



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ASPERGİLLUS FUMİGATUS*
SUŞLARINDA AZOL DİRENCİNİN SAPTANMASI

Dr. Gülşah Ece ÖZMERDİVEN

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2014



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ASPERGİLLUS FUMİGATUS*
SUŞLARINDA AZOL DİRENCİNİN SAPTANMASI

Dr. Gülşah Ece ÖZMERDİVEN

Danışman: Prof. Dr. Beyza ENER

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2014

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
Giriş	
I. <i>Aspergillus</i> türlerinin morfolojik yapısı	1
II. <i>Aspergillus</i> türlerinin taksonomisi	4
III. <i>Aspergillus</i> türlerinin oluşturduğu hastalıklar	5
IV. İnvazif aspergillozların epidemiyolojisi	6
V. İnvazif aspergilloz tedavisinde kullanılan azol grubu ilaçlar	6
VI. Azol direncinin in-vitro saptanması	13
VII. <i>A. fumigatus</i> izolatlarında azol direncinin ortaya çıkışı ve epidemiyolojik veriler	13
Gereç ve Yöntem	
I. Çalışma suşları	18
II. Azol direncinin belirlenmesi için tarama testi	18
III. In-vitro antifungal duyarlılık testleri	19
IV. Azol direnç mekanizmasının belirlenmesi	20
Bulgular	
I. Azol dirençli suşların belirlenmesi ve epidemiyolojik veriler	25
II. Azol direncine yol açan <i>cyp51A</i> mutasyonları	28
Tartışma ve Sonuç	31
Kaynaklar	35
Teşekkür	43
Özgeçmiş	44

ÖZET

Aspergillus enfeksiyonları özellikle immun baskılanmış hastalarda önemli mortalite ve morbidite nedeni olup, *A. fumigatus* hava yolu ile bulaşan en önemli enfeksiyon etkenidir. Azoller bu enfeksiyonlardan korunmada ve tedavide en fazla tercih edilen ilaçlardır. Ancak, *A. fumigatus* izolatları arasında artan oranda azol direncine, çok sayıda ülkede rastlanılmıştır. Azollerin klinikte yaygın kullanımı veya çevresel azol fungusitlere maruz kalma, kazanılmış azol direncinin olası sebeplerindedir. Azol direncinde en sık bildirilen mekanizma, ergosterol sentezinde rol alan 14- α -demetilaz enzimini kodlayan *cyp51A* genindeki mutasyonlardır. Bu çalışmada da, 1999-2012 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. fumigatus* suşlarında azol direncinin sıklığı ve dirence sebep olan *cyp51A* genindeki mutasyonlar araştırılmıştır.

Araştırmaya, 419 hastadan izole edilen 746 *A. fumigatus* suşu alındı. Tüm suşlar 4mg/L itrakonazol (ITZ) içeren Sabouraud's dekstroz agara ekilerek ITZ direnci açısından tarandı. ITZ içeren agarda üreyen suşların, ITZ'ye, vorikonazole (VOR) ve amfoterisin B'ye (AMB) in vitro duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI M38A) referans metodu kullanılarak değerlendirildi. PCR amplifikasyonu sonrası, mutasyonları belirlemek için tüm in vitro azol dirençli suşların *cyp51A* gen ve promotor bölgelerinin dizi analizi yapıldı.

Tarama testleri ile *A. fumigatus* suşlarında ITZ direnci %10,2 (76/746) olarak bulundu. Dirençli suşlara 2000 yılından sonra hemen hemen her yıl (2005 hariç) rastlandı ve en yüksek direnç oranı (%24,6) 2007 yılında görüldü. İn-vitro duyarlılık testleri ile tüm suşlar AMB'ye duyarlı iken, ITZ ve VOR'e dirençli bulundu. *cyp51A* gen ve promotor bölgenin dizi analizi ile suşların %86,8'inde (66 izolat) TR34/L98H mutasyonu olduğu saptandı.

Bu çalışma ile klinik izolatlar arasında azol dirençli *A. fumigatus* suşlarının bulunduğu ve bu suşlardaki esas direnç mekanizmasının zirai

fungisitlerle çapraz reaksiyon sonucu oluştuğu bilenen TR34/L98H mutasyonu olduğu gösterildi. Bu alışma TR34/L98H mutasyonunun ülkemizde gösterildiği ilk çalışma olup, 2000 yılından bu yana görülmektedir. Bu nedenle, bu bulgunun azol birleşikleri kullanırken akılda bulundurulması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus fumigatus*, azole direnci, *cyp51A* dizisi.

SUMMARY

Determination of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Strains Isolated from Patient Samples

Aspergillus infections are an important cause of mortality and morbidity especially in immunocompromised hosts, and *Aspergillus fumigatus* is one of the most prevalent airborne fungal pathogens causing infection. Azoles are the drugs of choice for prophylaxis and treatment of these infections. Recently, an increasing frequency of azole resistant *A. fumigatus* isolates has been described in different countries. Acquired resistance to azoles is possibly, due to widespread clinical use of azoles or through exposure to azole fungicides in the environment. The most commonly reported mechanism conferring azole resistance is the mutation of *cyp51A* gene which encodes 14- α -demethylase, the enzyme that has an important role in synthesis of ergosterol. In this study, we investigated the frequency of azole resistance among *A. fumigatus* isolates collected between 1999 and 2012 from clinical specimens and identified mutations in the *cyp51A* gene.

Seven hundred and forty-six *A. fumigatus* isolates, collected from 419 patients were investigated. All isolates were screened for resistance to itraconazole (ITZ) by subculturing on Sabouraud's dextrose agar that contained 4 mg/L ITZ. For isolates that grew on ITZ containing agar, the in vitro activities of amphotericin B (AMB), itraconazole and voriconazole (VOR) were determined by using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M38-A) reference method. After PCR amplification, *cyp51A* gene and its promoter region of all in-vitro azole resistant isolates were sequenced to determine the mutations.

ITZ resistance was found in 10.2% (76/746) of *A. fumigatus* isolates. From the year 2000 onwards, patients were observed annually with an ITZ-

resistant isolate (except 2005), with a maximum prevalence (24.6%) in 2007. According to in vitro susceptibility tests, AMB exhibited a good activity against all of them where as ITZ and VOR were resistant. Sequence analysis of the promoter region and *cyp51A* gene indicated the presence of TR34/L98H in 86.8% (66 isolates) of isolates.

This study revealed the presence of azole resistance in our clinical isolates and the dominance of the TR34/L98H resistance mechanism supported the environmental route of cross-resistance to certain agriculture azole fungicides. This is the first study that shows TR34/L98H mutation in Turkey and azole resistance has emerged since 2000. Thus, it is important to keep these results in mind while using the azole compounds.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, azole resistance, *cyp51A* sequence.

GİRİŞ

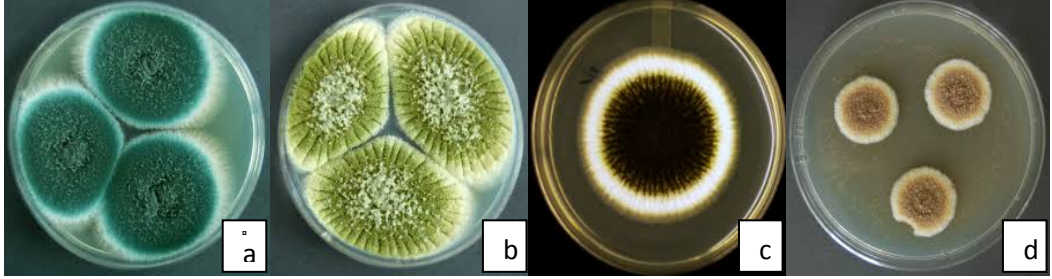
Mantarlar doğada yaygın olarak bulunan kemoheterotrof ökaryotik canlılardır. Eşeyli ve eşeysiz sporları ile çoğalan bu canlılar esas olarak bitkilerde hastalık oluşturur (1,2). Hava, su ve toprak florasında bol miktarda bulunan mantarlarla devamlı karşılaşılma ile beraber, bağışıklık sistemi sağlıklı bireyler mortal ve morbit seyreden invazif fungal enfeksiyonlara (İFE) karşı doğal savunma gösterir (3). Nötropenik hastalar, yoğun bakım hastaları, malignitesi olanlar, solid organ veya kemik iliği alıcıları gibi kritik hastalar İFE açısından risk altındadır (4). *Candida* türleri, *Aspergillus* türleri, *Cryptococcus neoformans* ve *Mucorales* takımı mantarlar İFE’de en sık görülen etkenlerdir. *Candida* ve *Aspergillus* türleri tüm fungal enfeksiyonların %90’ına yakın bir kısmını oluşturur (5). Normal florada bulunan *Candida* türleri daha çok endojen fırsatçı enfeksiyonlara yol açarken, *Aspergillus* türleri hava, toprak ve kompost (çeşitli bitki ve hayvan artıklarının belirli bir metoda göre çürütülmesi ile oluşan besin değeri yüksek gübre) yapısında bol miktarda bulunan sporların inhalasyonu ile hastalıklara yol açar. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* ve *A. niger* en sık karşımıza çıkan türlerdir. Bunlar arasında *A. fumigatus*, solunum yolu ile bulaşarak enfeksiyona sebep olan fungal patojenler arasında ilk sırada yer alır (5).

I. *Aspergillus* Türlerinin Morfolojik Yapısı

Doğada saprofitik olarak yaygın bulunan *Aspergillus* türleri, ilk kez rahip ve botanik bilimci olan Pier Antonio Micheli tarafından 1729 yılında “Nova Plantarum Genera” adlı kitapta tanımlanmıştır (6,7). Bu isim, *Aspergillus* türlerinin mikroskopik morfolojisinin “aspergere” denilen kutsal suyu yağmur gibi dağıtmaya (sprinkling) yarayan alete benzetilmesi nedeniyle verilmiştir.

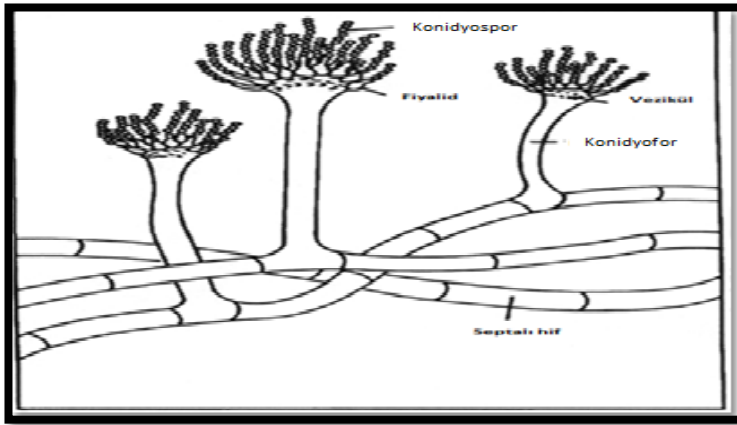
Aspergillus türleri çok çeşitli besiyerinde aerobik olarak 48-72 saatte küf morfolojisinde üreyen mantarlardır. Çoğu türün kolonisi tozlu granüler bir

yapıda olup, türe ve besiyerinin çeşidine göre farklı farklı renklerde görülür (8,9). Koyu yeşil, fıstık yeşili, sarı, siyah ve krem çeşitli türlerin oluşturduğu koloni renkleridir (Şekil-1).



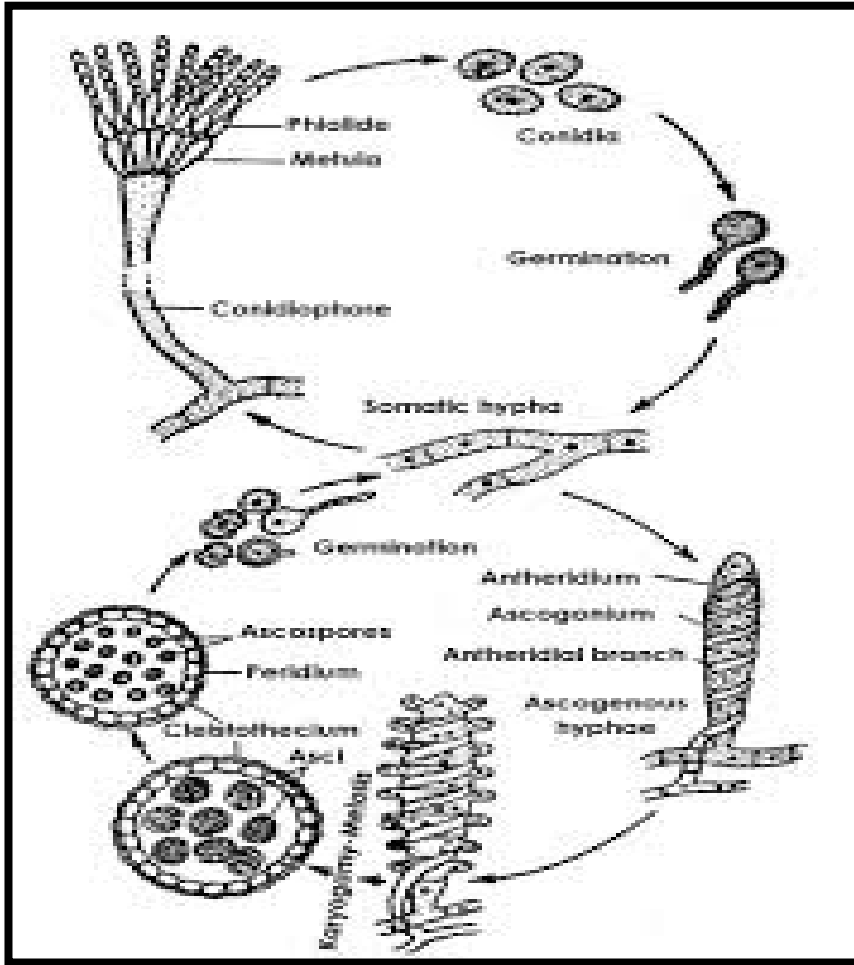
Şekil-1: Değişik *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu koloni morfolojileri. a: *A. fumigatus*, b: *A. flavus*, c: *A. niger*, d: *A. terreus*.

