen kontrol edip tekrar deneyiniz!";
18 }
19
20 print "Lütfen ilk dosyayı sürükleyin: ";
21 my $read1 = <STDIN>;
22 chomp($read1);
23
24 print "Lütfen ikinci dosyayı sürükleyin: ";
25 my $read2 = <STDIN>;
26 chomp($read2);
27
28 #BWA 1. Adım : bwa ile index oluşturma, Tek sefer yeter
29 my $cdindexbwa = "/home/nk/miniconda3/bin/bwa index -p /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/KY967266 -a is /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/KY967266.fasta";
30 system($cdindexbwa);
31
32 my $cdindexbwa2 = "/home/nk/miniconda3/bin/bwa index -p /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/MT019524 -a is /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/MT019524.fasta";
33 system($cdindexbwa2);
34
35 #BWA 2. Adım : bwa mem ile alignment oluşturma
36 my $cdalignbwa = "/home/nk/miniconda3/bin/bwa mem /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/KY967266 $read1 $read2 > /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.ERG11.sam";
37 system($cdalignbwa);
38
39 #BWA 2. Adım : bwa mem ile alignment oluşturma
40 my $cdalignbwa2 = "/home/nk/miniconda3/bin/bwa mem /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Ref/MT019524 $read1 $read2 > /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.MRR1.sam";
41 system($cdalignbwa2);
42
43 #3. Adım: samtools ile .bam dosyası oluşturma
44
45 my $cdsamtoolsbwa = "samtools view -bS /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.ERG11.sam > /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.ERG11.bam";
46 system($cdsamtoolsbwa);
47
48 my $cdsamtoolsbwa2 = "samtools view -bS /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.MRR1.sam > /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.MRR1.bam";
49 system($cdsamtoolsbwa2);
50
51
52
53 my $cdsamtoolsbwa3 = "samtools sort /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.ERG11.bam -o /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.sorted-ERG11.bam";
54 system($cdsamtoolsbwa3);
55
56 my $cdsamtoolsbwa4 = "samtools sort /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.MRR1.bam -o /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.sorted-MRR1.bam";
57 system($cdsamtoolsbwa4);
58
59 my $cdsamtoolsbwa5 = "samtools index -b /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.sorted-ERG11.bam /home/nk/MyBioinf/ERG11/$sample.$sample.sorted-ERG11.bai";
60

```

Status: 15:25:28: This is Geany 1.36.
 15:25:28: File /home/nk/miniconda3/bin/test.py opened (1).
 15:25:28: File /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Codes/YMD_Aligner.pl opened (2).
 15:25:28: File /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Codes/txttohtml.pl opened (3).
 15:25:28: File /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Codes/html.pl opened (4).
 15:25:28: File /home/nk/MyBioinf/RefandCode/Codes/ERG11_Aligner_V1.pl opened (5).
 This is Geany 1.36.

Şekil 4. DeepM Aligner, CP_ERG11_MRR1 kaynak kodu

4. BULGULAR

4.1. Duyarlılık Profilleri

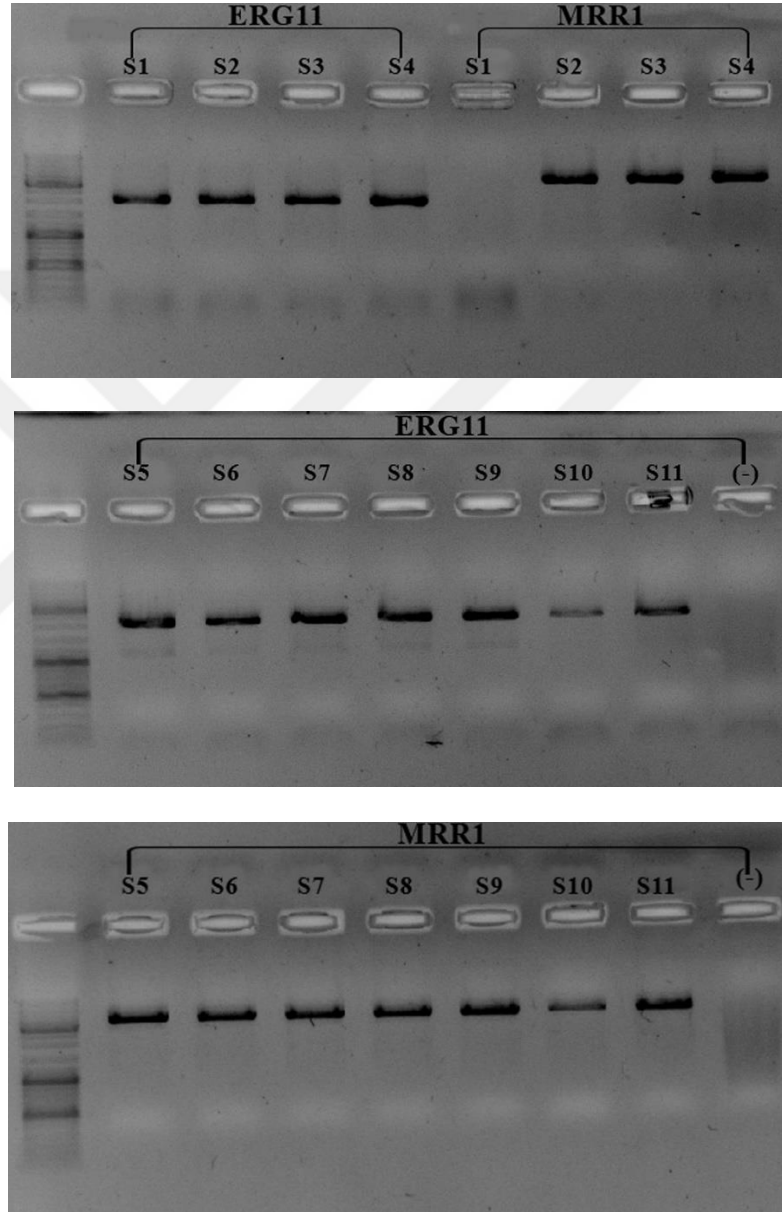
Çalışmaya dahil edilen toplam 32 örnekten 19'u FLU-R, biri doza bağımlı duyarlı (FLU-I), geri kalan 12'si ise flukonazol duyarlı (FLU-S)'dir. İzolatlara ait flukonazol MİK değerleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 9).

