

Flukonazole Dirençli *Candida albicans* İzolatlarında Atım Pompa Ekspresyonlarının Araştırılması

Investigation of the Expression Levels of Efflux Pumps in Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Isolates

Sinem GÜLAT¹, Mine DOLUCA DERELİ¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 15.06.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.02.2014

ÖZET

Flukonazolün profilaksi ve sağaltımda yaygın ve tekrarlayan kullanımı *Candida albicans* suşlarında direnç gelişimine yol açmıştır. Çalışmamızda, flukonazole dirençli ve duyarlı *C. albicans* izolatlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyonu araştırılarak flukonazol direncinde bu mekanizmanın rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, flukonazole dirençli beş, flukonazole duyarlı altı ve kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı dört *C. albicans* suşu dahil edilmiştir. Suşların flukonazol ve diğer antifungaller için MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Dirençli suşların flukonazol duyarlılıkları ayrıca, siklosporin A içeren ve içermeyen maya özütlü pepton dekstroz agarda E-test ile de incelenmiştir. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeyleri, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu genlerin ekspresyonu *ACT1* seviyeleri ile normalize edilmiş ve flukonazole duyarlı *C. albicans* ATCC 14053 kontrol suşu ile karşılaştırılmıştır. Tüm suşların amfoterisin B'ye duyarlı ve bir izolat hariç tümünün klotrimazole de duyarlı olduğu görülmüştür. Flukonazole dirençli beş suşun üçü ve kısmi inhibisyon etkisi gösteren dört suşun üçü 5-flusitozine dirençli, duyarlı suşların ise biri hariç tümü 5-flusitozine orta duyarlı olarak bulunmuştur. Flukonazole dirençli suşların, biri hariç tümünün itrakonazol ve ketokonazole dirençli, mikonazol için ise ≥ 64 µg/ml MİK değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Flukonazole duyarlı tüm suşlar ketokonazole duyarlı, itrakonazole doza bağımlı duyarlı bulunmuştur. Flukonazole dirençli ve duyarlı suşların vorikonazole duyarlı olduğu belirlenmiştir. Kontrol suşu ile karşılaştırıldığında; flukonazole dirençli beş suşun ikisinin yüksek, üçünün orta düzeyde *CDR1/2* ve birinin yüksek, üçünün ise düşük düzeylerde *MDR1* gen ekspresyonu yaptığı tespit edilmiştir. Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı suşlardan birinde görülen yüksek *MDR1* ekspresyonu dışında, orta düzeylerde *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* fazla ekspresyonu gözlenirken, duyarlı izolatlar üç suş dışında atım pompalarını düşük düzeylerde eksprese etmiştir. *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeylerinin aynı suş için tüm izolatlarda paralel olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza alınan flukonazole dirençli *C. albicans* izolatlarında atım pompa genlerinin fazla ekspresyonunun dirençten sorumlu önemli bir mekanizma olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*; flukonazol direnci; atım pompaları.

İletişim (Correspondence): Dr. Sinem Gülat, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı 35340, İzmir, Türkiye **Tel (Phone):** +90 232 412 2222, **E-posta (E-mail):** sinemozer99@yahoo.com