Mikroskobik morfolojisi ise hifler ve spordan oluşmuştur. Hifler septalı (bölmeli) olup, 45 derece açı ile dikotom dallanma (dallanma öncesi ve sonrası hif çaplarının aynı olması) gösterir. Eşaysiz üreme sırasında hiflerden bir tanesi konidya (eşaysiz spor) oluşturmak üzere özelleşerek konidyofor adını alır. Uzayan konidyoforun uç kısmı türe göre konik, küresel veya oval şekillerde genişler ve vezikül oluşur. Veziküllerden fiyalidler (konidya oluşturan hücreler) meydana gelir ve fiyalidler blastik (tomurcuklanma) şekilde konidyalari doğurur (Şekil-2). Bazı türlerde fiyalidler metula adı verilen bir hücre tabakasından sonra oluşur ve bu şekilde olanlar biseriate (iki sıralı) adını alır (8,9).



Şekil-2: *Aspergillus* türlerine özgü hif ve eşaysiz üreme ile gelişen spor yapıları.

Aspergillus türlerinde eşeysiz çoğalan hücreler haploid sayıda kromozoma sahiptir ve uygun koşullarda bir başka haploid kromozomlu hücre ile karşılaşır ve birleşebilir. Önce plazmogami ve daha sonra karyogami oluşarak diploid yapı meydana gelir. Mayotik bölünme sonrası bir kese içinde (askus) tekrar haploid yapıdaki sporlar (askospor; eşeyli üreme sonucu oluşan spor) oluşur ve kesenin açılmasıyla bunlar etrafa dağılarak eşeysiz döngüyü tekrar başlatır (2,8,9). Askus ve askosporlar dış koşullara daha dirençli ve tanımlamada önemli yapılar olmakla beraber, sık görülmezler ve laboratuvar koşullarında oluşturulmaları zordur. Bu nedenle laboratuvarlarda morfolojik tanımlama, koloni yapısı ve hif ve eşeysiz sporların mikroskopik görünümüne göre yapılır. Şekil-3'de *Aspergillus* türlerinin eşeysiz ve eşeyli üreme döngüleri görülmektedir.



Şekil-3: *Aspergillus* türlerinde eşeyli ve eşeysiz yaşam döngüleri.

II. *Aspergillus* Türlerinin Taksonomisi

Aspergillus türlerinin teleomorfları (eşeyli üreyen şekiller), *Ascomycota* bölümü *Euscomycetes* sınıfı *Eurotiales* takımı *Trichocomaceae* ailesi içinde çeşitli cinslerde yer almaktadır (Tablo-1). Ancak pratik yaşamda askosporları oluşturmak kolay değildir ve ayrıca, teleomorfik cins isimleri hekimler tarafından tanınmayan ve bilinmeyen isimlerdir. Bu nedenle rutin laboratuvarlarda yapay sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre *hyphomycetes* sınıfında 184 *Aspergillus* türü bulunmaktadır (2). Günümüzde benzer morfolojik özelliğe sahip olan türler seksiyonlar altında toplanmıştır. Tablo-1’de insanlarda hastalık yapan türlerin oluşturduğu seksiyonlar görülmektedir. Örneğin, *Fumigati* seksiyonunda morfolojik olarak birbiri ile çok benzer 33 farklı tür vardır. İnsanlarda en sık hastalık oluşturan, ısıya dayanıklılık (45-50°C’da üreyebilme) özelliği gösteren *A. fumigatus*’dur. Bununla beraber, *A. lentilus* ve *Neosartorya fischerii* tarafından oluşturulan olgular da nadiren bildirilmiştir (10). Koloni morfolojisi ve mikroskopik benzerlik nedeniyle aynı seksiyon içinde yer alan türlerin kesin ayrımı için moleküler tanımlamaya gerek vardır. Parsiyel beta-tubulin veya kalmodulin sekansları *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında en önemli bölgelerdir (11).

Tablo-1: *Aspergillus* türlerinin biyolojik ve yapay sınıflandırılması.

Biyolojik Sınıflama	Yapay Sınıflama
Mantarlar alemi <ul style="list-style-type: none">• <i>Ascomycota</i> bölümü• <i>Euscomycetes</i> sınıfı• <i>Eurotiales</i> takımı• <i>Trichocomaceae</i> ailesi<ul style="list-style-type: none">✓ <i>Emericella</i> cinsi✓ <i>Eurotium</i> cinsi✓ <i>Fennellia</i> cinsi✓ <i>Neosartorya</i> cinsi✓ <i>Petromyces</i> cinsi	Mantarlar alemi <ul style="list-style-type: none">• <i>Hyphomycetes</i> sınıfı• <i>Fumigati</i> seksiyonu<ul style="list-style-type: none">✓ <i>A fumigatus</i>✓ <i>Neosartorya fischerii</i>✓ <i>A lentilus</i>• <i>Flavi</i> seksiyonu<ul style="list-style-type: none">✓ <i>A flavus</i>• <i>Nigri</i> seksiyonu<ul style="list-style-type: none">✓ <i>A niger</i>• <i>Terrei</i> seksiyonu<ul style="list-style-type: none">✓ <i>A terreus</i>• <i>Nidulantes</i> seksiyonu<ul style="list-style-type: none">• <i>A nidulans</i>

III. *Aspergillus* Türlerinin Oluşturduğu Hastalıklar

Aspergillus türleri hafiften şiddetliye değişebilen ve hatta hayatı tehdit edebilecek bulgularla giden geniş bir hastalık spektrumu oluşturabilir (12). Tablo-2'de *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar özetlenmiştir. Bunlardan invazif aspergilloz (İA) hariç, diğerleri bağışıklık sistemi normal kişilerde de görülebilirken, İA sadece bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülür. Hastalık tabloları arasında İA en tehlikelisi ve mortal ve morbit seyredeni olup, sıklıkla Fumigati seksiyonu içindeki *A. fumigatus* tarafından oluşturulur (13-15).

Tablo-2: *Aspergillus* türlerinin oluşturduğu hastalıklar.

- Toksik hastalıklar
 - Mikotoksinler (ör. Aflatoksin)
- Alerjik hastalıklar (Atopik kişiler ve kistik fibroz gibi hastalığı olanlarda)
 - Alerjik sinüzit
 - Alerjik bronkopulmoner aspergilloz (ABPA)
- Kronik nekrotizan akciğer aspergillozu (CNPA)
 - Yapısal akciğer hastalığı olanlarda (ör. Bronşektazi)
- Lokal enfeksiyonlar
 - Keratit, otit, protez, şant, yara ve cerrahi sonrası gelişen enfeksiyonlar
- Aspergilloma (Mantar topu)
 - Akciğer kavitelerinde
 - Sinüslerde
- İnvazif aspergilloz (Bağışıklığı baskılanmış hastalarda)
 - İnvazif pulmoner aspergilloz
 - İnvazif sinonazal aspergilloz
 - Yaygın (dissemine) aspergilloz

IV. İnvazif Aspergillozların Epidemiyolojisi

Aspergillus türlerine bağlı enfeksiyonlar 1900'lü yılların başına kadar oldukça nadirdir (16). Son üç-dört dekatta modern tıptaki ilerlemelere (antibiyoterapi, radyoterapi ve sitotoksik kemoterapötikler, kemik iliği ve solid organ transplantasyonları ve gelişmiş yoğun bakım koşulları) sekonder olarak İA sıklığında artış olmuştur. Duyarlı hasta gruplarındaki en önemli risk faktörleri derin ve uzamış nötropeni, kortikosteroid kullanımı ve genetik ve yapısal bozukluklardır (17). Young ve ark. (18), 1953-1970 yılları arasında başvuran 98 hastanın değerlendirilmesi ile İA'un bir tedavi komplikasyonu olduğunu ortaya koymuştur. İA açısından en riskli grubu hematolojik malignitesi (%5-24) olanlarla, kemik iliği (%10) ve akciğer nakli (%11-14) yapılanlar oluşturmaktadır (17,19). Kontonyiannis ve ark.'nın (20) yayınladığı 22 merkezden toplam 16.200 kök hücre alıcısı hastayı içeren "Transplant-Associated Infection Surveillance Network" (TRANSNET) çalışmasında, allojen graft alıcılarında İFE olasılığının daha yüksek olduğu (tüm vakaların %78'i) gösterilmiştir. İFE içerisinde ise aspergillozlar %43'lük bir oranla ilk sırayı almış ve *A. fumigatus* lider patojen olarak öne çıkmıştır.

Solunum yolları ve akciğerler İA için esas giriş kapısını oluşturmakta ve hastalık çoğunlukla ateş, nefes darlığı ve öksürükle başlamaktadır. Ancak başlangıç bulgularının İA'a özgü olmaması erken tanıda gecikmeye yol açmakta ve mortalite %70'lere kadar çıkabilmektedir (21). Tanıdaki belirsizliği azaltmak ve ortak bir yaklaşım oluşturmak amacıyla 2002'de bir kılavuz yayınlanmış ve bu kılavuz 2008'de revize edilerek kapsamı genişletilmiştir (22,23).

V. İnvazif Aspergilloz Tedavisinde Kullanılan Azol Grubu İlaçlar

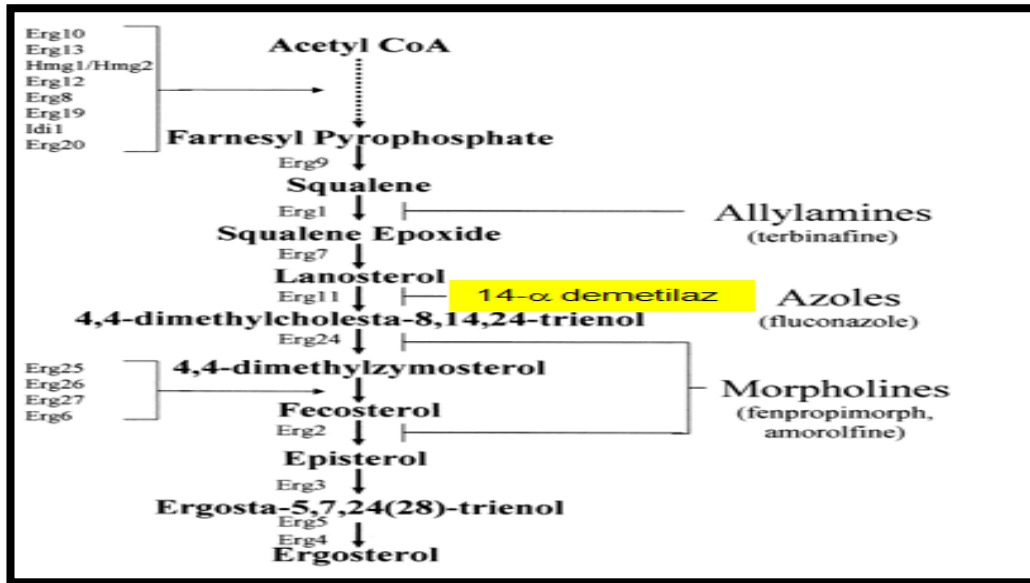
İA tedavisinde esas olan hastanın altta yatan olumsuz durumunu düzeltmektir. Ayrıca uygun olgularda, cerrahi müdahale ve antifungal ajanlar tedavinin önemli ayaklarını oluşturur (6,7,24). Poliyenler (ör. Amfoterisin B), ekinokandinler (ör. Kaspofungin) ve azoller İA tedavisinde kullanılabilen üç

farklı grup antifungal ajandır. Poliyenler, hücre zarı ergosterolüne bağlanarak kanallar oluşturur ve bu kanallardan hücre içi moleküllerin sızması ile mantarların ölümü meydana gelir. Ekinokandinler, 1,3- β -D-glukan sentaz enzimini bloke edip, hücre duvarı β -glukan sentezini bozarak etkili olan antifungallerdir. Azoller ise hücre zarı ergosterol sentezini bozarak etkili olur ve hem parenteral hem de oral olarak kullanılabilen tek ilaç grubu olması açısından daha fazla önem taşır (25-27).

Azol grubu antifungaller imidazoller ve triazoller olmak üzere iki gruba ayrılır. İmidazoller toksik etkileri ve emilimindeki zorluklar nedeniyle genellikle topikal kullanım için uygundur (27,28). Triazoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol) ise invazif enfeksiyonlarda kullanılır. Vorikonazol İA tedavisinde ilk seçenek olarak, pasakonazol ise profilaktik olarak onay almış triazoldür (21,29-33).