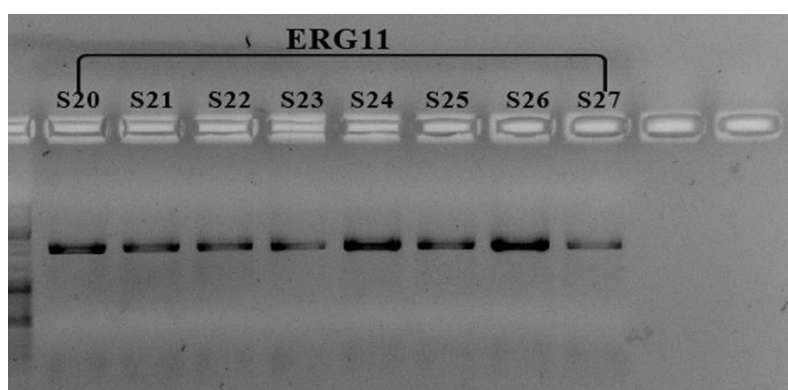
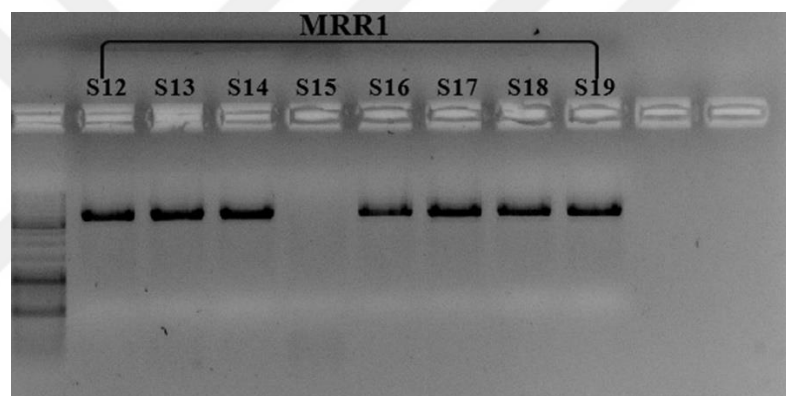
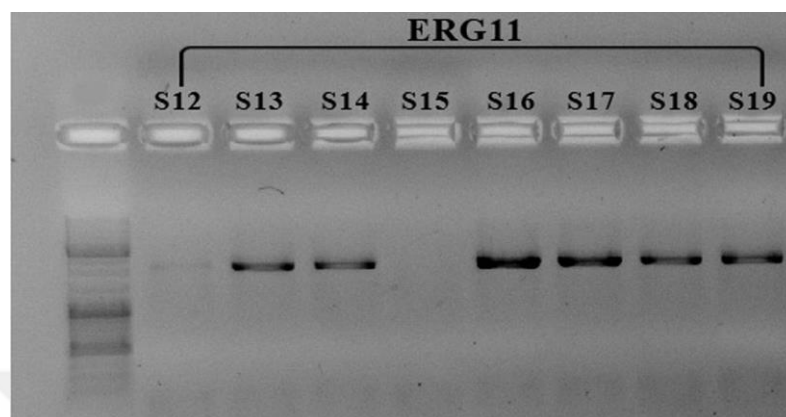
Tablo 9. Çalışmaya dahil edilen izolatlara ait bilgiler

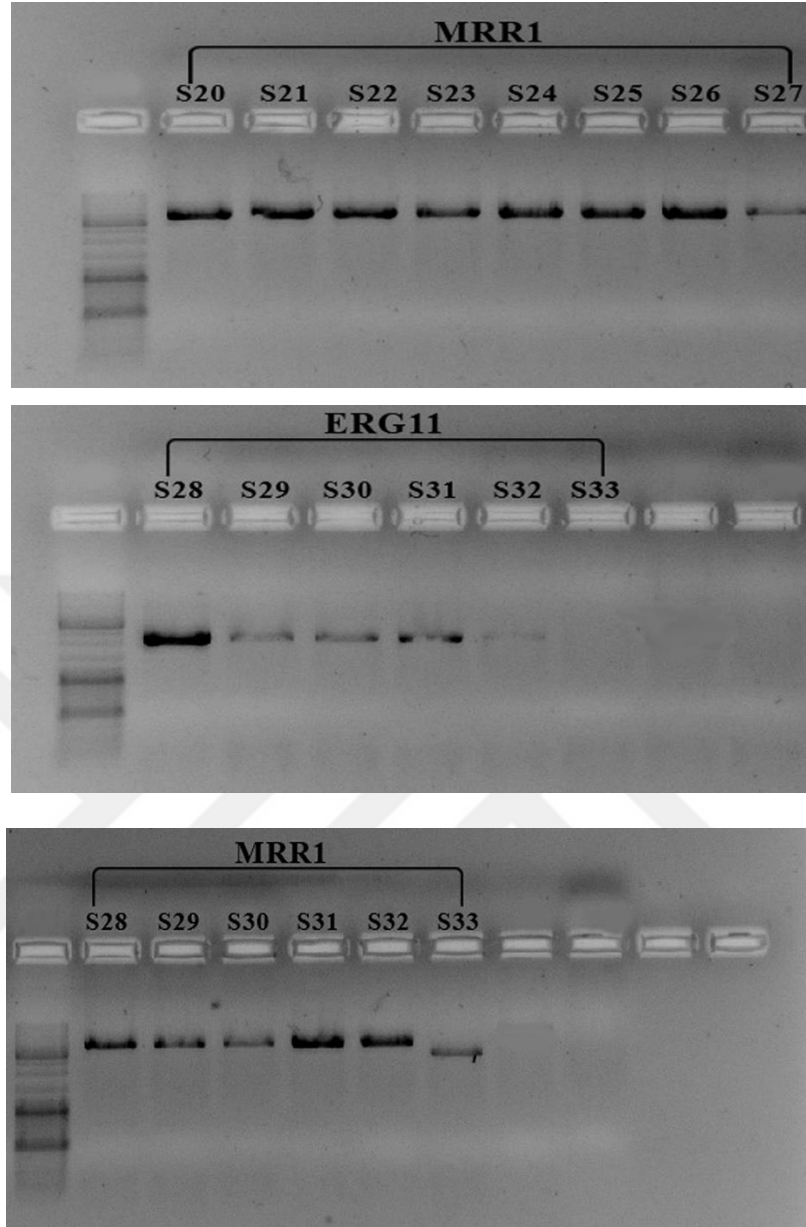
Örnek No	Örnek	Flukonazol (MİK mg/L)	Örnek Toplanan Birim	Tarih
S1	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S2	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S3	Kan	12	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S4	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S5	Kan	4	İç Hast. Onkoloji Servisi	2018
S6	Kan	1,5	İç Hast. Geriatri Servisi	2018
S7	Kan	0.25	Acil Anesteziyoloji YBÜ	2018
S8	Kan	1	İç Hast. Gastroenteroloji	2018
S9	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S10	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S11	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S12	Kan	0.75	Gen. Cer. Topuzlu Endokrin Cerrahi Servisi A	2018
S13	Kan	>256	Bakteriyoloji Laboratuvarı	2018
S14	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S15	Kan	>256	Kalp-Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Servisi	2019
S16	Kan	0.75	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S17	Kan	0.025	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S18	Kan	1,5	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S19	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S20	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S21	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2019
S22	Kan	3	Çocuk Hast. Genel Poliklinik	2019
S23	Kan	>256	Kdc Servis B	2018
S24	Kan	0.25	Çocuk Hast. Hematoloji Onkoloji Servisi	2019
S25	Kan	2	Çocuk Hast. Enfeksiyon Servisi	2018
S26	Kan	>32	Çocuk Hast. Metabolizma Servisi	2019
S27	Kan	>256	Çocuk Acil Polikliniği	2019
S28	Kan	>32	Çocuk Hast. Enfeksiyon Polikliniği	2019
S29	Kan	>256	Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2019
S30	Kan	>256	Anesteziyoloji YBÜ	2018
S31	Kan	0.38	Çocuk Cer. Günübürlük Hiz. Birimi	2018