ABSTRACT

Widespread and repeated use of fluconazole in the prophylaxis and therapy resulted in resistance among *Candida* strains. Investigation of the expression of efflux pump encoding genes was aimed in fluconazole-resistant and -susceptible *C.albicans* isolates in order to determine the role of this mechanism in fluconazole resistance. Five fluconazole-resistant, six -susceptible and four trailing effect showing susceptible *C.albicans* isolates were included in the study. The MIC values of fluconazole and other antifungal agents were determined by the microdilution method. The fluconazole MIC values of the fluconazole-resistant strains were also studied by E-test performed on yeast extract peptone dextrose agar with and without cyclosporin A. The expression levels of *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* transcripts were determined by real-time PCR method. The expression of these genes was normalized with their *ACT1* levels and compared with the fluconazole-susceptible *C.albicans* ATCC 14053 strain. It was detected that all strains were susceptible to amphotericin B and all except one strain were also susceptible to clotrimazole. Three out of five fluconazole-resistant strains and three out of four trailing effect showing susceptible strains were resistant to 5-flucytosine, and all except one susceptible strains were found as intermediate to 5-flucytosine. All except one fluconazole-resistant strains were determined as resistant to itraconazole and ketoconazole, and had miconazole MIC values of ≥ 64 µg/ml. All fluconazole-susceptible isolates were detected to be susceptible to ketoconazole and dose dependent susceptible to itraconazole. Fluconazole-resistant and -susceptible strains were determined as susceptible to voriconazole. Out of five fluconazole-resistant isolates, two strains overexpressed high levels and three strains overexpressed mild levels of *CDR1/2*; one strain overexpressed high levels and three strains overexpressed low levels of *MDR1* in comparison to *C.albicans* ATCC 14053 control strain. It was observed that *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* gene expression levels were mild in strains showing trailing effect except one which highly expressed *MDR1*, while susceptible isolates except three expressed efflux pump genes at low levels. It was determined that the expression levels of *CDR1* and *CDR2* genes for the same strain were in parallel for all isolates. It can be concluded that overexpression of efflux pump genes is an important mechanism of resistance in fluconazole-resistant *C.albicans* isolates.

Key words: *Candida albicans*; fluconazole resistance; efflux pumps.

GİRİŞ

Candida türleri özellikle immün yetmezlikli hastalarda yüzeysel enfeksiyonlardan, yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olan fırsatçı patojenlerdir¹. Bu türler, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa'da sırasıyla dördüncü ve altıncı en yaygın hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonu etkenidir^{2,3}. Türkiye'de ise *Candida* türleri kan dolaşımı enfeksiyonlarının üçüncü en yaygın nedeni (%10.1) olarak bildirilmektedir⁴. Kan dolaşımı enfeksiyonlarına en sık neden olan tür *Candida albicans* olup, dünya çapında %37-70 oranında sıklığa sahiptir⁵. *Candida* enfeksiyonlarının önlenmesi ve sağaltımı genellikle uzun dönem ilaç kullanımı gerektirmekte olup, flukonazol bu amaçla en yaygın kullanılan triazol sınıfı antifungaldir. Uzun ve tekrarlayan flukonazol sağaltımı ile birlikte, diğer antifungallerle karşılaşmanın *C.albicans* izolatlarında direnç sorununa neden olduğu bildirilmiştir⁶.

C. albicans suşlarında azol direncinden sorumlu birçok mekanizma ileri sürülmüş, flukonazole dirençli suşlarda birden fazla mekanizmanın birlikte rol aldığı belirtilmiştir⁷. Bu mekanizmalar; ilacın hücre içinde birikiminde azalma, ilacın hedefi olan lanosterol demetilazda (Erg11p) değişiklik ve ergosterol biyosentezinde değişiklik şeklinde özetlenmektedir⁷. Hücre içinde ilaç birikiminde azalma, ilacın hücre içine alımında bozukluk

veya aktif pompalarla atılımının artması sonucu meydana gelmektedir. *C.albicans* suşlarında flukonazol direncine en sık neden olan mekanizma, çoklu atım pompalarının fazla ekspresyonudur⁸. Fungal atım pompaları ATP bağlayan kaset ailesinden Cdr1p ve Cdr2p ile majör kolaylaştırıcı süper ailesinden (major facilitator superfamily) Mdr1p olmak üzere iki gruptur. *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri ilaç atımında rol oynayan hücre membranı ile ilişkili taşıyıcıları kodlamaktadır. *MDR1* flukonazole, *CDR1* ve *CDR2* ise flukonazol, ketokonazol, itrakonazol gibi farklı azollere ve terbinafin, amorolfen gibi diğer bazı ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır⁷. Bu çalışmada, flukonazole duyarlı (FLU-S) ve flukonazole dirençli (FLU-R) *C.albicans* izolatlarında atım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin araştırılması ile dirençteki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, klinik örneklerden soyutlanmış 5 FLU-R (H1, H2, H3, B, 960), 6 FLU-S (533, 565, 644, 1221, 1453, 2157) ve 4 kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı (813, 1978, 348, 93-05) *C.albicans* suşu alındı. Aynı suşlarda, önceki araştırmamızda⁹ belirlenen *ERG11* geni mutasyonları ve suşların izolasyon yerleri Tablo 1'de gösterildi. Çalışmada, FLU-R 2 *C.albicans* suşu¹⁰ (DSY289 ve DSY292) ile FLU-S *C.albicans* ATCC 14053 suşu kontrol amacıyla kullanıldı.