V.A. Azollerin Etki Mekanizması

Azoller hücre zarı sentezini bozarak etkili olan antifungal ajanlardır. Şekil-4'de mantar hücre zarı sentezinde yer alan basamaklar, bu basamaklarda görev alan enzimlerin sentezlenmesini sağlayan genler (*erg* genleri) ve sentezin değişik basamaklarının kesilmesine sebep olan antifungal ajanlar görülmektedir (28).



Şekil-4: Mantarlarda hücre zarı sentezi. Azollerin etkili olduğu enzim sarı olarak taranmıştır.

Sitokrom P450 ailesine bağlı bir enzim olan “lanosterol 14- α -demetilaz”, lanosterolün ergosterole dönüşümünde yer alır. Azoller lanosterol 14- α -demetilazı, enzimin ortasında bulunan hem grubundaki azol halkasına nitrojen grupları ile bağlanarak engeller ve böylece mantarlarda hücre zarı oluşumu bozulur. Hücre zarı oluşumunun bozulması ve toksik sterol moleküllerinin (14- α -methyl-3,6-diol) birikmesi ise fungusitik etki ile sonuçlanır. Azol grubu antifungallerin mantar sitokrom P450 enzimlerine afiniteleri, memeli sitokrom P450 enzimlerine afinitelerinden daha fazladır ve bu özelliği dolayısıyla mantar hücre zarına yönelik etki gösterir (34,35).

V.B. Azollere Karşı Gelişen Direnç

Direnç, bir türün suşlarının çoğunda saptanan aralıktan daha yüksek bir konsantrasyonda üremenin engellenmesidir. Belirli bir mantara karşı öncesinde bir ilaç maruziyeti olmaksızın geliştiğinde **primer (intrensek)** direnç, önceden duyarlı olan suşun, belirli bir ajana maruziyeti sonrası direnç kazanmasına ise **sekonder (kazanılmış)** direnç denir. Azoller en yaygın kullanılan antifungal ajanlardır. *Aspergillus* türleri triazollerden flukonazole intrensek dirençli olup, diğerlerine karşı kazanılmış direnç geliştirebilir (26,36).

A. fumigatus, *Aspergillus* türleri arasında kazanılmış direncin en fazla görüldüğü türdür ve bu durum global bir tehdit oluşturmaktadır. Kazanılmış direncin sorumlusu azol maruziyetidir. Azol maruziyeti iki yolla ortaya çıkabilir. Hasta kökenli maruziyet, uzun süre azol grubu antifungal kullanımı sonucu ortaya çıkar. Çevresel maruziyet ise demetilaz inhibitörleri (DMI) olarak adlandırılan azol fungusitlerin tarımda kullanılmasına bağlı gelişir. Hasat öncesi ve sonrasında mahsülü fitopatojenik küflere bağlı mantar hastalıklarından ve bozulmalarından korumak için DMI'ler sık kullanılmaktadır. Kullanılan bu DMI'ler toprakta ve suda uzun süre (bilinen azollerin yarı ömürleri bir yılın üzerinde) bozulmadan kalabilmektedir (37,38). Bu sayede doğada bulunan ve fitopatojen küf mantarları ile aynı ekolojik ortamı kullanan *A. fumigatus* suşları direnç kazanabilmekte ve daha önce hiç azol kullanmamış hastalar bile direkt dirençli suşlarla enfekte olabilmektedir (39). Hastanelerde saksı toprağından, bitki yapraklarından ve tohumlarından

izole edilen *A. fumigatus* suşlarının hem tarımda kullanılan azol fungusitlere hem de itrakonazol, vorikonazol ve posakonazole dirençli olduğu görülmüştür (40-43).

V.C. Azollere Karşı Gelişen Direncin Mekanizması

İlacın hedef bölgesindeki değişimler, ilacın hücre içi konsantrasyonunun azalması ve transkripsiyon faktörlerindeki modifikasyonlar kazanılmış dirençten sorumlu üç temel mekanizmadır (26).

V.C.a. İlacın Hedef Bölgesindeki Değişimler

İlacın hedef bölgesindeki (14- α -demetilaz enzimi) değişim, *A. fumigatus* izolatlarında kazanılmış ilaç direncinin temel mekanizmasını oluşturur (44). *A. fumigatus*'da 14- α -demetilaz enzimini kodlayan *cyp51A* ve *cyp51B* olmak üzere (*Candida* türlerinde *erg11* adını alır) birbiri ile %63 benzerlikte iki homolog gen vardır. Bunlardan *cyp51B* genindeki mutasyonlar dirence yol açmaz (45-46). Buna karşılık, klinik izolatlarda *Cyp51A* bölgesinde çeşitli nokta mutasyonları tanımlanmış ve bu mutasyonların azol direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (47,48). Tablo-3'de azol direncine yol açan ve bugüne kadar saptanmış *Cyp51A* bölgesindeki nokta mutasyonlara bağlı gelişen amino asit değişiklikleri özetlenmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi mutasyonların hepsi itrakonazol direncine yol açarken, vorikonazol ve posakonazol için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin yükselmesine neden olmuştur (47-61). Nokta mutasyonların uzun süre antifungal kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ve daha çok önceden azol kullanmış olan kişilerden izole edilen suşlarda saptanır (6,7,24).

Tablo-3: *Cyp51A* bölgesindeki nokta mutasyonlara bağılı gelişen amino asit değişiklikleri.

Değişen kodonlar	Minimal İnhibitör Konsantrasyon (µg/ml)		
	İtrakonazol	Vorikonazol	Pasokonazol
G54E	>8	0,25-0,5	0,25-1
G54R	>8	0,12-0,5	1
G54V	>8	0,25-1	Belirlenmedi
G54W	>8	0,12-0,5	>8
G138C	>8	4->8	1->8
P216L	>8	1	1
M220I	>8	1	0,5
M220K	>8	1-2	1->8
M220R	>8	2	2
M220T	>8	0,5-1	0,25-0,5
M220V	>8	1-2	0,5-1
Y431C	>8	4	1
G432S	>8	0,5	0,25
G434C	>8	4	1
G448S	>8	>8	0,5-1

cyp51A geninin promotor bölgesindeki 34, 46 ve 53 bazlık rastgele tekrarların da (tandem repeat [TR]) azol direncinde önemli olduğu saptanmıştır. Bu tekrarların, *cyp51A* geninin aşırı ekspresyonuna yol açtığı düşünölmektedir. Ancak, tek başına bu tekrarlar dirençten sorumlu olmayıp, beraberinde aminoasit değişikliğinin de olması gerekir. Promotor bölgede TR34 mutasyonu olan tüm dirençli suşlarda L98H değişikliği de gözlenmiş ve mutasyon TR34/L98H olarak tanımlanmıştır. Tek başına promotor bölgede veya tek başına 98. kodonda mutasyonun olması dirence yol açmamıştır (39,62). Benzer şekilde promotor bölgedeki TR46 mutasyonu her zaman Y121F ve T289A değişikliği ile beraber dirence yol açmış ve TR46/Y121F/T289A olarak isim almıştır (61). Promotor bölgedeki 53 bazlık tekrara her hangi bir aminoasit değişikliği eşlik etmemiştir. Ancak bu mutasyona sahip suşlardan transformasyon ile direnç aktarımı yapılamadığından bunun gerçek anlamda dirençten sorumlu bir mutasyon olduğu şüphelidir (57). Tablo-4'de promotor bölgedeki tekrarların dizileri görölmektedir. Promotor bölgede TR'lerle beraber nokta mutasyonları görölmemesinin birden fazla azolde (multiazole resistant=MAR) dirence sebep olduğu ve esas olarak tarımda kullanılan fungusitler ile çapraz reaksiyon sonucu olduğu düşünölmektedir (6,7,63).

Tablo-4: *cyp51A* geninin promotor bölgesinde azol direncine yol açan rastgele tekrarlar.

WT	CAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTCCTAATTA
TR34	CAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAAT GAAACACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAAT GAAAGTTCCTAATTA
TR46	CAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTG TCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTG CCTAATTA
TR46	CAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAA AGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAA _AGTTGCCTAATTA
TR53	CAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTCCTAA TGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAAAGTTCCTAA TTA

WT: Wild-type; TR: Tandem repeat; Kırmızı ile yazılanlar tekrar bölümleri.

V.C.b. İlacın Hücre İçi Konsantrasyonunun Azalması

İlacın hücre içi konsantrasyonunun azalması dirence neden olan bir diğer mekanizma olup, dışa atım pompasının (efflux pump) aşırı ekspresyonu veya ilacın hücre içine azalmış penetrasyonu ile ilişkilidir. *Candida* izolatlarında azol direncinden sorumlu en önemli mekanizma, dışa atım pompası genlerinin (ATP binding cassette [ABC] genleri ve major facilitator superfamily [MFS] genleri) aşırı ekspresyonudur. *A. fumigatus* suşlarında da dışa atım pompası genleri bol miktarda bulunur. Ancak, aşırı ekspresyonuna bağlı azol direnç mekanizması klinik izolatlarda nadiren tarif edilmiştir ve dışa atım pompasının aşırı ekspresyonunun dirençte aktif rol oynadığı şüphelidir (50,64-67).

Hücre içine penetrasyonunun azalması, ilacın hücre içi konsantrasyonunun azalmasının bir diğer nedenidir. Çok önemli olmayan bir mekanizma olarak düşünülse de bir yayında özellikle üzerinde durulmaktadır (68). Dışa atım pompası veya azalmış penetrasyon ile ilişkili gelişen direnç daha çok laboratuvar suşlarında oluşturulmakta, klinik suşlar arasında yaygın olmadığı düşünülmektedir.

V.C.c. Transkripsiyon Faktörlerindeki Modifikasyonlar

Transkripsiyon faktörlerindeki modifikasyonlar antifungal dirence yol açabilecek bir başka mekanizmadır. *C. albicans*'da, dört transkripsiyon faktöründeki (Tac1, Mrr1, Cap1 ve Upc2) modifikasyonlar ile artmış antifungal direnç arasındaki ilişki gösterilmiştir. Bunlardan Tac1, Mrr1 ve Cap1'deki değişiklik dışa atım pompasını arttırarak etkili olurken, Upc2'deki değişiklik *erg11* (*cyp51* geninin *Candida* türlerindeki karşılığı) geninin aşırı ekspresyonuna yol açarak direnci oluşturur (69-74). Benzer direnç mekanizmasının *A. fumigatus* suşlarında olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir.

VI. Azol Direncinin In-Vitro Saptanması

Aspergillus türlerinde azol direncinin in-vitro belirlenmesinde “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) ve “European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing” (EUCAST) tarafından oluşturulmuş mikrodilüsyon yöntemleri kullanılır (75,76). CLSI yönteminde *Aspergillus* türleri için antifungal ilaçların duyarlılık sınırları (break-point) henüz kesinlik kazanmamış ve epidemiyolojik cut-off değerleri belirlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK’lerin epidemiyolojik dağılımına bakılarak, çoğunluğu (wild-type suşlar) kapsayan en yüksek değer “epidemiyolojik cut-off” olarak kabul edilir. “Epidemiyolojik cut-off” üzerinde MİK değerine sahip olanlar (non-wild-type suşlar) ise dirençli olarak kabul edilir (77,78). EUCAST yönteminde ise *Aspergillus* türleri için antifungal ilaçların duyarlılık sınırları belirlenmiş olup, yakın zamanda yayınlanmıştır (79). Tablo-5’de *A. fumigatus* için üç triazolün CLSI yöntemine göre epidemiyolojik cut-off; EUCAST yöntemine göre ise duyarlılık sınır değerleri görülmektedir.

Tablo-5: *Aspergillus* türleri için üç triazolün epidemiyolojik cut-off ve duyarlılık sınır değerleri.

Antifungal MİK (µg/ml)	CLSI		EUCAST		
	WT	NWT	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
İtrakonazol	≤1	>1	<2	2	>2
Vorikonazol	≤1	>1	<2	2	>2
Posakonazol	≤0,5	>0,5	<0,5	0,5	>0,5

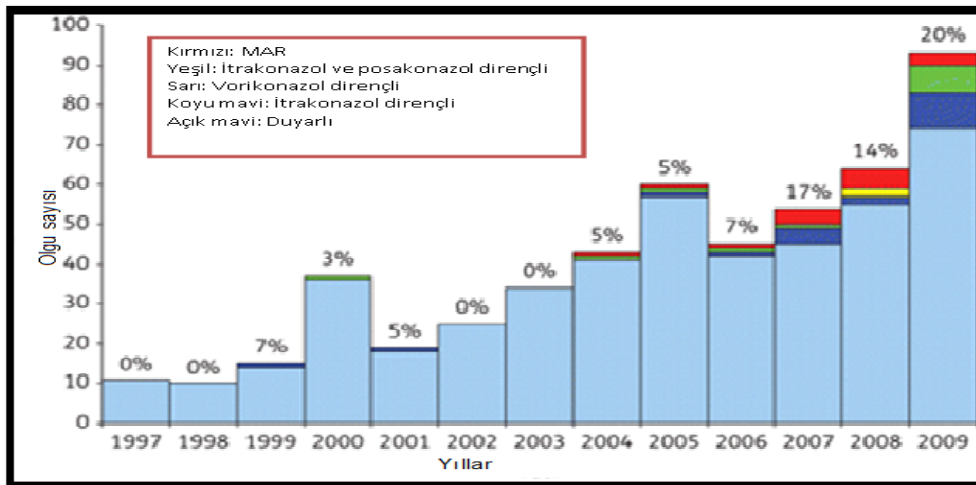
*MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon; WT: Wild-type; NWT: Non-wild-type; CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; EUCAST: European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing.