S32	Kan	1	Bakteriyoloji Laboratuvarı	2019
S33			C. parapsilosis ATCC 22019	

4.2. ERG11 ve MRR1 Genlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi'nde görüntüsü Şekil 5'te verilmiştir. S1'de MRR1, S33'de ERG11, S15'de ERG11 ve MRR1 gen bölgesi çoğalmadığı için çalışmadan dışlanmıştı.







Şekil 5. Elektroforez görüntüleri

4.3. Dizileme

ERG11 genine ait aminoasit değişimleri incelendiğinde; 30 kökenin 12'sinde (% 40; S2, S5, S9, S10, S11, S14, S20, S21, S23, S27, S29 ve S30) kodon 132 Y/F değişimi (Şekil 6), 6'sında (% 20; S9, 19, S20, S21, S26 ve S28) kodon 143 K/R değişimi, 9'unda (% 30; S2, S4, S10, S11, S14, S23, S27, S29 ve S30) kodon 307 G/A değişimi ve 4'ünde (% 13,33; S3, S7, S16 ve S24) kodon 398 R/I değişimi mevcuttu (Tablo 10).

5. TARTIŞMA

Candida türlerinin sebep olduğu kan dolaşım enfeksiyonları tüm dünyada nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir kısmını oluşturur ³. Immüsupresif hasta sayısındaki artışla ilişkili olarak artan *Candida* enfeksiyonlarında; profilaktik ilaçların aşırı kullanımı, saptanan *Candida* türleri arasındaki dengeleri değiştirmekte ve bazı bölgelerde NAC türlerinin sayısı giderek artmaktadır ^{4,65,71-73}. 1997-2016 yılları arasında 39 ülkenin katılımıyla yürütülen SENTRY Antifungal Sürveyans Programı'nın sonuçlarına göre; *C. parapsilosis*, en çok rastlanan üç *Candida* türünden biridir ve Latin Amerika'da NAC'lar arasında 1. sıradadır ⁴. Ülkemizde ise tek merkezli çalışmalar daha fazladır ve izolasyon sıklığı merkezlere göre değişkenlik gösterir. Ancak, merkezlere bağlı olarak genellikle *C. parapsilosis* kan kültüründen en çok izole edilen ilk iki *Candida* türü arasında gösterilmiştir ⁷⁴⁻⁷⁶. Yakın zamanda merkezimizde gerçekleştirilen ve YBÜ hastalarında kandidemi dağılımını inceleyen bir çalışmada ise *C. parapsilosis* %28'lik oranla *C. albicans* (%32)'dan sonra 2. sırada etken olarak saptanmıştır ⁷⁷.