İzolatların, flukonazol (FLU), 5-flusitozin (5-FC), itrakonazol (ITZ), ketokonazol (KTZ), mikonazol (MCZ), klotrimazol (CLT) (Sigma, ABD) ile vorikonazol (VOR) ve amfoterisin B (AMP-B) (AppliChem, Almanya) duyarlılıkları CLSI M27-A3 standardına göre mikrodilüs-

Tablo 1. Çalışmaya Alınan Klinik İzolatlardaki *ERG11* Geni Aminoasit Değişimleri

İzolat no	İzolasyon yeri	Aminoasit değişimi
H1	Tırnak	K143R* E266D S412T R469K V488I*
H2	Ağız	K143R* E266D S412T R469K V488I*
H3	Ağız	D116E E266D G464S* G465S*
B	Ağız	K143R* E266D V488I*
960	İdrar	D116E L280F L281M S284I
1978	Kateter	D116E E266D
348	Vajen	D153E
93-05	Kan	-
533	Kateter	E266D
565	Balgam	E266D L281Y I282D T285H
644	Balgam	E266D
1221	İdrar	-
1453	Balgam	D116E
2157	Kan	V437I

* Literatürde azol direncinden sorumlu olduğu bildirilen mutasyonlar⁹.

yon yöntemi ile çalışıldı¹¹. Sonuçlar 35°C'de FLU için 24 ve 48 saat, diğer antifungaller için 48 saat inkübasyon sonrası gözle ve spektrofotometrik olarak değerlendirildi. AMP-B için üremenin tam inhibe olduğu, 5-FC ve azoller için üreme kontrole göre bulanıklığın belirgin ($\geq 50\%$) olarak azaldığı kuyucuktaki konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi¹¹. FLU MİK değerleri $> 64 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanan suşlar aynı yöntemle 2-1024 $\mu\text{g/ml}$ FLU konsantrasyonu aralığında da çalışıldı. Klinik direnç sınır değeri olarak, FLU için $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ dirençli (R), $4 \mu\text{g/ml}$ doza bağımlı duyarlı (DBD) ve $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ duyarlı (S); AMP-B için $> 1 \mu\text{g/ml}$ R, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ S; 5-FC için $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ R, $8-16 \mu\text{g/ml}$ orta duyarlı, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ S; ITZ ve KTZ için $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ R, $0.25-0.5 \mu\text{g/ml}$ DBD, $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ S; VOR için $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ R, $2 \mu\text{g/ml}$ DBD, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ S ve CLT için $> 1 \mu\text{g/ml}$ R kabul edildi¹¹⁻¹⁵. FLU-R olarak belirlenen suşlarda, kısmi inhibisyon etkisi gösteren bir üreme olup olmadığını belirlemek amacıyla, suşlar, mayanın kalsinörin aktivasyon yolağını bloke ederek, kısmi inhibisyon etkisini inhibe eden $0.5 \mu\text{g/ml}$ siklosporin A (Sigma) içeren ve içermeyen maya özütü pepton dekstrozu (YEPD; Yeast Extract Peptone Dextrose) agarda FLU E-test (bioMérieux, ABD) ile incelendi^{16,17}.