VII. *Aspergillus fumigatus* İzolatlarında Azol Direncinin Ortaya Çıkışı ve Epidemiyolojik Veriler

Azol direnci hakkındaki epidemiyolojik veriler ampirik tedavi seçiminde, yüksek riskli hasta grubunda profilaktik kullanımda ve kanıtlamış tedavide önemlidir. *Aspergillus* türlerine bağlı hastalıkların tedavisinde azol

bileşenlerinin kullanımı 1984 yılında başlamış olup, ilk kullanılan oral ajan itrakonazoldür (80,81). Daha sonra vorikonazol ve posakonazol kullanıma girmiştir (32,33).

Azol direnci ilk kez 1997 yılında, in-vitro itrakonazole dirençli suşlarla gelişen üç aspergilloz olgusunun bildirilmesi ile gündeme gelmiş ve in vitro dirençli olan suşlar, in-vivo olarak deney hayvanlarında da doğrulanmıştır (82-84). Bu bildirimlerden sonra konu üzerine ilgi artmış olup, *A. fumigatus* kültür koleksiyonlarından yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, doksanlı yılların sonları ve 2000'li yıllara ait izolatlarda dirençli suşlarla karşılaşmıştır (47,60,63,85-89). Hollanda'da yapılan bir çalışmada, 1945-1998 yılları arası klinik örneklerden elde edilen 170 *A. fumigatus* suşunun itrakonazol ve vorikonazol duyarlılığına bakılmış ve itrakonazol MİK'i sadece üç suşta yüksek (>64 µg/ml) olarak saptanmıştır. Suşların hiçbirinde vorikonazol direnci gözlenmemiştir (90). Aynen Hollanda'da olduğu gibi, İngiltere'de yapılan farklı çalışmalarda da 1999 yılı öncesinde, klinik örneklerden elde edilen *A. fumigatus* suşlarında azol direnci gözlenmemiştir. Buna karşı, 1999-2006 yılları arasında direnç oranının %3-7 seviyelerine çıktığı, keskin artışın 2007 yılında olduğu ve bu artışın 2008 ve 2009 yıllarında da devam ettiği saptanmıştır. İlk kez MAR görülmesi ise 2004 yılında gerçekleşmiştir (56,60). Şekil-5'de, İngiltere'deki azol direncinin yıllara göre artışı görülmektedir.



Şekil-5: İngiltere'de azol direncinin yıllar içinde artması. MAR: Multiazol dirençli.

A. fumigatus'da azol direnç sıklığı, geniş kapsamlı güncel çalışmalarda İngiltere'de %5, Hollanda'da ise %6-12,8 olarak bulunmuştur (56,91). Ancak İngiltere ve Hollanda'da tespit edilen azol direncinde, direnç mekanizması ve hasta profilleri açısından fark vardır. Tablo-6'da bu fark özetlenmiştir. Hollanda'da yapılan çalışmalarda dirençli suşların çoğunluğunda (yaklaşık>%90) TR34/L98H mutasyonu saptanmış, suşların tek bir klondan kaynaklanmadığı ve çevreden gelen azol dirençli izolatların hastalıklara yol açtığı bulunmuştur. Tarımda 25'ten fazla azol grubu ilaç kullanıldığı ve bunlardan medikal triazolere moleküler yapısı çok benzeyen propikonazol, bromukonazol, tebukonazol, epoksikonazol ve difenoksikonazole karşı TR34/L98H mutasyonu ile direnç geliştiren *A. fumigatus* suşları olduğu bildirilmiştir (38,92). İngiltere'de ise daha önce azol tedavisi almış hastalarda, nokta mutasyonlarla gelişen direnç oluşumu daha sıktır.

Tablo-6: Hollanda ve İngiltere'de görülen azol direncinin karşılaştırılması.

Nijmegen/Hollanda	Manchester/İngiltere
<ul style="list-style-type: none"> • Olgular çoğunlukla İA ✓ İPA, serbral İA gibi 	<ul style="list-style-type: none"> • Kronik aspergilloz • Aspergilloma • ABPA
<ul style="list-style-type: none"> • Hastaların çoğu daha önce azol kullanmamış 	<ul style="list-style-type: none"> • Öncesinde azol kullanan hastalar
<ul style="list-style-type: none"> • Esas direnç mekanizması ✓ TR34/L98H 	<ul style="list-style-type: none"> • Daha çok nokta mutasyonları ✓ G448S ✓ M220....vs

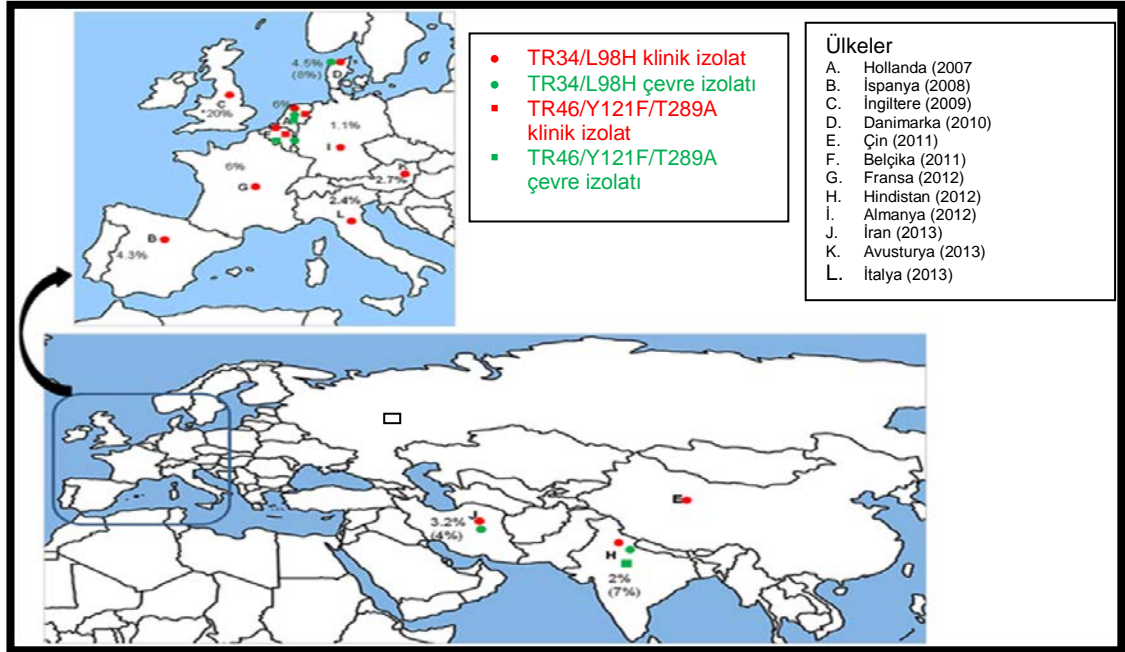
İA: İnvazif aspergilloz; İPA: İnvazif pulmoner aspergilloz; ABPA: Alerjik bronkopulmoner aspergilloz

Bu sorunun sadece Hollanda ve İngiltere'ye ait olmadığı çeşitli Avrupa ülkelerini (Avusturya, Belçika, Danimarka, Fransa, İtalya, Hollanda, İsveç, İsviçre, İngiltere) kapsayan geniş kapsamlı bir çalışma ile gösterilmiştir. Global bir çalışma olan ve 20 ülkeden 23 merkezin katılımı ile gerçekleşen "SCARE NETWORK" çalışmasında 3249 *A. fumigatus* suşu

taranmış ve 40 suşta itrakonazol direnci saptanmıştır. Bunlardan 22 tanesinde direnç mekanizması TR34/L98H olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya Hacettepe Üniversitesi'nden 27 klinik izolat gönderilmiş, ancak hiçbirinde direnç saptanmamıştır (93).

Avrupa dışında *A. fumigatus* suşlarında TR34/L98H mutasyonu, ilk kez ARTEMİS çalışmasında Çin'den gelen izolatlarda görülmüştür. Bu çalışmada mutasyonun genetik olarak ortak bir atadan kaynaklandığı ve sonrasında ülkeler arası göç ettiği düşünülmüştür (94). Daha sonra bu dirence Hindistan ve İran'da da rastlanılmıştır (92,95,96).

Çevre kaynaklı olduğu bilinen TR34/L98H mutasyonundan başka ikinci bir çevre kaynaklı olduğu tahmin edilen TR46/Y121F/T289A mutasyonu daha yakın zamanda Hollanda'da tanımlanmıştır. Esas olarak vorikonazolü hedef alan bu direnç de hızlı bir yayılım eğilimi göstermiş ve 2009'da %5,3 iken, 2010'da %8,3'e ulaşmıştır. (61,97) Şekil-6'da çevre kaynaklı azol direnci için bugüne kadar belirlenmiş odaklar görülmektedir. Görüldüğü gibi bu mutasyonlara, birçok Avrupa ülkesinde ve Avrupa dışında İran, Hindistan ve Çin'de rastlanılmıştır.



Şekil-6: Çevre kaynaklı azol direncinin dünyadaki dağılımı.

Türkiye de bir tarım ülkesidir ve tarım ekonomimizde önemli bir yer tutar. Bursa, Marmara Bölgesinde yer alan, birçok ürünün alınabildiği verimli topraklara sahip bir şehirdir. Tarım ve köy işleri bakanlığının 2004, 2006, 2007 yıllarındaki tüketim istatistiklerine bakıldığında azol grubu zirai fungusitler arasında tebukonazolün ülkemizde ve bölgemizde en çok tüketilen ajan olduğu görülmektedir. Buğday ve diğer tahıllar, domates, turunçgiller, üzüm, kayısı ve armut en sık kullanıldığı tarım ürünleridir (98). Ülkemizde ve bölgemizde *A. fumigatus* türlerinde direnç ile ilgili geniş kapsamlı bir veri yoktur. Merkezimizde 2007 yılında *Aspergillus* türlerinin in vitro antifungal duyarlılığına bakılan bir tez yapılmıştır (99). Çalışılan 136 *A. fumigatus* suşu arasında yüksek itrakonazol MİK değeri olanlar dikkati çekmiştir. Bu çalışmada ise çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. fumigatus* suşları arasında azol direnç oranının ve direnç mekanizmasının belirlenmesi ve ülkemiz için azol direnci ile ilgili ilk epidemiyolojik verilerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 04.12.2012 tarih ve 2012-25/19 sayılı kararla alınan izin ve Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden sağlanan destek (KUAP 2013/4) ile yapıldı.

I. Çalışma Şuşları

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM) Mikrobiyoloji Laboratuvar'ına 1999-2012 tarihleri arasında gönderilen hasta örneklerinden izole edilen ve -80°C'da saklanmış olan «**A. fumigatus kompleks**» suşları, azol direnci açısından taranmak üzere kullanıldı. Suşlar, en az iki kez Saboraud's dextrose agara (SDA; HiMedia Laboratories, Mumbai/Hindistan) pasajlanarak canlandırıldı. Canlandırılan ve saflığından emin olunan tüm suşların yüksek sıcaklıkta üreme yeteneğine (termotolerans testi: 50°C'da 48 saat inkübasyon) bakıldı. Böylece Fumigati kompleksi içindeki *A. fumigatus* suşlarının ayrılması sağlandı (56).

II. Azol Direncinin Belirlenmesi için Tarama Testi

Canlandırılan ve *A. fumigatus* olarak değerlendirilen suşlar 4 mg/L itrakonazol (Janssen Pharmaceutica, N.V./Belçika) içeren SDA besiyerinde 35°C'da 48 saat inkübe edildi ve bu ortamda üreyen suşlar azol dirençli kabul edilerek ileri incelemeye alındı (97,100). Prof Dr Paul E. Verweij'den (Radboud University Nijmegen Medical Center) temin ettiğimiz itrakonazole duyarlı (VO 89-25) ve itrakonazole dirençli (VO 89-27) birer suş da her taramada kontrol amacıyla kullanıldı.

III. In Vitro Antifungal Duyarlılık Testleri

Tarama testi ile azol direnci saptanan suşların itrakonazol, vorikonazol (Pfizer Inc, NY/ABD), amfoterisin B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Almanya) ve ülkemiz ve bölgemizde sık kullanılan zirai bir azol fungusit olan tebukonazol (Bayer Pharma AG, Leverkusen/Almanya) duyarlılıklarına CLSI M38-A mikrodilüsyon standardı ile bakıldı (75). Antifungallerin ham maddeleri ilgili firmalardan temin edildi. Stok solüsyonları (1600 µg/ml) CLSI M38-A dökümanına göre dimetilsülfoksit (DMSO; Merck&Co Inc, NJ/ABD) ile hazırlandı ve steril tüplere konularak mikrodilüsyon plaklarına dağıtılana kadar -80°C'da bekletildi. Çalışma zamanı RPMI 1640 (L-glutamin ve sodyum bikarbonatsız; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) besiyeri ile sulandırımı yapılarak, son konsantrasyonu 0,064-32 µg/ml olacak şekilde 0,1 ml mikrodilüsyon plaklarına dağıtıldı.