C. parapsilosis kökenlerinin artan izolasyonu antifungal duyarlılık çalışmalarının da sayısının artmasına sebep olmuştur. Özellikle birçok ülkede birincil basamak tedavi olarak flukonazol kullanımının yaygın olması antifungal direnç problemini gündeme getirmiştir. SENTRY raporunda, *C. parapsilosis* kökenlerinin flukonazol direnç oranları bölgesel olarak farklılık göstermiştir. Çalışma verilerine göre; dirençli kökenlere en çok Avrupa'da (%4,6) rastlanmıştır; Avrupa'yı sırasıyla Latin Amerika (%4,3), Kuzey Amerika (%3,7), Asya Pasifik (%0,6) izlemiştir ⁴. Ülkemizde ise veriler kısıtlıdır. Ancak, 12 üniversite hastanesinin katılımı ile gerçekleşen bir çalışmada; *C. parapsilosis* kompleks (n=575) izolatlarının duyarlılıkları merkezler arası farklılık göstermiş, flukonazole %7,7'lik genel direnç oranı ile sıklıkla azol direncine rastlanan *C. glabrata*'yı geride bırakmıştır ⁷⁸.

Son yıllarda, özellikle YBÜ'lerde FLU-R *C. parapsilosis* izolatlarının sebep olduğu salgınlar bildirilmiştir ^{79,80}. Salgın potansiyeli olan bu etkenin azol direnç mekanizmaları hakkında literatürdeki bilgiler kısıtlıdır. *Candida* türlerinde azol direnci sıklıkla ERG3, ERG11, TAC1, MRR1 gibi gen bölgelerinde gerçekleşen mutasyonlar veya CDR1/2 ve MDR1 genlerinde ekspresyon seviyelerindeki artış ile ilişkilendirilmektedir ⁹. *C. parapsilosis* için literatürde özellikle ERG11 ve MRR1 gen bölgelerinde mutasyonların saptanması ve ERG11 ve MDR1 genlerinin ekspresyon

seviyelerindeki artış olması azol direnci için birçok çalışmanın odak noktasıdır. Bu tez çalışmasında sadece ERG11 ve MRR1 genlerindeki mutasyonlara odaklanılmıştır.

FLU-R *C. parapsilosis* izolatlarında ERG11’de azol direncine sebep olabilecek bazı değişiklikler tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi enzim lanosterol 14- α -demetilaz bağlanma afinitesini değiştirebilecek Y132F mutasyonudur ⁹. Y132F şu anda literatürde azol direnci ile ilişkilendirilen, ERG11 geninde en sık rastlanan değişikliktir. Ancak farklı mutasyonları bildiren yayınlar da mevcuttur. Bu mutasyonlardan bazıları dirençli kökenlerde tek başına veya Y132F ile birlikte kombinasyon halinde bulunur.

Güney Kore’ye ait bir çalışmada 47 FLU-R *C. parapsilosis* kan dolaşımı izolatın 30’unda (%63,8) ERG11’de Y132F mutasyonu bulunurken; FLU-S 20 izolatın hiçbirinde ise Y132F mutasyonu tespit edilmemiştir ⁸¹. Kuveyt’te benzer şekilde; 11 FLU-R *C. parapsilosis* izolatın beşinde (%45) ERG11’deki Y132F mutasyonu bulunurken FLU-S ve FLU-I izolatların hiçbirinde bu mutasyon gözlemlenmemiştir ⁶⁹. Bu tez çalışmasında ise, ERG11 geni dizilenen 17 FLU-R izolatın 11(%64,7)’inde Y132F mutasyonu gözlemlenirken duyarlı izolatlarda Y132F değişimi gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, bir FLU-I izolatta Y132F mutasyonu tespit edilmiştir.

Hindistan’da yapılan bir çalışmada ERG11 dizilemesinde; Y132F, K143R ve R398I mutasyonları saptanmıştır. İlginç bir şekilde, 55 FLU-R izolatların %94,5’unda K143R tespit edilirken üç tanesinde Y132F bulunmuştur. Dokuz FLU-S örnekten sekizinde K143R veya Y132F bulunurken, bir örnekte ikisi de bulunmamıştır. R398I ise dirençli, doza bağlı duyarlı ve duyarlı izolatlarda bulunmuştur ⁸². Bizim çalışmamızda ise; ERG11’de bu mutasyonlar tespit edilmiş ve 17 FLU-R izolatın altısında (%35,29) K143R mutasyonu bulunmuştur. Çalışmamızda baskın olarak bulunan Y132F mutasyonudur (%64,7).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada FLU-R izolatların %90’ında (54/60) ERG11’de mutasyon saptanmış ve Y132F (24/60)’e ek olarak Y132F+ K143R (19/60) kombinasyon halinde bulunmuştur ⁸³. Aynı gruba ait yakın tarihli çalışmada ise önceki çalışmada bulunan mutasyonlardan bazıları tespit edilememiş ve Y132F (%60,7), G458S (% 14,2), Y132F+G307A (%10,7), ve G307A+G458S (%3,7) mutasyonları bulunmuştur ⁸⁴. Çalışmalarında yaptıkları MLMT (Multilocus Microsatellite Typing) analizine göre Y132F ve Y132F+G307 bulunduran dirençli izolatlar genetik olarak benzer kümeler

halinde bulunmuş ve G458S içeren dirençli izolatlar klonal olup duyarlı izolatlar arasında dağılmıştır.

Bu çalışmada ise dizilemesi yapılan dirençli izolatların bir tanesi dışında ERG11 bölgesinde mutasyon gözlemlenmiş ve Y132F (11/17)'den sonra Y132F+ G307A (8/17) kombinasyonu %47'lik oranla en sık saptanan ikinci mutasyondur. Bu örneklerin ait olduğu hastaların merkezimizde bulundukları birim ve zaman değerlendirilmiştir. Sekiz hastadan dördü aynı sene içinde birbirine oldukça yakın birimlerde bulunmuştur ve bu birimlerde çalışan ekip aynı ekiptir. Y132F+G307 kombinasyonunu sık saptamamızın sebebi hastanemizde gerçekleşen bir klonal yayılım ile ilişkili olabilir. Ancak bütçe kısıtlamasından dolayı bu çalışma kapsamında klonal ilişki çalışılmamıştır.