CDR1, *CDR2* ve *MDR1* gen ekspresyon düzeylerinin saptanması amacıyla, öncelikle sıvı maya kültürlerinden YeaStar RNA Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı ve RNA'lar, 2U DNaz (AppliChem) ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi¹⁸. Daha sonra $1 \mu\text{g}$ RNA, "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche Applied Science, Almanya) kullanılarak, cDNA sentezine alındı. cDNA'lara, araştırılacak genlere özgül primer ve probler (Tablo II) ile "LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit" (Roche, Almanya) kullanılarak, "LightCycler 2.0" cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulandı¹⁸. Gen ekspresyonları "LightCycler" bilgisayar yazılımı

Tablo II. Gerçek Zamanlı PCR'de Kullanılan Primer ve Problar

Gen	Primer/Prob*	Dizi (5'→3')
<i>ACT1</i>	İleri öncül	CCAGCTTTCTACGTTTCC
	Geri öncül	CTGTAACCACGTTTCAGAC
	Verici prob	CGGTATTGTTTGGATTCTGGTG
	Alıcı prob	TGGTGTTACTCACGTTGTTC
<i>CDR1</i>	İleri öncül	AAGAGAACCATTACCAGG
	Geri öncül	AGGAATCGACGGATCAC
	Verici prob	CAAGACCAGCATCTCCATATACTGTAT
	Alıcı prob	ATTCTTTATGCAAGTGAGGTATGGTG
<i>CDR2</i>	İleri öncül	ATGCTGATGCCCTAGT
	Geri öncül	GCTTCCTTAGGACATGG
	Verici prob	ATTGTTGTTATTCTTAGATGAACCAACTTCAG
	Alıcı prob	TTAGATTCTCAAAGTGCCTGGTGC
<i>MDR1</i>	İleri öncül	GGAGTTTAGGTGCTGT
	Geri öncül	CGGTGATGGCTCTCAA
	Verici prob	GCCAGTTGGAGATGGACT
	Alıcı prob	TTGGTTCATGTGTATCATTTCTG

* Verici problar, 3' ucundan "florescein" ile işaretlidir. Alıcı problar, 5' ucundan "LightCycler Red 640" ile işaretlidir ve 3' ucu fosforillenmiştir.

kullanılarak gene özgül standart eğrilere göre ölçüldü. İzolatların üçer reaksiyondan elde edilen ortalama hedef gen ekspresyonu, ortalama *ACT1* gen ekspresyonuna oranlanarak normalize edildi¹⁸ ve duyarlı ATCC 14053 suşu ile karşılaştırıldı. Veriler SPSS v.15.0 bilgi-sayar yazılımı kullanılarak Mann-Whitney U testi ile analiz edildi.

BULGULAR

Suşların FLU, 5-FC, AMP-B, ITZ, KTZ, MCZ, CLT ve VOR MİK değerleri Tablo III'te görülmektedir. Mikrodilüsyon yöntemi ile 48 saat inkübasyon sonrası 9 izolat FLU-R, 6 izolat ise FLU-S olarak değerlendirilmiştir. Kırk sekizinci saatte yapılan değerlendirmede, $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ MİK değerleri ile FLU-R olduğu düşünülen suşların (813, 1978, 348, 93-05), 24. saatte yapılan değerlendirmede duyarlı oldukları görülmüştür. Bu 4 suş, siklosporin A içeren ve içermeyen E-test yönteminde de düşük MİK değerlerine sahip olduğundan, "kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı (S-KİE)" suşlar olarak kabul edilmiştir. Buna göre çalışmaya alınan 5 izolat (H1, H2, H3, B ve 960) FLU-R olarak belirlenmiştir (Tablo III).

Tüm suşların AMP-B'ye duyarlı ve bir izolat hariç tümünün CLT'ye de duyarlı olduğu gözlenmiştir. Beş FLU-R suşun 3'ü 5-FC'ye dirençli, 2'si orta duyarlı; kısmi inhibisyon etkisi (KİE) gösteren 4 suşun 3'ü 5-FC'ye dirençli ve duyarlı suşların ise biri hariç tümü 5-FC'ye orta duyarlı olarak bulunmuştur. FLU-R suşların, biri hariç tümünün ITZ ve KTZ'ye dirençli olduğu, MCZ MİK değerlerinin ise $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ olduğu izlenmiştir. FLU-S suşların KTZ'ye duyarlı, ITZ'ye doza bağlı duyarlı (DBD) olduğu; FLU-R ve FLU-S suşların ise VOR'a duyarlı olduğu belirlenmiştir. FLU'ya kısmi inhibisyon gösteren suşlar arasında, FLU dışındaki azollere karşı görülen yüksek MİK değerleri dikkati çekmiştir.