Tarama testi ile azol direnci saptanan suşlar eğri patates dekstroz agarda (PDA; Oxoid Ltd, Hampshire/İngiltere) 35°C'da yedi gün inkübe edildi. Daha sonra PDA'daki kolonilerin üzerine yaklaşık 1 ml steril serum fizyolojik ve bir damla tween 20 (Merck&Co Inc) eklendi ve bir pastör pipetiyle yavaşca karıştırılarak bir süspansiyon hazırlandı. Oluşan bu süspansiyon steril bir tüpe alındı. Ağır partiküllerin çökmesi için 3-5 dk beklendikten sonra üstteki homojen kısım başka bir steril tüpe aktararak 15 sn vortekslendi. Sonra bu karışımın absorbansı 530 nm'de 0,09-0,11 (yaklaşık $0,4-5 \times 10^6$ CFU/ml) olacak şekilde spektrofotometrik (BD PhoenixSpec; Becton-Dickinson and Company Sparks, MD/ABD) olarak ayarlandı. RPMI 1640 besiyeri ile 1/50 sulandırıldıktan sonra iki kat konsantrasyonda antifungal içeren mikrodilüsyon kuyucuklarına 0,1 ml dağıtıldı. Suşların eklenmesi ile antifungal ilaç dilüsyonlarının son konsantrasyonu 0,032-16 µg/ml oldu. Mikroplaklar sarsmadan etüve kaldırılarak 35°C'da 48 saat inkübe edildi. Kontrol kuyucuğuna göre üremenin %100 inhibe olduğu kuyucuktaki konsantrasyon, amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve tebukonazol için MİK değeri olarak belirlendi (75). İtrakonazol ve vorikonazol MİK>1 µg/ml olanlar NWT olarak değerlendirilerek dirençli kabul edildi (77,78). Tebukonazol için epidemiyolojik

cut-off ve sınır değerleri bilinmediğinden, yapılan çalışmalara göre, MİK>2 µg/ml olan suşlar dirençli olarak kabul edildi (38). Kalite kontrol amacıyla CLSI M38-A tarafından nerilen *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları her çalışmada kullanıldı.

IV. Azol Direnç Mekanizmasının Belirlenmesi

A. fumigatus suşlarında azol direncinden en fazla sorumlu olan *cyp51A* genindeki mutasyonları saptamak amacıyla dizi analizi yapıldı.

IV.A. Dirençli Suşlardan DNA Ekstraksiyonu

SDA besiyerinde 37°C'da 48 saat inkübe edilerek üretilen dirençli suşlardan, bir öze dolusu olarak 15 ml GYEP besiyerine (%2 glikoz, %0,3 yeast extract, %1 pepton) aktarıldı. Bu sıvı besiyerinde 37°C'da 48 saat tutuldu ve yüzeyde oluşan kf miçelleri 0,5 mm çaplı zirkonyum oksit boncuklarla manyetik karıştırıcıda (Bullet Blender Storm; Next Advance Inc, NY/ABD) 2 dk muamele edilerek parçalandı ve homojenize edildi (7,47). DNA ekstraksiyonu spin kolon prensibiyle çalışan ticari bir kitle (Gene Matrix Plant&Fungi; EURx Ltd, Gdansk/Polonya) kitin çalışma presibine uygun olarak yapıldı. Fiziksel olarak parçalanan suşların üzerine kitin içinde bulunan eritici tampon (lysis buffer) eklenerek hücre duvarı hasara uğratıldı. Daha sonra proteinaz K ile DNA'yı saran protein yapıları sindirildi. Optimize tampon solüsyonları ve etanollü ortamda yapılan santrifüj işlemi ile DNA'nın spin kolona tutunması sağlandı ve istenmeyen ürünler toplama kaplarına süzülerek uzaklaştırıldı. İki yıkama aşamasıyla kalan diğer ürünler uzaklaştırılırken, elüsyon basamağıyla kolon filtresindeki DNA elde edildi. Elde edilen DNA'nın kalitesi spektrofotometrik (Maestrogen Inc, Las Vegas NV/ABD) olarak kontrol edildi ve çalışılncaya kadar -20°C'da saklandı.

IV.B. Promotor Bölge ve Genin oğaltılması

Azol antifungallerin hedef proteini olan lanosterol 14 alfa demetilazı kodlayan *cyp51A* genindeki nokta mutasyonları saptayabilmek için dirençli suşların bu gen bölgesi "polimerase chain reaction" (PCR) yöntemi ile çoğaltıldı. Gen bölgesi uzun (ekzon 1548, intron 71 "base-pair" [bp])

olduğundan dizi analizinin daha rahat yapılabilmesi için bölünerek üç çift primer kullanıldı. Ayrıca çoklu dirençte önemli rol oynayan TR'lerin saptanması amacıyla promotor bölge için de ayrı bir çift primer seçildi (45,47,54). Gen ve promotor bölgesi ve kullanılan primerler Şekil-7 ve Tablo-7'de gösterilmiştir.

```

GAGAGACTTTGACACAGTCCGCGACAGAGGCCCTCCCCCTATAAGTCGAGTGCAGGACTG
GCTGATCAAACATATGCTCATGCACTGTCTTCTCCTACATAACAGAATACTGGGCAGCGGG
CTGGAGATACTATGGCTTTCATATGTTGTCTCAGCGGCAGCATTCTGAAACACGTGCGTAG
CAAGGGAGAAGGAAAGAAGCACTCTGAATAAATTTACACTGTTCTCCTCTAGAAAAAATC
ATGAGTGAATAATCGCAGCACCCTCCAGAGTTGTCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGT
GCTGAGCCGAATGAAAAGTTGCCTAATTACTAAGGTGTAGTTCCAGCATAACATAACCCCT
AACTCATACTACGGTAGGTAGATCTACTTACCTATGAACCTATATTTGGTAGGTAGGTGAA
TATAAAAATACAGCATGGAACATGTTTTTCATTAGCTGGTCTCTCATTTCGTCCTTGTCTTA
GGCCTTAAGGAATCCAGTATATGAAATAATCCCTCTTATCCATTTTCTCTTATTCTTTTT
TCATTTCCCTCATCACTGCAACTCTAATCCTCGGGCTCACCCCTCCCTGTGTCTCCTCGAA
ATGGTGCCGATGCTATGGCTTACGGCCTACATGGCCGTTGCGGTGCTGACGGCAATCTTG
CTCAATGTTGTTTATCAATTATTCTTTTCGGCTTTGGAACCGAACAGAACCGCCAATGGTC
TTTCATTGGGTCCCATATCTGGGTAGTACCATCAGTTACGGGATTGATCCC'TACAAGTTC
TTCTTTGCGTGACAGAAAAAGGCAAGTTTCAAGATTGTAGTTTGACATTCATTCCCTGGGC
GCATTGCTGAGTATTGCTTTCTTAACTGGCAGTATGGCGATATCTTCAC'TTTTATAC'TGT
TGGGTCAAAAAACACAGTCTACCTGGGCGTTCAGGGAAACGAGTTTATTCTCAACGGCA
AGCTCAAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCATAGTCCATTGACGACCCCGTTTTTCGGAT
CGGACGTGGTGTATGATTGTCCCAATTCAGCTGATGGAGCAGAAAAAGTTCATCAAGT
ACGGCTTGACTCAGTCTGCGTTAGAGTCTCATGTGCCACTTATTGAGAAGGAGGTTTGG
ACTATCTGCGCGATTACCGAACTTTCAAGGCTCGTCCGCGCCGGTGGACACTCTCTCGGG
CAATGGCTGAGATTACCATTTTACCGCTGCTCGAGCCCTCCAAGGCCAGGAAGTTCGTT
CCAAACTCACGGCTGAGTTCGCTGACCTCTATCATGACCTGGACAAGGGCTTTACTCCCA
TCAATTTTATGCTACCGTGGGCCCCATTGCCGCATAACAAGAAGCGAGATGCTGCTCATG
CGCGCATGAGGTCAATCTACGTTGACATCATCACTCAGCGCCGTCTTGACGGTGAGAAGG
ACTCTCAGAAAATCAGACATGATATGGAACCTGATGAACTGCACATACAAAAACGGCCAGC
AAGTGCTTGATAAAGAGATTGCGCACATGATGATAACCCCTGTTGATGGCTGGTCAGCATT
CGTCTTCGTCATCAGCGCCTGGATTATGCTGAGACTGGCCCTCACAGCCAAAAGTCCCTCG
AAGAGCTGTATCAGGAACAGCTGGCCAATCTTGGCCCCGCCGGGCCAGACGGCAGTCTTC
CTCCGCTCCAGTACAAGGATCTTGACAACTTCCCTTCCATCAACATGTTATTTCGTGAAA
CCTTGCGGATTCACTCCTCTATTCACTCTATCATGCGCAAGGTGAAAAGCCCC'TTGCCCG
TTCCCGGGACCCCTTACATGATTCTCCCGGTGCGGTGCTCCTTGCTTACCTGGAGTGA
CAGCCCTCAGCGACGAACACTTCCCCAATGCTGGGTGCTGGGATCCCCATCGTGGGAGA
ACCAGGCTACTAAGGAGCAGGAGAACGACAAGGTTGTGACTACGGTTACGGCGCCGTCT
CCAAGGGCACGTCAAGTCCCTATCTTCCGTTTGGTGTGGCCGACACCGCTGCATCGGCG
AGAAATTGCTTATGTCAACCTTGGTGTGATTCTGGCGACCATTGTGCGCCACCTGCGAC
TTTTCAACGTGGATGGAAGAAAGGAGTCCCTGAAACTGACTATTTCATCCCTCTTTTCGG
GCCCCATGAAGCCAAGCATCATCGGCTGGGAGAAGCGGTGCGAAAAACACATCCAAGTGAG
ACTGTTGTAAACATCGAGGACTTCAAAGGATTTGGTGTGATCGGAATAGGTGTATTATAC

```

Şekil-7: *cyp51A* geni ve promotor bölgesi (Accession number: AFUA_4G06890). Gri olarak yazılan nükleotitler promotor bölgeye, kırmızı olarak yazılan nükleotitler gene ait olup, gen içindeki gri bölge introndur. Gri olarak taranmış primerler promotor bölgeyi, yeşil olarak taranmış olan primerler birinci bölgeyi (1093bp), mavi olarak taranmış primerler ikinci bölgeyi (720bp), sarı olarak taranmış primerler ise üçüncü bölgeyi (553bp) çoğaltmak için kullanılmıştır.

Tablo-7: Promotor ve gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları.

	Bağlanma (annealing) sıcaklığı	Primerler ^a	
Promotor bölge	53°C	Fp	-5'-GGAGATACTATGGCTTTCAT-3'
		Rp	-5'-GTATGCTGGAACCTACACCT-3'
cyp51A 1.bölge	57°C	F1	-5'-ATGGTGCCGATGCTATGG-3'
		R1	-5'-TACTGGAGCGGAGGAAGA-3'
cyp51A 2.bölge	53°C	F2	-5'-GATAAAGAGATTGCGCACAT-3'
		R2	-5'-ACAGTCTCACTTGGATGTG-3'
cyp51A 3.bölge	50°C	F3	-5'-CTGCGTTAGAGTCTCATGT-3'
		R3	-5'-TGGCCAGCTGTTCTGAT-3'

F: Forward primer; R: Reverse primer

IV.B.a. PCR Protokolü

Her bir suş için PCR karışımı; 5 µl GoTaq Flexi buffer (Promega Corporation, Madison WI/ABD), 1,9 µl MgCl₂ (25 mM) (Promega Corporation), 1,25 µl deoksinükleozit trifosfat (10 mM) (dNTP; Thermo Fisher Scientific Inc, Pittsburgh PA/ABD), 1,25'er mikrolitre forward ve reverse primerler (Integrated DNA Technologies Inc, Coralville Iowa/USA), 0,25 µl GoTaq DNA polymerase (5 u/µl) (Promega Corporation) ve 3 µl ekstrakte DNA ile hazırlandı ve toplam hacim distile su ile 25 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon termal döngü cihazında (Esco Technologies Inc, Hatboro PA/ABD) yapıldı. Cihaz, ilk denatürasyon için 95°C'da beş dakikaya; daha sonra 40 siklus boyunca 94°C'da 30 saniyeye, Tablo-7'de belirtilen bağlanma sıcaklıklarında 45 saniyeye ve 72°C'da iki dakikaya; son uzama için ise 72°C'da yedi dakikaya ayarlandı (101).

IV.B.b. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Çoğaltılmış gen bölgesi ürünleri, ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz (Lonza-Rockland Inc, Rockland ME/ABD) jel elektroforez ile (Bio-Rad Laboratories Inc, Berkeley California/ABD) 120 V'da 30 dakika yürütülerek, moleküler ladder (Biobasic Inc, Markham/Kanada) yardımı ile değerlendirildi (45). Promotor bölgenin değerlendirilmesinde ise iki yöntem kullanıldı. Hem ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezle incelendi; hem de

heterodubleks analizi (HDA) ile 600 V'da 16 saat yürütüldükten ve gümüş boyamadan sonra değerlendirildi (102,103).