Grossmann ve ark., Y132F izolatlarının klonal bulaşmaya neden olma ve hastanelerde kalıcı olma eğiliminin Y132F olmayan flukonazole dirençli izolatlardan daha yüksek olabileceği öne sürmüştür ⁸⁵. Güney Afrika'da, yenidoğan YBÜ'lerinde saptanan *C. parapsilosis*'lerin genetik çeşitliliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada ise; belirli bir küme altında toplanan izolatların flukonazole dirençli olma olasılığı daha yüksek bulunmuştur ⁸⁶. Mikrosatellit tiplendirilmelerin de yapıldığı, YBÜ salgınlarını bildiren birçok çalışmada; FLU-R *C. parapsilosis* izolatlarında Y132F mutasyonu saptanmaya devam etmektedir ^{81,87}.

Amerika'da yapılan bir çalışmada Y132F ile birlikte S216L, R398I mutasyonları tespit edilmiştir. Y132F mutasyonu bir FLU-R izolatla tek başına bulunurken 10 dirençli izolatla R398I ile birlikte bulunmuştur. R398I hem duyarlı hem de dirençli izolatlarda bulunmuştur ⁸⁸. İtalya'ya ait bir başka çalışmada; 49 FLU-R izolat arasından 40'ı (%81,6) Y132F mutasyonu içerirken dokuz (%18,4) izolatla Y132F ve R398I kombine halde bulunmuştur ⁸⁹. Bu çalışmada ise dizilenen 17 dirençli izolatın sadece birinde (%5,8) ve üç duyarlı izolatla R398I tek başına tespit edilmiştir. Tartışılan yayınlar, R398I mutasyonunun azol direncine katkısı olsa bile duyarlı izolatlarda da bulunduğu için tek başına azol direncine etkisinin yetersiz olduğunu öne sürmektedir. Bu da, verilerimizle ters düşmemektedir.

Candida'larda azol direnci ile ilişkilendirilen bir diğer mekanizma, artmış efluks etkisi sağlayan membran taşıyıcıları kodlayan genlerde bazı mutasyonların gerçekleşmesidir ^{3,9}. Erken aşamada yapılan bir çalışmada flukonazol, vorikonazol ve posakonazole maruz bırakılarak in vitro direnç geliştirilen *C. parapsilosis* izolatlarında

flukonazol ve vorikonazole maruz bırakılan suşlar her iki ilaca da direnç geliştirmiş ancak posakonazol için sadece MİK değerlerinin artmasına sebep olmuştur. Flukonazol ve vorikonazole maruz bırakılan suşların MRR1 dizilemesi yapılarak duyarlı suşlarla karşılaştırılmış ve G583R ve K873N mutasyonları tespit edilmiştir⁹⁰. Silva ve ark., bu mutasyonların MDR1 ekspresyon seviyelerini artırabileceği öne sürmüştür. Grossmann ve ark. MRR1 dizilemesi ve MDR1 ekspresyon seviyelerini inceledikleri araştırmalarında, MRR1’de 5 mutasyon tanımlamıştır. Saptadıkları mutasyonlardan biri olan A619V’nin bulunduğu bir dirençli izolatta 16 kat artmış MDR1 seviyesi, bir doza bağımlı duyarlı izolatta ise 10 kat artmış ekspresyon seviyesi tespit ettiler. Bunun üzerine MDR1’deki polimorfizmlerin yaygın olarak gerçekleştiğini bunlardan bazılarının MDR1’de aşırı ekspresyona sebep olabileceğini belirtmişlerdir⁸⁵. Bununla birlikte *C. parapsilosis*’deki azol direnci ile ilgili MRR1 mutasyonları hakkında bilgiler oldukça kısıtlıdır. Çalışmamızda sadece MRR1’deki değişimlere odaklanılmış MDR1 ekspresyon seviyeleri incelenmemiştir.

Güney Kore’ye ait bir çalışmada ERG11 ve MRR1 dizilemesi yapılan izolatlarda Y132F mutasyonu bulunan izolatların biri dışında hepsinde MRR1’de K177N mutasyonu bulunmuştur. K177N mutasyonu aynı zamanda duyarlı izolatlarda da tespit edilmiştir. Çalışmada Y132F mutasyonu tespit edilmeyen bir dirençli izolatta ise MRR1 geninde G927D mutasyonu tespit edilmiştir⁸¹. Son yıllarda Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise FLU-R kökenlerin MRR1 geninde R405K (% 56,5) ve G927C (% 8,7) oranında bildirilmekle birlikte bu mutasyonların azol direnci ile ilişkisinin henüz araştırılmadığı belirtilmiştir⁴¹. Aynı çalışmada FLU-R izolatların çoğunda ERG11 Y132F(%71,7) mutasyonu saptanmış bunu sırasıyla G458S (%10,9) ve D421N mutasyonları izlemiştir. Bizim çalışmamızda ise Y132F en sık gözlenirse de G458S ve D421N mutasyonları saptanmamıştır. Bunun yanı sıra G307A, K143R ve R398I mutasyonları saptanmıştır. MRR1 dizilemesi sonucunda ise R405K ve G927C mutasyonları bulunmuştur. Bir FLU-I izolatta R405K mutasyonu (Y132F ile kombinasyon halinde), dört FLU-R izolatta MRR1’in G927C mutasyonu (üçü ERG11’in K143R mutasyonu ile kombinasyon halinde) mutasyonu saptanmıştır. 17 FLU-R izolatın beşinde (%29,4) MRR1’de mutasyon tespit edilmiş ve hiçbir FLU-S izolatta MRR1 mutasyonu saptanmamıştır. Sadece bir FLU-R izolatta MRR1’de gerçekleşen G927C mutasyonu tek başına bulunmuştur.