İzolatların *ACT1*'e göre normalize edilmiş *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* ekspresyon düzeylerinin, ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla değerlendirilmesi ile ilgili veriler Tablo IV'te sunulmuştur. *CDR1* ve *CDR2* genlerinin FLU-R suşlar arasında H3 ve B'de daha yüksek (ATCC suşuna göre 28.4 ve 32 kat *CDR1*; 33.9 ve 47.2 kat *CDR2*) olmakla birlikte, tümünde fazla eksprese edildiği belirlenmiştir. S-KİE *C.albicans* suşlarında da orta düzeylerde (ATCC suşuna göre 1.8-5 ve 2.5-4.2 kat) yüksek *CDR1/2* ekspresyonu izlenmiştir. FLU-S 2 suшта (1453, 2157) kısmen yüksek, diğerlerinde ise orta/düşük düzeylerde *CDR1/2* ekspresyonu saptanmıştır. *CDR1* ve *CDR2* ekspresyon düzeylerinin aynı suş için tüm izolatlarda paralel olduğu gözlenmiştir.

FLU-R suşlar arasında H1 suşunda yüksek (ATCC suşuna göre 33.3 kat), H2, B ve 960 no'lu izolatlarda ise düşük düzeyde *MDR1* fazla ekspresyonu belirlendi. En yüksek *MDR1* ekspresyonu (ATCC suşuna göre 103.9 kat) 813 no'lu S-KİE *C.albicans* suşunda saptanmıştır. Bu grupta yer alan diğer suşların *MDR1* genini orta düzeylerde eksprese ettikleri görülmüştür. FLU-S suşlarda, 1453 ve 565 no'lu suşlar dışında, düşük/çok düşük düzeyde *MDR1* ekspresyonu tespit edilmiştir (Tablo IV).

Çalışmamızda, FLU-R, S-KİE ve FLU-S *C.albicans* suş grupları arasında atım pompa genlerinin ekspresyon düzeyleri açısından fark olduğu gözlenmesine rağmen, yapılan istatistiksel analizde bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Tablo III. *C. albicans* İzolatlarının Antifungal Duyarlılıkları

Tablo III. <i>C. albicans</i> İzolatlarının Antifungal Duyarlılıkları													
İzolat no	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (µg/ml)												
	FLU				Duyarlılık kategorisi	5-FC	AMP	ITZ	KTZ	MCZ	CLT	VOR	
	Mikrodilüsyon yöntemi		E-Test										
	24 saat	48 saat	YPD-C ⁽⁻⁾	YPD-C ⁽⁺⁾									
H1	64	64	> 256	> 256	R	32	1	4	4	> 64	1	0.125	
H2	32	16	48	64	R	32	1	2	2	64	0.125	0.03	
H3	32	32	96	128	R	16	0.500	2	2	64	0.125	0.125	
B	32	32	64	64	R	32	1	1	2	> 64	0.250	0.125	
960	8	8	-	-	R	16	0.500	0.250	0.030	8	0.250	0.06	
813	0.5	> 1024	2	1.5	S-KIE	0.125	0.5	> 16	16	64	4	> 16	
1978	0.25	1024	0.5	0.5	S-KIE	32	1	> 8	> 16	> 64	0.500	> 16	
348	0.25	1024	0.5	0.5	S-KIE	32	0.500	2	2	> 64	0.250	> 16	
93-05	0.25	1024	1.5	0.5	S-KIE	64	1	0.500	0.500	0.125	0.250	> 16	
533	0.125	0.500	-	-	S	16	0.500	0.250	0.030	2	0.125	0.03	
565	0.125	0.500	-	-	S	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03	
644	0.125	0.250	-	-	S	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03	
1221	0.125	0.125	-	-	S	16	0.500	0.250	0.030	8	0.125	0.03	
1453	0.125	0.250	-	-	S	16	0.500	0.500	0.030	4	0.125	0.03	
2157	0.125	0.250	-	-	S	32	1	0.500	0.060	16	0.250	0.03	
FLU: Flukonazol, 5-FC: 5-flusitozin, ITZ: İtrakonazol, KTZ: Ketokonazol, MCZ: Mikonazol, CLT: Klotrimazol, VOR: Vorikonazol, AMP: Amfoterisin-B, R: Dirençli, S: Duyarlı, KIE: Kısmi inhibisyon etkisi, YEPD: Maya özü pepton dektroz agar, YEPD-C ⁽⁻⁾ : Siklosporin-A içermeyen agar, YEPD-C ⁽⁺⁾ : Siklosporin-A içeren YEPD agar, (-): Test edilmеди.													