IV.C. Promotor Bölge ve Genin Dizi Analizi

DNA dizi analizi için Sangerman yöntemi presibi ile çalışan ticari kapiller kanallı otomatik dizi analiz kiti (Dye Terminator Cycle Sequencing [DTCS] Quick Start Kiti; Beckman-Coulter Inc, Brea CA/ABD) kullanıldı (104). Dizi analizi öncesi PCR ürünlerinin saflaştırılması yapıldı.

IV.C.a. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Kolon bazlı bir saflaştırma sistemi olan Omega E.Z.N.A.® Cycle Pure Kiti (CP: Omega Bio-Tek, Norcross GA/ABD) kullanılarak PCR ürünlerinin primerlerden, enzimlerden, tuzlardan ve DNA'nın saflığını bozan diğer ürünlerden ayrılması sağlandı (105). Bu amaçla CP tampon solüsyonuyla karıştırılan PCR ürünü spin kolondan geçirilerek DNA'nın filtreye tutunması ve yıkama basamakları ile fenol ve kloroform gibi toksik organik maddelerden ayrıştırılması sağlandı. Son basamak olan elüsyon basamağı ile saflaştırılmış DNA elde edildi. Elde edilen saf DNA tekrar ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezde 120 V'da 30 dakika yürütülerek bantların kalitesi kontrol edildi ve dizi reaksiyonuna alıncaya kadar -20°C'da muhafaza edildi.

IV.C.b. Dizi Reaksiyonu

DNA dizi analizi için Tablo-8'de belirtilen karışım, soğuk blok üzerinde 0,2 ml'lik PCR tüplerinde hazırlandı. Sekans reaksiyonu 96°C'da üç dakika ve takiben 30 siklus boyunca 96°C'da 20 saniye, 50°C'da 20 saniye ve 60°C'da dört dakika olacak şekilde Esco termal döngü cihazında gerçekleştirildi.

Tablo-8: Dizi reaksiyonu karışımı.

Reaktifler	Miktar
DTCS Quick Start Master Mix (Beckman-Coulter)	8 µl
Saflaştırılmış PCR ürünü	2 µl
dH ₂ O	9 µl
Tek yönlü (F veya R) ^a Primer (10pmol/µl)	0,5 µl

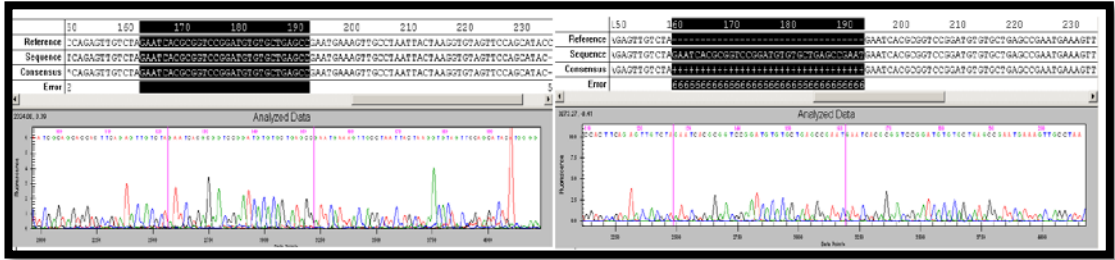
^aF: Forward; R: Reverse.

IV.C.c. Alkol Çöktürme

Dizi reaksiyonu tamamlanan her bir ürün üzerine, reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 2 µl sodyum asetat, 2 µl sodyum etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 1 µl glikojen eklendi ve 60 µl %95'lik soğuk etanol ile karıştırılarak +4°C'da 14.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan supernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra çökelti 200 µl %70'lik soğuk etanolle iki kez (14.000xg'de beş dakika) daha yıkandı. Çökelti, 37°C etüve konularak kurumaya bırakıldı ve alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı.

IV.C.d. Ürünün Dizi Analiz Cihazına Yüklenmesi ve Yorumu

Kuruyan pellet üzerine 40 µl kitin içinden çıkan yükleme solüsyonu eklendi ve 96 kuyucuklu plaklara aktarımı yapıldı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına (Beckman Coulter CEQ8000XL) yerleştirildi ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçlar pikler şeklinde görüntülendi (Şekil-8).



Şekil-8: DNA dizi analiz cihazından alınan bir görüntü.

Ayrıca, belirlenen dizilerdeki mutasyonları saptamak için web tabanlı bir program ile (Bioedit Sequence alignment editor) “ClustalW Analiz” yapıldı (106).

BULGULAR

I. Azol Dirençli Suşların Belirlenmesi ve Epidemiyolojik Veriler

Bu çalışmada, 1999-2012 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen, morfolojik olarak ve sıcaklığa dayanıklılık testi ile *A. fumigatus* olarak değerlendirilen 746 suş, azol direnci açısından tarandı. Taranan suşlardan 76 tanesi (%10,2) 4 mg/L itrakonazol içeren besiyerinde üreyerek itrakonazol dirençli olarak kabul edildi. Tablo-9'da itrakonazol direnci açısından taranan ve dirençli bulunan suşların örneklere göre dağılımı görülmekte olup, dirençli suş çıkması açısından örnekler arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki-kare testi; $p>0,05$).

Tablo-9: İtrakonazol direnci açısından taranan suşların örneklere göre dağılımı.

Örnek grubu	Taranan suş sayısı	Dirençli suş sayısı (%)
Solunum yolu örnekleri ^a	664	66 (9,9)
Biyopsi örnekleri ^b	28	5 (17,9)
Aseptik koşullarda alınan örnekler ^c	27	3 (11,1)
Diğer örnekler ^d	27	2 (7,4)
TOPLAM	746	76 (10,2)

^aBalgam, TAS ve bronkoskopi ile alınan örnekler; ^bBurun, damak ve akciğer biyopsi örnekleri; ^cApse ve steril vücut sıvılarından alınan örnekler; ^dBurun, kulak, konjunktiva, yara, dren sürüntü örnekleri.

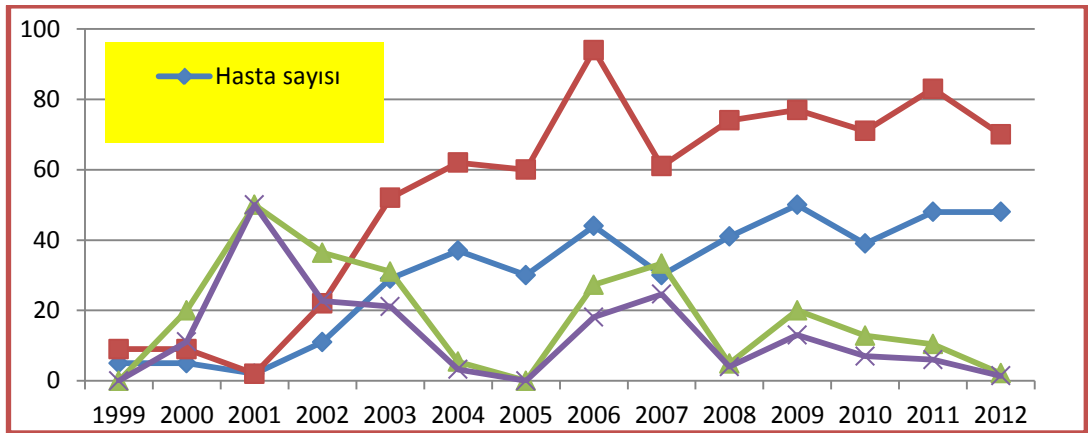
İtrakonazol direnci açısından taranan 746 suş 419 hastaya ait olup, direnç oranlarının yıllara göre dağılımı Tablo-10'da görülmektedir. Görüldüğü gibi 1999 ve 2005 yıllarında dirençli suşa rastlanmadı. Sadece iki suşun incelendiği 2001 yılı hariç tutulduğunda, en fazla dirençli suş 2007 yılında saptandı ve 2004, 2005, 2008, 2010, 2011 ve 2012 yıllarındaki direnç oranlarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (ki-kare testi; $p<0,05$).

Laboratuvar kayıtlarından yaptığımız incelemede, 2001 yılında sadece iki hastanın örneğinde *A. fumigatus*'un ürettiği görüldü ve bu iki hastanın bir tanesinde dirençli suş saptanınca %50 gibi çok yüksek bir direnç oranı elde edildi. Bu yıldaki *Aspergillus* üremelerinin çoğu diğer türlere aitti.

Tablo-10: Azol direncinin yıllara göre dağılımı.

Yıllar	Çalışılan suş sayısı	Dirençli Suş sayısı (%)	Çalışılan hasta sayısı	Direnç saptanan hasta sayısı (%)
1999	9	Yok	5	Yok
2000	9	1 (11,1)	5	1 (20)
2001	2	1 (50)	2	1 (50)
2002	22	5 (22,7)	11	4 (36,4)
2003	52	11 (21,1)	29	9 (31)
2004	62	2 (3,2)	37	2 (5,4)
2005	60	Yok	30	Yok
2006	94	17 (18,1)	44	12 (27,3)
2007	61	15 (24,6)	30	10 (33,3)
2008	74	3 (4)	41	2 (4,9)
2009	77	10 (13)	50	10 (20)
2010	71	5 (7)	39	5 (12,8)
2011	83	5 (6)	48	5 (10,4)
2012	70	1 (1,4)	48	1 (2,1)
Toplam	746	76 (10,2)	419	62 (14,8)

Dirençli suş ve dirençli hastaların yıllar içindeki yüzde dağılımı Şekil-9'da görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi 2001 yılından sonra hasta örneklerinden izole edilen suş sayıları giderek artmıştır. Dirençli suşların görülmesi ise yıllar içinde dalgalanma göstermiş ve 2001, 2007 ve 2009 yıllarında pikler oluşturmuştur.



Şekil-9: Dirençli suş ve dirençli hastaların yıllara göre yüzde dağılımı.

Çalışılan ve direnç saptanan suşların kliniklere göre dağılımı Tablo-11'de görülmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi en fazla direnç, Nefroloji Kliniği'nde tespit edildi; bunu Enfeksiyon ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinikleri izledi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları'ndan gelen 22 hastaya ait 35 örneğin 21 tanesinin, çocuk hematoloji-onkoloji hastalarından izole edildiği ve direnç tespit edilen dört hastanın ikisinin yine çocuk hemotoloji-onkoloji hastası olduğu görüldü. Dirençli suş görülme oranları açısından klinikler arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki-kare testi; $p>0,05$).

Tablo-11: Çalışılan ve direnç saptanan suşların kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Çalışılan suş sayısı	Dirençli suş sayısı (%)	Çalışılan hasta sayısı	Dirençli hasta sayısı (%)
Göğüs Hst	278	29 (10,4)	143	22 (15,4)
Hematoloji	211	16 (7,6)	109	13 (11,9)
Onkoloji	59	3 (5,1)	36	3 (8,3)
Nefroloji	46	11 (23,9)	23	8 (34,8)
ÇSH ^a	35	5 (14,3)	22	4 (18,2)
Reanimasyon	24	2 (8,3)	18	2 (11,1)
Romotoloji	16	1 (6,25)	9	1 (11,1)
Enfeksiyon	11	3 (27,3)	10	3 (30)
Diğerleri	66	6 (9,1)	49	6 (12,2)
TOPLAM	746	76 (10,2)	419	62 (14,8)

^aÇSH: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Azol direnci saptanan 62 hastanın 35 tanesinde (%56,4) birden fazla izolat çalışılmasına rağmen sadece iki tanesinde tüm izolatlar dirençli bulundu. Bu hastalardan bir tanesi pulmoner emboli tanısı ile Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde yatan bir hasta olup, balgamından izole edilen üç suşu da itrakonazol ve vorikonazole dirençliydi. Hematoloji Kliniği'nde takip edilen akut myeloid lösemi (AML) tanılı diğer bir hastanın ise, iki trakeal aspirat örneğinden izole edilen iki suşunda da direnç görüldü. Birden fazla izolatu çalışılan kalan 33 hastada ise, hem duyarlı hem de dirençli suşlar beraber vardı.

Tarama testleri ile itrakonazol dirençli saptanan 76 suşun itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B duyarlılıkları Tablo-12'de görülmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi tüm suşların MİK değerleri, hem itrakonazol hem de vorikonazol için epidemiyolojik cut-off değerlerinin çok üzerinde bulundu. Amfoterisin B ise, tüm suşlara epidemiyolojik cut-off sınırları içinde etkili görüldü.