MRR1 de saptanan mutasyonlar oldukça farklıdır ve bazı çalışmalarda MDR1'in ekspresyon seviyeleri ile birlikte incelenmemiştir. MRR1 ve MDR1 etkisini birlikte alan çalışmalarda ise MRR1 bölgesinde tespit edilen mutasyonlar MDR1'de azol direncine sebep olabilecek anlamlı bir etkisi bulunamamıştır. Bu sebeple yorumlamalarda zorluklar vardır.

Sonuç olarak; bu çalışmada ERG11 (Y132F, K143R, G307A, R398I) ve MRR1 (R405K, G927C) genlerinde tespit edilen mutasyonların daha önce literatürde bahsi geçmiştir ve çalışmamızda daha önce tanımlanmamış bir mutasyona rastlanmamıştır. Literatürde, *C. parapsilosis*'de görülen flukonazol direncin baskın mekanizmasının ERG11 gen bölgesinde gerçekleşen Y132F mutasyonu olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada da dirençli kökenlerde en sık Y132F mutasyonu bulunmuştur. Ancak, antimikrobiyal direncin karmaşık bir sürecin sonucu olduğu/ olabileceği düşünüldüğünde birden fazla mekanizmanın dirence sebep olması muhtemeldir. Bu sebeple bu konuda daha fazla ve daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun* 2018 91. 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-018-07556-5
2. Demin KA, Refeld AG, Bogdanova AA, et al. Mechanisms of Candida Resistance to Antimycotics and Promising Ways to Overcome It: The Role of Probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2021 134. 2021;13(4):926-948. doi:10.1007/S12602-021-09776-6
3. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. Candida parapsilosis: From genes to the bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2). doi:10.1128/CMR.00111-18
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for Candida Species From 1997–2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S79. doi:10.1093/OFID/OFY358
5. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. To Replace Candida parapsilosis Groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):284. doi:10.1128/JCM.43.1.284-292.2005
6. Guo J, Zhang M, Qiao D, et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of Candida parapsilosis Species Complex in Eastern China: A 15-Year Retrospective Study by ECIFIG. *Front Microbiol.* 2021;12:249. doi:10.3389/FMICB.2021.644000/BIBTEX
7. Pfaller MA, Jones RN, Castanheira M. Regional data analysis of Candida non-albicans strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. *Mycoses.* 2014;57(10):602-611. doi:10.1111/MYC.12206
8. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):e1-e50. doi:10.1093/CID/CIV933
9. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(7):792-798. doi:10.1016/J.CMI.2019.03.028

10. Homei A, Worboys M. Introduction - Fungal Disease in Britain and the United States 1850–2000 - NCBI Bookshelf. In: ; 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169219/?report=reader>. Accessed April 7, 2022.
11. Nemeth TM, Gacser A, Nosanchuk JD. Candida psilosis Complex. *Ref Modul Life Sci*. 2018. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20709-7
12. Ashford BK. Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and Their Relation to Tropical Sprue. *Am J Trop Med Hyg*. 1928;s1-8(6):507-538. doi:10.4269/AJTMH.1928.S1-8.507
13. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. Candida parapsilosis, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606. doi:10.1128/CMR.00013-08
14. Nemeth TM, Gacser A, Nosanchuk JD. Candida psilosis Complex. *Ref Modul Life Sci*. January 2018. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20709-7
15. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast Candida parapsilosis. *Curr Genet* 2009 555. 2009;55(5):497-509. doi:10.1007/S00294-009-0268-4
16. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of Candida species. *J Clin Microbiol*. 1987;25(4):675-679. doi:10.1128/jcm.25.4.675-679.1987
17. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within Candida parapsilosis from clinical sources. *J Clin Microbiol*. 1995;33(7):1815-1821. doi:10.1128/JCM.33.7.1815-1821.1995
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology 9th Edition.*; 2020.
19. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006;28(8):799-808. doi:10.1002/BIES.20441
20. Sant DG, Tupe SG, Ramana C V., Deshpande M V. Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. *J Appl Microbiol*. 2016;121(6):1498-1510. doi:10.1111/JAM.13301
21. Rodrigues ML. The Multifunctional Fungal Ergosterol. *MBio*. 2018;9(5). doi:10.1128/MBIO.01755-18

22. Liu JF, Xia JJ, Nie KL, Wang F, Deng L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(7):1-8. doi:10.1007/S11274-019-2673-2/TABLES/1
23. Rella A, Farnoud AM, Del Poeta M. Plasma Membrane Lipids and Their Role in Fungal Virulence. *Prog Lipid Res.* 2016;61:63. doi:10.1016/J.PLIPRES.2015.11.003
24. Walsh TJ, Hayden RT, Larone DH. Larone's medically important fungi : a guide to identification. 6th Edition. ASM Press. 2018.
25. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):288-305. doi:10.1111/J.1574-6976.2011.00278.X
26. Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP. *Candida Berkhout* (1923). *The Yeasts.* 2011;2:987-1278. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00090-2
27. Hallen-Adams HE, Suhr MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence.* 2017;8(3):352. doi:10.1080/21505594.2016.1247140
28. Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zajac D, et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. *Mol Oral Microbiol.* 2018;33(2):113-124. doi:10.1111/OMI.12206
29. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 2009 555. 2009;55(5):497-509. doi:10.1007/S00294-009-0268-4
30. Gómez-Molero E, De-La-pinta I, Fernández-Pereira J, et al. *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. *J Fungi* 2021, Vol 7, Page 33. 2021;7(1):33. doi:10.3390/JOF7010033
31. Yılmaz-Ciftdoğan D, Kara-Aksay A, Erbaş G, et al. Epidemiology of Candidemia in Children over 7 Years in a Medical Center in Turkey. *Microbiol Spectr.* 2021;9(2). doi:10.1128/SPECTRUM.00453-21
32. Feng X, Wu Z, Ling B, et al. Identification and Differentiation of *Candida parapsilosis* Complex Species by Use of Exon-Primed Intron-Crossing PCR. *J Clin*

- Microbiol.* 2014;52(5):1758. doi:10.1128/JCM.00105-14
33. Zoppo M, Poma N, Di Luca M, Bottai D, Tavanti A. Genetic Manipulation as a Tool to Unravel *Candida parapsilosis* Species Complex Virulence and Drug Resistance: State of the Art. *J Fungi* 2021, Vol 7, Page 459. 2021;7(6):459. doi:10.3390/JOF7060459
 34. Richardson JP, Ho J, Naglik JR. *Candida*–Epithelial Interactions. *J Fungi* 2018, Vol 4, Page 22. 2018;4(1):22. doi:10.3390/JOF4010022
 35. Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med.* 2018;5(FEB):28. doi:10.3389/FMED.2018.00028/BIBTEX
 36. Nett JE, Andes DR. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *J Fungi* 2020, Vol 6, Page 21. 2020;6(1):21. doi:10.3390/JOF6010021
 37. Ben-Ami R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *J Fungi* 2018, Vol 4, Page 97. 2018;4(3):97. doi:10.3390/JOF4030097
 38. Tan GSE, Hsu LY. Overview of Fungal Infections ☆. *Ref Modul Biomed Sci.* 2018. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.98320-X
 39. Kozel TR, Wickes B. Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(4). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019299
 40. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. Campion EW, ed. *N Engl J Med.* 2015;373(15):1445-1456. doi:10.1056/NEJMRA1315399
 41. Demirci Dos Santos Duarte S. Hacettepe Üniversitesi Klinik Mikoloji Laboratuvarında Fungemi Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida Parapsilosis* Kompleks İzolatlarında Türlerin Belirlenmesi, Bu Türlerde Azollere Direnç Durumunun Ve Direncin Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. 2020.
 42. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(SUPPL.7):9-18. doi:10.1111/1469-0691.12038
 43. Tamo SPB. *Candida* Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Infect Dis Clin Microbiol.* 2020;2(2):91-102. doi:10.36519/IDCM.2020.0006

44. Helweg-Larsen J, Steensen M, Pedersen FM, et al. Intensive Care Antifungal Stewardship Programme Based on T2Candida PCR and Candida Mannan Antigen: A Prospective Study. *J Fungi* 2021, Vol 7, Page 1044. 2021;7(12):1044. doi:10.3390/JOF7121044
45. Eghtedar Nejad E, Ghasemi Nejad Almani P, Mohammadi MA, Salari S. Molecular identification of Candida isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of Candida species. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(10):e23444. doi:10.1002/JCLA.23444
46. Delavy M, Dos Santos AR, Heiman CM, Coste AT. Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:19. doi:10.3389/FCIMB.2019.00019/BIBTEX
47. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, et al. Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*. 2014;20(4):329-344. doi:10.1111/ODI.12123
48. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3). doi:10.1128/CMR.00069-19
49. EUCAST: AST of yeasts. https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/. Version 10.0, valid from 2020-02-04. Accessed May 23, 2022.
50. Knoll MA, Ulmer H, Lass-Flörl C. Rapid Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Molds by MALDI-TOF MS: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Fungi* 2021, Vol 7, Page 63. 2021;7(1):63. doi:10.3390/JOF7010063
51. Astvad KMT, Arian-Akdagli S, Arendrup MC. A Pragmatic Approach to Susceptibility Classification of Yeasts without EUCAST Clinical Breakpoints. *J Fungi*. 2022;8(2):141. doi:10.3390/JOF8020141/S1
52. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne , PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;2017.

53. Sanguinetti M, Posteraro B. Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs. *J Fungi*. 2018;4(3). doi:10.3390/JOF4030110
54. Durand C, Maubon D, Cornet M, Wang Y, Aldebert D, Garnaud C. Can We Improve Antifungal Susceptibility Testing? *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:856. doi:10.3389/FCIMB.2021.720609/BIBTEX
55. Kidd SE, Chen SCA, Meyer W, Halliday CL. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Front Microbiol*. 2020;10:2903. doi:10.3389/FMICB.2019.02903/BIBTEX
56. Arastehfar A, Boekhout T, Butler G, et al. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5):517. doi:10.1093/FEMSRE/FUZ015
57. Santos GC d. O, Vasconcelos CC, Lopes AJO, et al. Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol*. 2018;9(JUL):1351. doi:10.3389/FMICB.2018.01351/BIBTEX
58. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. 2017;133:86-96. doi:10.1016/J.BCP.2016.11.019
59. Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Ablordeppey SY. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(7), 555–578. doi: 10.2174/1389557516666160118112103.
60. Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):279-291. doi:10.1128/AAC.40.2.279
61. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):40-79. doi:10.1128/CMR.12.1.40
62. Van Daele R, Spriet I, Wauters J, et al. Antifungal drugs: What brings the future? *Med Mycol*. 2019;57(Supplement_3):S328-S343. doi:10.1093/MMY/MYZ012
63. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015;58(S2):2-13. doi:10.1111/MYC.12330

64. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiot* 2020, Vol 9, Page 312. 2020;9(6):312. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9060312
65. Gonçalves SS, Souza ACR, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*. 2016;59(4):198-219. doi:10.1111/MYC.12469
66. Arastehfar A, Lass-Flörl C, Garcia-Rubio R, et al. The Quiet and Underappreciated Rise of Drug-Resistant Invasive Fungal Pathogens. *J Fungi* 2020, Vol 6, Page 138. 2020;6(3):138. doi:10.3390/JOF6030138
67. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol.* 2017;7(JAN):2173. doi:10.3389/FMICB.2016.02173/BIBTEX
68. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. *Genes* 2018, Vol 9, Page 461. 2018;9(9):461. doi:10.3390/GENES9090461
69. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Epidemiology and Molecular Basis of Resistance to Fluconazole Among Clinical *Candida parapsilosis* Isolates in Kuwait. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(8), 966–972. doi: 10.1089/mdr.2016.0336.
70. Arastehfar A, Daneshnia F, Najafzadeh MJ, et al. Evaluation of Molecular Epidemiology, Clinical Characteristics, Antifungal Susceptibility Profiles, and Molecular Mechanisms of Antifungal Resistance of Iranian *Candida parapsilosis* Species Complex Blood Isolates. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:206. doi:10.3389/FCIMB.2020.00206/BIBTEX
71. Pfaller MA, Carvalhaes C, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M. Activity of a Long-Acting Echinocandin, Rezafungin, and Comparator Antifungal Agents Tested against Contemporary Invasive Fungal Isolates (SENTRY Program, 2016 to 2018). *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(4). doi:10.1128/AAC.00099-20
72. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based

- surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3435-3442. doi:10.1128/JCM.01283-12
73. Sanglard D. Finding the needle in a haystack: Mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. *PLOS Pathog*. 2019;15(1):e1007478. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1007478
 74. Kılınçel Ö, Akar N, Karamurat ZD ve ark. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(4):256-263. doi:10.5222/TMCD.2018.256
 75. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y ve ark. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımının Ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*. 2015;29(3):105-113.
 76. Tümtürk A. Yoğun Bakım Hastalarında Görülen Kandidemide Tür Dağılımı ve Antifungal İlaçlara Karşı Direnç Gelişimi: Tek Merkez Deneyimi. *Med Sci*. 2020;15(1):26-34.
 77. Mete B, Zerdali EY, Aygun G, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(2):325-333. doi:10.1007/S10096-020-03994-6/TABLES/5
 78. Arikan-Akdagli S, Gülmez D, Doğan Ö, et al. First multicentre report of in vitro resistance rates in candidaemia isolates in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;18:230-234. doi:10.1016/J.JGAR.2019.04.003
 79. Pinhati HMS, Casulari LA, Souza ACR, Siqueira RA, Damasceno CMG, Colombo AL. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant Candida parapsilosis strains in an intensive care unit. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):1-6. doi:10.1186/S12879-016-1767-9/TABLES/1
 80. Fekkar A, Blaize M, Bouglé A, et al. Hospital outbreak of fluconazole-resistant candida parapsilosis: Arguments for clonal transmission and long-term persistence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(5). doi:10.1128/AAC.02036-20/SUPPL_FILE/AAC.02036-20-S000S1.PDF
 81. Choi YJ, Kim YJ, Yong D, et al. Fluconazole-Resistant Candida parapsilosis

- Bloodstream Isolates with Y132F Mutation in ERG11 Gene, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(9):1768. doi:10.3201/EID2409.180625
82. Singh A, Singh PK, De Groot T, et al. Emergence of clonal fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(5):1260-1268. doi:10.1093/JAC/DKZ029
 83. Arastehfar A, Daneshnia F, Hilmioglu-Polat S, et al. First Report of Candidemia Clonal Outbreak Caused by Emerging Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Harboring Y132F and/or Y132F+K143R in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(10). doi:10.1128/AAC.01001-20
 84. Arastehfar A, Hilmioglu-Polat S, Daneshnia F, et al. Clonal Candidemia Outbreak by *Candida parapsilosis* Carrying Y132F in Turkey: Evolution of a Persisting Challenge. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:1. doi:10.3389/FCIMB.2021.676177/FULL
 85. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1030-1037. doi:10.1128/AAC.04613-14
 86. Magobo RE, Naicker SD, Wadula J, et al. Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungaemia by microsatellite genotyping: Results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. *Mycoses*. 2017;60(5):320-327. doi:10.1111/MYC.12596
 87. Corzo-Leon DE, Peacock M, Rodriguez-Zulueta P, Salazar-Tamayo GJ, MacCallum DM. General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an Erg11 Y132F mutation. *Med Mycol*. 2021;59(7):664. doi:10.1093/MMY/MYAA098
 88. Berkow EL, Manigaba K, Parker JE, Barker KS, Kelly SL, Rogers PD. (2015). Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 5942–5950. doi: 10.1128/AAC.01358-15.
 89. Martini C, Torelli R, de Groot T, et al. Prevalence and Clonal Distribution of

- Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Causing Bloodstream Infections in a Large Italian Hospital. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:232. doi:10.3389/FCIMB.2020.00232/BIBTEX
90. Silva AP, Miranda IM, Guida A, et al. Transcriptional Profiling of Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3546. doi:10.1128/AAC.01127-10



ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

CANDIDA PARAPSILOSİS KÖKENLERİNDE ANTİFUNGAL DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

8 %	7 %	2 %	4 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	4 %
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	1 %
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	1 %
4	cerrahpasa.istanbul.edu.tr Internet Source	<1 %
5	Submitted to Beykent Universitesi Student Paper	<1 %
6	genome.med.harvard.edu Internet Source	<1 %
7	www.idcmjournal.org Internet Source	<1 %
8	www.sabah.com.tr Internet Source	<1 %

open.library.ubc.ca

ÖZGEÇMİŞ