FLU: Flukonazol, 5-FC: 5-flusitozin, ITZ: İtrakonazol, KTZ: Ketokonazol, MCZ: Mikonazol, CLT: Klotrimazol, VOR: Vorikonazol, AMP: Amfoterisin-B, R: Dirençli, S: Duyarlı, KIE: Kısmi inhibisyon etkisi, YEPD: Maya özü pepton dekstroza agar, YEPD-C⁽⁻⁾: Siklosporin-A içermeyen agar, YEPD-C⁽⁺⁾: Siklosporin-A içeren YEPD agar, (-): Test edilemedi.

Tablo IV. Çalışmaya Alınan İzolatların *C. albicans* ATCC 14053 Suşuna Kıyasla CDR1, CDR2 ve MDR1 Ekspresyon Oranları (EO)

İzolat no	FLU duyarlılık kategorisi	ATCC suşuna göre CDR1 EO $\pm$ SS	CDR1 - EO grup ortalaması	ATCC suşuna göre CDR2 EO $\pm$ SS	CDR2 - EO grup ortalaması	ATCC suşuna göre MDR1 EO $\pm$ SS	MDR1 - EO grup ortalaması
H1	R	4.6 $\pm$ 0.5	14.1	4.0 $\pm$ 0.1	18.3	33.3 $\pm$ 4.9	7.8
H2	R	4.0 $\pm$ 0.5		3.7 $\pm$ 0.2		1.7 $\pm$ 0.2	
H3	R	28.4 $\pm$ 4.9		33.9 $\pm$ 2.3		1.0 $\pm$ 0.1	
B	R	32.0 $\pm$ 5.7		47.2 $\pm$ 2.0		1.7 $\pm$ 0.3	
960	R	1.6 $\pm$ 0.4		2.6 $\pm$ 0.2		1.2 $\pm$ 0.1	
813	S-KİE	5.0 $\pm$ 0.6	3.3	4.2 $\pm$ 0.1	3.2	103.9 $\pm$ 6.9	30.2
1978	S-KİE	2.9 $\pm$ 1.1		2.5 $\pm$ 0.5		3.5 $\pm$ 0.8	
348	S-KİE	3.6 $\pm$ 1.5		2.7 $\pm$ 0.5		7.6 $\pm$ 0.7	
93-05	S-KİE	1.8 $\pm$ 0.5		3.2 $\pm$ 0.8		5.7 $\pm$ 0.5	
533	S	1.2 $\pm$ 0.3	2.4	2.6 $\pm$ 0.2	4.0	1.4 $\pm$ 0.2	2.9
565	S	2.2 $\pm$ 0.6		2.6 $\pm$ 0.3		8.8 $\pm$ 1.6	
644	S	1.3 $\pm$ 0.2		1.6 $\pm$ 0		0.2 $\pm$ 0	
1221	S	0.6 $\pm$ 0.1		1.6 $\pm$ 0.1		1.6 $\pm$ 0.1	
1453	S	4.2 $\pm$ 1.1		8.4 $\pm$ 0.6		4.7 $\pm$ 0.6	
2157	S	4.8 $\pm$ 0.8		7.1 $\pm$ 0.3		0.4 $\pm$ 0	
DSY289	R (K)	17.3 $\pm$ 3.2	-	20.1 $\pm$ 1.6		1.0 $\pm$ 0.1	
DSY292	R (K)	0.8 $\pm$ 0.1	-	0.1 $\pm$ 0		19.0 $\pm$ 1.5	
ATCC14053	S (K)	1.0	-	1.0		1.0	