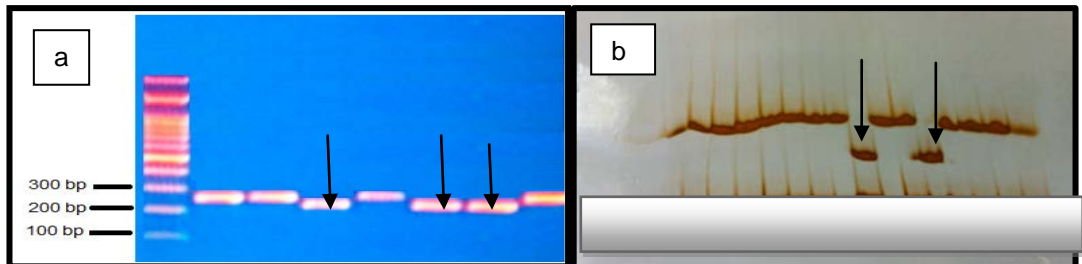
Tablo-12: İtrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B in-vitro duyarlılık sonuçları.

	MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
İtrakonazol	>16	>16	>16
Vorikonazol	2-8	8	8
Amfoterisin B	0,5-2	0,5	1

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

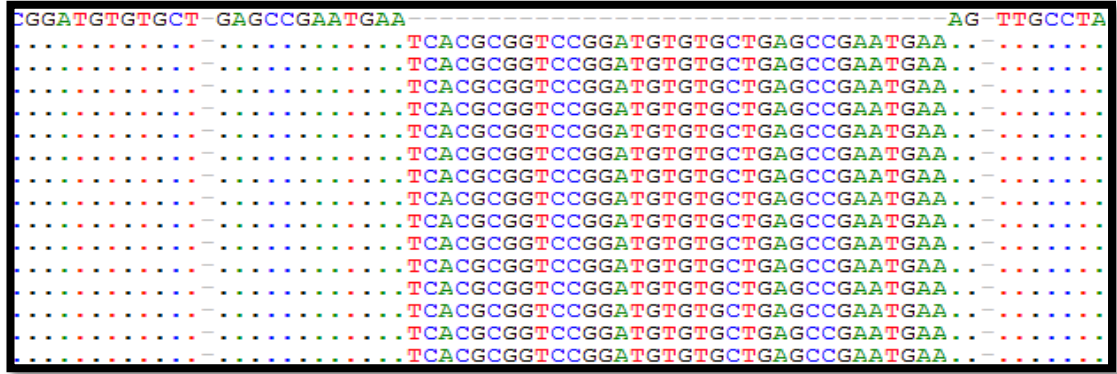
II. Azol Direncine Yol Açan *cyp51A* Mutasyonları

Bu çalışmada, azol direnç mekanizmasını belirlemek için *cyp51A* genindeki olası mutasyonlar dizi analizi ile belirlendi. Dirençte TR'ler açısından önemli olan promotor bölgenin agaroz jel elektroforez ve HDA görüntüleri Şekil-10'da görülmektedir. Gerek agaroz jelde gerekse HDA'da suşlar arasında yürüme farkı saptandı. Dirençli 76 suşun 66 tanesinden elde edilen promotor bölge PCR ürünü daha yavaş yürüdü ve daha ağır olduğu düşünüldü. Kalan 10 tanesi ise daha hızlı yürüyerek ileri bir noktada bantlar oluşturdu (Şekil-10).



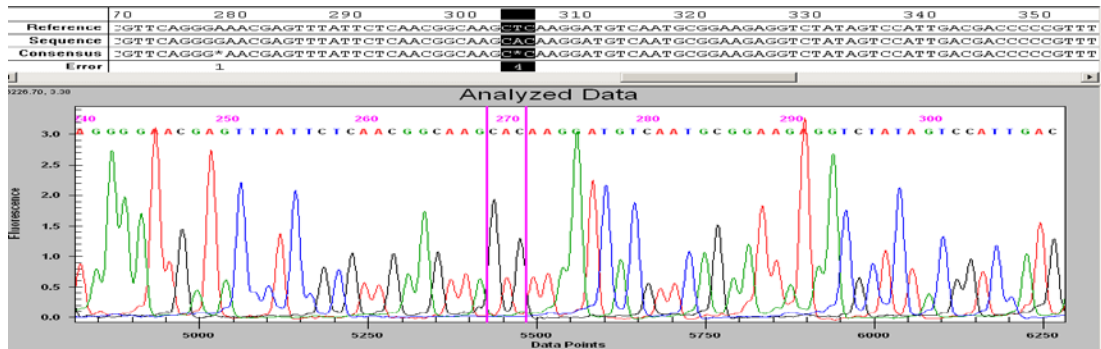
Şekil-10: *cyp51A* promotor bölge PCR ürünlerinin agaroz jel (a) ve HDA (b) görüntüleri. Oklar daha hızlı yürüyen bantları vurgulamaktadır.

Agaroz jel ve HDA'da yavaş yürüyen 66 promotor bölge PCR ürününün hepsinde 34 bp'lik tekrarların olduğu dizi sonrası yapılan ClustalW analizi ile görüldü (Şekil-11).



Şekil-11: ClustalW analizi sonucu görülen tekrar bölgeleri (TR34). En üst sırada tekrarın olmadığı kontrol suşu (VO89-25) bulunmaktadır.

Cyp51A geni uzun bir gen olduğundan başarılı bir dizi analizi yapabilmek için gen bölgesi üç çift primer kullanılarak üç parça şeklinde PCR ile çoğaltıldı (Şekil-7). Çoğaltılan ürünlerin agaroz jelde yürütülmesi ile üç kısım için de uygun yerlerde (1093bp, 720bp, 553bp) bantlar elde edildi. Birbirini kapsayacak şekilde çoğaltılmış bu PCR ürünlerinin dizileri, gen bankasından indirdiğimiz AFUA_4G06890 nolu suş ve Dr Paul Verweij'den temin ettiğimiz dirençli ve duyarlı suşların *cyp51A* gen bölgeleri ile karşılaştırıldı (ClustalW analiz). TR34 pozitif olan 66 suşun hepsinin 364. nükleotitinde nokta mutasyon (t364a) saptandı ve 98. kodonda lösin yerine histidin değişimi olduğu anlaşıldı (Şekil-12).



Şekil-12: L98H mutasyonu. Mutasyonun olduğu yer siyah olarak gösterilmektedir.

Bu sonuçla, azol dirençli suşlarımızın %86,8'inde (66/76) tarımda kullanılan azol fungusitlerin neden olduğu TR34/L98H mutasyonu tespit edildi. Dirençli suşlarımızda esas mekanizmanın TR34/L98H olarak belirlenmesi üzerine, ülkemiz ve bölgemizde sık kullanılan azol bir zirai fungusit olan tebukonazol duyarlılığına da bakıldı. TR34/L98H mutasyonu olan 66 suşun tebukonazol MİK değerleri biri hariç $>16 \mu\text{g/ml}$ olarak bulundu. Bir suşun MİK değeri ise yine yüksek olup, $4 \mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

TR34/L98H mutasyonu saptanmayan 10 suшта azol direncinde önemli olduğu bilinen G54, G138, M220, Y431 ve G448 nokta mutasyonlarından hiçbirine rastlanmadı. Hepsinde, azol direnciyle ilişkili kabul edilmeyen V172M, T248N ve E255D değişimleri vardı ve dört tanesi, TR34/L98H mutasyonuna sahip suşlardan farklı olarak tebukonazole duyarlı (MİK değerleri $\leq 0,032 \mu\text{g/ml}$) bulundu. Bu suşlar 10 farklı hastanın solunum yolları örneklerinden izole edilmişti ve hastaların sekiz tanesinde, direnç göstermeyen ve/veya TR34/L98H mutasyonu olan suşlar da vardı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *A. fumigatus* suşları arasında azol direncinin yaygınlığı ve direnç mekanizması irdelenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla azol direnç mekanizması ile ilgili ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Son yıllarda, başta Avrupa ülkeleri olmak üzere İran, Hindistan ve Çin'den MAR suşlarının hızla arttığı bildirilmesi, ülkemize ait bu konu ile ilgili epidemiyolojik verilerin olmaması ve daha önce bölümümüzde yapılan bir tez çalışmasında itrakonazole dirençli suşların gözlenmesi bizi böyle bir çalışma yapmaya yönlendirmiştir (56,93,94,96,99,100,107-109).

Çalışmamızda 1999-2012 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *A. fumigatus* suşlarında azol direncine bakılmıştır. Laboratuvarımızda, direkt mikroskopik incelemesi pozitif olan örneklerdeki üremelerle aynı hastaya ait birden fazla örnekteki veya birden fazla ekim plağındaki üremelerin kontaminasyon olmadığı kabul edilmekte ve saklamaya alınmaktadır (110). Ancak çalışma suşlarının kesin olarak enfeksiyon etkeni olduğunu söylemek de doğru olmayıp, kolonize olan suşların da bulunabileceği vurgulanmalıdır. Bununla beraber bu çalışmanın amacı enfeksiyon etkeni suşları belirlemek olmayıp, klinik örneklerde kolonize ya da etken olarak bulunan *A. fumigatus* suşlarında azol direnç oranını ve mekanizmasını belirlemektir.

A. fumigatus, Fumagati seksiyonunda yer alan bir türdür. *A. fumigatus* ile seksiyon içindeki diğer türleri mikroskopik ve makroskopik morfoloji ile ayırt etmek mümkün değildir. Bu çalışmada kesin ayırım için gerekli olan moleküler tanımlama yapılmamıştır. Ancak *A. fumigatus* ısıya dayanıklı bir türdür ve yüksek sıcaklıklarda (45-50°C) üreme özelliğini sürdürür. Seksiyon içinde yer alan ve nadiren hasta örneklerinden üretilen *A. lentulus* ve *A. udagawae* suşları bu sıcaklıklarda üreyemez. Dolayısıyla, literatürün de desteklediği gibi termotolerans testinin klinik izolatlar içinde *A. fumigatus*'u ayırmada yeterli olduğu düşünülmüştür (56,108).

A. fumigatus izolatları arasında MAR görülmesi, İA'nın azoller ile profilaksi ve tedavisinin ayarlanmasında önemli sorunlar oluşturabilir. Ancak, MAR suşlarının yaygınlığı hakkında bilgiler kısıtlıdır. Bunun en önemli nedeni aspergilloz olgularında kültürün duyarlılığının düşük olması ve ayrıca küf mantarları için kullanılan in vitro-antifungal duyarlılık yöntemlerinin zor olup, geç sonuç vermesidir (111). Dolayısıyla rutin laboratuvarlar çok sık duyarlılık testleri yapmazlar ve bu da dirençle ilgili epidemiyolojik verileri kısıtlar. Bu çalışmada itrakonazol direnci açısından taradığımız 746 *A. fumigatus* suşu arasında %10,2 oranında direnç saptanmıştır. İtrakonazol dirençli suşların hepsi vorikonazole de dirençlidir. Bu oldukça yüksek bir orandır ve çok sayıda suşla (suş sayısı>100) yapılan çalışmalarda (Hollanda'da %6-14,8; İngiltere'de %7-28) direnç oranlarına benzerlik gösterir (56,60,100). İlk azol dirençli olgular 1997 yılında yayınlanmıştır ve doksanlı yılların sonundan itibaren görülmeye başladığı belirtilir (82,111). Bu çalışmada da ilk azol dirençli suşa 2000 yılında rastlanılmış, 2005 yılı hariç diğer bütün yıllarda görülmüş ve en yüksek orana 2007 yılında ulaşılmıştır. Şekil-9'da görüldüğü gibi, 1999'dan 2012'ye doğru laboratuvarımızda *A. fumigatus* izolasyonu düzenli artış göstermesine rağmen, dirençli suş saptanması dalgalanmalar göstermiştir. Değişik yıllarda (2001, 2007 ve 2009) artış eğilimi olmakla beraber 2009'dan sonra tekrar bir düşüş görülmektedir. Geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar direncin yıllar içindeki artış eğiliminden bahseder ve saptadığımız bu dalgalanma çelişkili gibi görülmektedir (56,60,100). Ancak çalışmamızda, dirençli suşların %86,8'inde TR34/L98H mutasyonu bulunmuştur. Tarımda kullanılan azol fungusitlere bağlı olarak olduğu kabul edilen bu mutasyon, suşların çevre kaynaklı olduğunu gösterir ve kişiler rastgele sıklıkta bu suşlarla kolonize ya da enfekte olabilir (38,95). TR34/L98H mutasyonuna sahip bütün suşlarımızın, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bursa İl Müdürlüğü'nden aldığımız bilgilere göre ülkemizde sık kullanılan zirai bir azol fungusit olan tebukonazole dirençli bulunması, çevre kaynaklı bulaşı desteklemektedir (98).

Çalışmamızda dirençli suşlar, değişik kliniklerden gelen örneklerde saptanmıştır. En fazla dirençli suşa Nefroloji Kliniği'nden gelen örneklerde

rastlanılmakla beraber, aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Hematolojik maligniteli hastalarda görülen İA ve daha çok konjenital veya yapısal akciğer bozukluğu olan hastalarda görülen aspergilloma veya kronik nekrotizan aspergilloz gibi enfeksiyonlarda azol kullanımı özellikle yaygındır (12,14,15). Profiltik veya tedavi amaçlı uzun süre azol kullanmış kişilerde gelişen direnç, çevre kaynaklı dirençten farklıdır. Çalışmamızda çevre kaynaklı dirence sahip suşlar çoğunlukta olduğundan, rastgele dağılım nedeniyle, klinikler arasında anlamlı fark çıkmamıştır.