FLU: Flukonazol; R: Dirençli; S: Duyarlı; KİE: Kısmi inhibisyon etkisi; EO: Ekspresyon oranı; SS: Standart sapma; K: Kontrol; DSY289: Yüksek CDR1/2 ekspresyonu yaptığı bilinen FLU-R kontrol suşu; DSY292: Yüksek MDR1 ekspresyonu yaptığı bilinen FLU-R kontrol suşu.

TARTIŞMA

Flukonazolün yaygın ve tekrarlayan kullanımı sonucunda *C. albicans* suşlarında ortaya çıkan direnç, farklı mekanizmalarla gelişebilmekte ve bunlar aynı suшта birarada bulunabilmektedir. Bu ilaca dirençli (R) ve doza bağlı duyarlı (DBD) *C. albicans* izolatlarının %85'inde atım pompalarının fazla ekspresyonu, %65'inde *ERG11* geni mutasyonları ve %35'inde *ERG11* geninin fazla ekspresyonu direnç mekanizmaları olarak belirlenmiş; pompaların fazla ekspresyonunun en yaygın direnç mekanizması olduğu vurgulanmıştır⁸. Çalışmamızda FLU-R izolatların ortalama *CDR1* ve *CDR2* gen ekspresyon düzeyleri, kısmi inhibisyon etkisi (KİE) gösteren ve duyarlı (S) suşlardan yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Lee ve arkadaşlarının¹⁹ bulguları ile paralellik göstermektedir. KİE gösteren ve S suşların ise benzer *CDR* ekspresyon düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. FLU-R suşlar arasında başta H1 olmak üzere H2, B ve 960 no'lu suşlarda *MDR1* fazla ekspresyonu saptanmış olup, ortalama *MDR1* gen ekspresyon düzeyleri KİE gösteren suşlarda, R ve S suşlara göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bunun nedeninin 813 no'lu suşun ATCC kontrol suşuna göre, 104 kat *MDR1* ekspresyonu göstermesi olduğu düşünülmüştür.

Kısmi inhibisyon etkisi gösteren izolatların, atım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyonlarını R/DBD suşlara göre farklı bir yolla kontrol ettikleri bildirilmiş, ancak bu farklılık açıklık kazanmamıştır¹⁹. Sıvı mikrodilüsyon testlerinde MİK'in üzerindeki azol konsantrasyonlarında azalmış ancak sürekli bir üreme profili sergileyen bu izolatların R'den ziyade S olarak sınıflandırılması gerektiği bildirilmiştir¹⁹. Çalışmamızda uygulanan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile inkübasyonun 48. saatinde dirençli olarak saptanan dört suşun (813, 1978, 348, 93-05) 24. saatte duyarlı olduğu görülmüştür. Siklosporin A içeren ve içermeyen besiyerlerinde yapılan FLU E-test yöntemlerinde de, düşük MİK değerleri gözlenen bu suşların aslında R olmadıkları ve KİE gösteren S suşlar olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, HIV ile enfekte hastalardan soyutlanmış FLU-R *C. albicans* izolatlarının ATCC 10231 kontrol suşuna göre 1.6-8 kat *CDR1* ve 3.7-52 kat *CDR2* geni fazla ekspresyonu yaptığı bildirilmiştir²⁰. Çalışmamızda FLU-R izolatların ATCC 14053 kontrol suşuna kıyasla 1.6-32 kat *CDR1*, 2.6-47.2 kat *CDR2* fazla ekspresyonu saptanmış ve suşlarımızın *CDR1* ve *CDR2* gen ekspresyon düzeylerinin paralel olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem Chen ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında da rapor edilmiş olup, bu iki genin birlikte düzenlendiğini göstermektedir. Araştırmamızda yapılan istatistiksel analiz sonucunda *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* ekspresyonları açısından FLU-R, S-KİE ve FLU-S *C. albicans* suşları arasında anlamlı bir fark saptanmamış olup, bu sonucun gruplarımızdaki suş sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışmanın en önemli kısıtlılığı FLU-R/DBD suş sayısının az olması olup, bu durum FLU direnç oranının düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Daha önce Manastır ve arkadaşlarının⁹ aynı *C. albicans* suşları ile yaptığı bir çalışmada, *ERG11* geni mutasyonları araştırılmış olup, FLU'ya direnç gelişiminde rolü olduğu bildirilmiş K143R, G464S, G465S ve V488I ile dirençte rolü kesin olmayan D116E, D153E, E266D, S412T ve R469K mutasyonları saptanmıştır. Araştırmamızda, H1, H2, B suşlarında K143R ve V488I mutasyonuna ek olarak *CDR1/2*, *MDR1* fazla ekspresyonunun; H3 suşunda G464S, G465S mutasyonu ile birlikte *CDR1/2* fazla ekspresyonunun FLU

direncinde rolü olduğu görülmüştür. 960 no'lu suşta ise sadece düşük düzeyde *CDR1/2* ve *MDR1* ekspresyonu saptanmış olup, bu suşun diğer R suşlara göre daha düşük bir FLU MİK değerine sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Başta bu suşta olmak üzere tüm dirençli izolatlarda *ERG3* geni mutasyonları gibi ergosterol biyosentez yolağındaki diğer genlerin olası genetik değişimleri ile ilişkili başka mekanizmaların da dirence katkısı olabileceği unutulmamalıdır.

İnceleyebildiğimiz kadarıyla, Türkiye'de *C.albicans* izolatlarında FLU direnç mekanizmalarına ilişkin yayınlanan tek çalışma, bu suşlarda *ERG11* genindeki nokta mutasyonlarının incelendiği araştırma⁹ olup, bu araştırmamız ise önceki çalışmayı tamamlar niteliktedir. Bu veriler ışığında, çalışmaya alınan FLU-R *C.albicans* suşlarında, *ERG11* genindeki K143R, G464S, G465S ve V488I mutasyonları⁹ ile birlikte *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* fazla ekspresyonlarının dirençten sorumlu önemli mekanizmalar olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra kısmi inhibisyon etkisi gösteren suşlarda da atım pompa genlerinin ekspresyonlarının bu etkide rolü olabileceği düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(2): 142-51.
2. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; 48(1): 1-12.
3. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 2008; 12(1): 204-12.
4. Erdem I, Ozgultekin A, Inan AS, et al. Bloodstream infections in a medical-surgical intensive care unit: incidence, aetiology, antimicrobial resistance patterns of gram-positive and gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(10): 943-6.
5. Pfaller MA, Diekema, DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-63.
6. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48(5): 503-35.
7. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(2): 73-85.
8. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(10): 2676-84.
9. Manastır L, Ergon MC, Yucesoy M. Investigation of mutations in *Erg11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* 2011; 54(2): 99-104.
10. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(11): 2378-86.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 3rd ed. CLSI Document M27-A3, 2008. CLSI Wayne, PA.
12. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; 13(6): 180-95.

13. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones, RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(1): 45-50.
14. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 1704-13.
15. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh, TJ. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *Clin Microbiol* 2000; 38(4): 1563-8.
16. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 918-21.
17. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in anti-fungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48(4): 959-76.
18. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5): 2085-93.
19. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 217-24.
20. Chen LM, Xu YH, Zhou CL, Zhao J, Li CY, Wang R. Overexpression of *CDR1* and *CDR2* genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *J Int Med Res* 2010; 38(2): 536-45.