Bu çalışmada TR34/L98H mutasyonu saptanmayan 10 suшта, önceden azol kullanımıyla ilişkili olan G54, G138, M220, Y431 ve G448 gibi nokta mutasyonlara da rastlanmamıştır (7,24,51,53,57,58). *A. fumigatus* izolatlarında azol direncinden sorumlu en önemli mekanizmanın *cyp51A* genindeki mutasyonlar olduğu söylene de, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, suşların %43'de *cyp51A* mutasyonu dışına bir mekanizmanın dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (60). Bu çalışmada da suşların %13,2'sinde (10/76) farklı bir mekanizma ile (dışa atım pompası veya transkripsiyon faktörleri ile ilgili direnç) direnç gelişimi olmuş olabilir ve yeni çalışmalarla bunun belirlenmesi gerekir.

Çalışmamızda azol direnci açısından taradığımız *A. fumigatus* suşları başta solunum yolları olmak üzere değişik örneklerden izole edilmiştir. Solunum yolları örneklerinin fazla olması, *A. fumigatus*'ün hava yolu ile bulaşan bir etken olması nedeniyle doğaldır (5,13,15,17). Bununla beraber, dirence bütün örneklerden izole edilen suşlarda rastlanılmış ve en yüksek oranda direnç, biyopsi örneklerinden izole edilen suşlarda bulunmuştur. Her ne kadar direnç oranları örnekler arasında anlamlı olarak farklı bulunmasa da, biyopsi örneklerinde direncin yüksek olmasının klinik önemi büyüktür ve invazif enfeksiyonlarda dirençli suşla her zaman karşılaşabileceğimiz akılda tutulmalıdır.

Bu çalışmada azol dirençli suşlara sahip 62 hastanın %56,4'ünde birden fazla izolat çalışılmış ve çoğunda dirençli suşlarla beraber duyarlı suşların da olduğu saptanmıştır. Bu bulgu literatür ile uyumlu olarak bir

hastanın hem dirençli, hem de duyarlı suşları aynı anda bulundurabileceği bilgisini destekler (91,111).

Sonuç olarak, bu çalışma ile klinik izolatlarımız arasında azol dirençli *A. fumigatus* suşlarının bulunduğu ve bu suşlardaki esas direnç mekanizmasının zirai fungusitlerle çapraz reaksiyon sonucu oluştuğu bilenen TR34/L98H mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma TR34/L98H mutasyonunun ülkemizde gösterildiği ilk çalışmadır ve her ne kadar artış eğilimi göstermese de 2000 yılından sonra hemen hemen her yıl görülmüştür. Bu nedenle profilaktik ve tedavi amaçlı azol birleşiklerinin kullanımında dikkatli olunması; etkeni üretmek için klinik ve laboratuvar olarak iyi bir işbirliği ile çaba gösterilmesi ve gerekli durumlarda in vitro duyarlılık testleri ile direncin aranması gerekir.

KAYNAKLAR

- 1- Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001; 105:1422-32.
- 2- de Hoog GS, Gene GJ, Figueras MJ (eds). Atlas of clinical fungi. 3rd edition. Utrecht: CBS; 2009.
- 3- Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 2009; 11:919-27.
- 4- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52:197-205.
- 5- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310–50.
- 6- Snelders E. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Collateral Damage of Fungicide Use (Doktora Tezi). Nijmegen: Radboud University; 2012.
- 7- Bueid A. Laboratory Epidemiology and Mechanisms of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* (Doktora Tezi). Manchester: Manchester Üniversitesi; 2012.
- 8- Reis E, Shadomy HJ, Lyon GH (eds). Fundamental medical mycology. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2012.
- 9- Larone DH (ed). Medically important fungi. 5th edition. Washington DC: ASM Press; 2011.
- 10- Gürcan Ş, Tikveşli M, Üstündağ S, Ener B. A case report on *Aspergillus lentulus* pneumonia. *Balkan Med J* 2013; 30:429-31.
- 11- Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol* 2007; 59:147-203.
- 12- Patterson TF. *Aspergillus* species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (eds). Principles and practice of infectious diseases. London: Churchill Livingstone; 2010. 3241-56.
- 13- Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:447-65.
- 14- Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:707-17.
- 15- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:781-803.
- 16- Gruhn JG, Sanson J. Mycotic infections in leukemic patients at autopsy. *Cancer* 1963; 16:61-73.
- 17- Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007; 67:1567-601.
- 18- Young RC, Bennett JE, Vogel CL, Carbone PP, Devita VT. Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine* 1970; 49:147-73.
- 19- Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, et al. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine* 2000; 79:250-60.

- 20- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET) database. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1091-100.
- 21- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46:327-60.
- 22- Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34:7-14.
- 23- de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1813-21.
- 24- Camps S. Molecular Mechanisms of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* (Doktora Tezi). Nijmegen: Radboud University; 2013.
- 25- Groll AH, Gea-Banacloche JC, Glasmacher A, Just-Nuebling G, Maschmeyer G, Walsh TJ. Clinical pharmacology of antifungal compounds. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17:159-91.
- 26- Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:213-67.
- 27- Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:719-27.
- 28- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; 11:272-9.
- 29- Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347:408-15.
- 30- Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356:348-59.
- 31- Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356:335-47.
- 32- George D, Minitier P, Andriole VT. Efficacy of UK-109496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:86–91.
- 33- Oakley KL, Moore CB, Denning DW. The in vitro activity of voriconazole against *Aspergillus* spp. and comparison with itraconazole and amphotericin. *B J Antimicrob Chemother* 1998; 42:91-4.

- 34- Bossche HV, Koymans L, Moereels H. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacol Ther* 1995; 67:79-100.
- 35- Waterman MR, Lepesheva GI. Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:418-22.
- 36- Van der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol* 2011; 49 (Suppl 1):S82-9.
- 37- Singh N, Dureja P. Persistence of hexaconazole, a triazole fungicide in soils. *J Environ Sci Health* 2000; 35:549–58.
- 38- Snelders E, Veld HRA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:4053-7.
- 39- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1897-904.
- 40- Bromilow RH, Evans AA, Nicholls PH. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations. *Pestic Sci* 1999; 55:1129-34.
- 41- Bromilow RH, Evans AA, Nicholls PH. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 2. Field studies. *Pestic Sci* 1999; 55:1135-42.
- 42- Kim IS, Shim JH, Suh YT. Laboratory studies on formation of bound residues and degradation of propiconazole in soils. *Pest Manag Sci* 2003; 59:324-30.
- 43- Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2987-90.
- 44- Denning DW, Perlin DS. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol* 2011; 6:1229-32.
- 45- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2431-8.
- 46- Warrilow AGS, Melo N, Martel CM, et al. Expression, purification and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14-alpha demethylase (*cyp51*) isoenzymes A and B. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4225-34.
- 47- Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1120-4.
- 48- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2747-50.

- 49- Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:577-81.
- 50- Nascimento AM, Goldman GH, Park S, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1719–26.
- 51- Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:31-7.
- 52- Garcia-Effron G, Mellado E, Gomez-Lopez A, et al. Differences in interactions between azole drugs related to modifications in the 14-alpha sterol demethylase gene (*cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2119-21.
- 53- Dannaoui E, Garcia-Hermoso D, Naccache JM, et al. Use of voriconazole in a patient with aspergilloma caused by an itraconazole-resistant strain of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2006; 55:1457-9.
- 54- Howard SJ, Webster I, Moore CB, et al. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:450-3.
- 55- Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, et al. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:3504-11.
- 56- Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1068-76.
- 57- Hodiamont CJ, Dolman KM, Ten BI, et al. Multiple-azole resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol* 2009; 47:217-20.
- 58- Xu H, Chen W, Li L, et al. Clinical itraconazole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*, isolated serially from a lung aspergilloma patient with pulmonary tuberculosis, can be detected with real-time PCR method. *Mycopathologia* 2010; 169:193-9.
- 59- Bellete B, Raberin H, Morel J, et al. Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med Mycol* 2010; 48:197-200.
- 60- Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2116-8.
- 61- Kuipers S, Bruggemann RJ, de Sevaux RG, et al. Failure of posaconazole therapy in a renal transplant patient with invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* with attenuated susceptibility to posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3564-6.

- 62- Snelders E, Karawajczyk A, Verhoeven RJ, et al. The structure-function relationship of the *Aspergillus fumigatus* *cyp51A* L98H conversion by sitedirected mutagenesis: the mechanism of L98H azole resistance. *Fungal Genet Biol* 2011; 48:1062-70.
- 63- Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1481-3.
- 64- Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* 2002; 36:199-206.
- 65- Silva-Ferreira ME, Capellaro JL, Reis Marques E, et al. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4405-13.
- 66- Moore CB, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* 2000; 41:203–20.
- 67- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:291–321.
- 68- Manavathu EK, Vazquez JA, Chandrasekar PH. Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12:213-9.
- 69- Znaidi S, Deken X, Weber S, et al. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2007; 66:440-52.
- 70- Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhauser J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 2008; 69:827-40.
- 71- Dunkel N, Liu TT, Barker KS, et al. A gain of function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell* 2008; 7:1180-90.
- 72- Hoot SJ, Smith AR, Brown RP, White TC. An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:940-2.
- 73- Schubert S, Barker KS, Znaidi S, et al. Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2212-23.
- 74- Mogavero S, Tavanti A, Senesi S, Rogers PD, Morschhauser J. Differential requirement of the transcription factor Mcm1 for activation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump MDR1 by its regulators Mrr1 and Cap1. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2061-6.
- 75- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard (CLSI document M38-

- A2). 2nd edition. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 76- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arkan S, et al. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:982-4.
 - 77- Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cut-off values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 Document). *J Clin Microbiol* 2010; 48:3251-7.
 - 78- Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cut-offs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2468-72.
 - 79- Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009; 12:141-7.
 - 80- Heeres J, Backx LJ, van Cutsem J. Antimycotic azoles. Synthesis and antifungal properties of a series of novel triazol-3-ones. *J Med Chem* 1984; 27:894-900.
 - 81- van Cutsem J, van Gerven F, van de Ven MA, Borgers M, Janssen PA. Itraconazole, a new triazole that is orally active in aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26:527-34.
 - 82- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1364-8.
 - 83- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:401-14.
 - 84- Oakley KL, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1504-7.
 - 85- Chryssanthou E. In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. Acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis* 1997; 29:509-12.
 - 86- Verweij PE, Mensink M, Rijs AJMM, Donnelly JP, Meis JFGM, Denning DW. In vitro activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:389-92.
 - 87- Dannaoui E, Persat F, Monier MF, Borel E, Piens MA, Picot S. In-vitro susceptibilities of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:553-5.
 - 88- Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory

- Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009; 47:3142-6.
- 89- Amorim A, Guedes-Vaz L, Araujo R. Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:396-9.
 - 90- Verweij PE, Te Dorsthorst DTA, Rijs AJMM, De Vries-Hospers HG, Meis JFGM. Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2648-50.
 - 91- Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009; 9:789-95.
 - 92- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, et al. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *PLoS ONE* 2012; 7:e52871.
 - 93- van Linden JWM, Arendrup MC, Verweij PE, et al. Prospective international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: SCARE-Network. Abstract M-490. In: 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL; 2011.
 - 94- Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the cyp51A gene. *Antimicrobial Agents Chemother* 2011; 55:4465–8.
 - 95- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003633.
 - 96- Seyedmousavi S, Hashemi SJ, Zibafar E, et al. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Iran. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:832-3.
 - 97- van Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infec Dis* 2011; 17:1846-54.
 - 98- Delen N (ed). *Fungisitler*. Birinci baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2008.
 - 99- Efe Ş. Alt Solunum Yolu Örneklerinden Üretilen *Aspergillus* Türlerinin In Vitro Antifungal Duyarlılığının Mikrodilüsyon ve Etest Yöntemleriyle Araştırılması (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2007.
 - 100- Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *Plos Med* 2008; 5:e1629-37.
 - 101- Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* cyp51A based on protein homology modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2425-30.

- 102- Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N, Highsmith WE. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999; 20:1177-85.
- 103- Orita M, Iwahana H, Knazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of the polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natd Acad Sci* 1989; 86:2766-70.
- 104- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94:441-8.
- 105- Ma A, Zhuang X, Wu J, et al. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil. *PLoS ONE* 2013; 8:e66146.
- 106- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41:95-8.
- 107- Alanio A, Sitterlé E, Liance M, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:371–4.
- 108- Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, et al. Isolation of multiple triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:362–6.
- 109- Rath PM, Buchheidt D, Spiess B, et al. First reported case of azole resistant *Aspergillus fumigatus* due to the TR/L98H mutation in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:6060–1.
- 110- Verweij PE, van Lee HAL, Rijs AJMM. The role of conventional diagnostic tools. In: Maertens JA, Marr KA (eds). *Diagnosis of fungal infections*. New York: Informa Healthcare; 2007. 19–40.
- 111- Stensvold CN, Jørgensen LN, Arendrup MC. Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture. *Fungal Infect Rep* 2012; 6:178-91.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresinde bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Okan Töre ve Prof. Dr. Suna Gedikoğlu'na; her konuda yardımını, bilgisini ve cömertliğini esirgemeyen çok değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Güher Göral'a, bilimsel ve analitik düşünme konusunda bakış açımı zenginleştiren çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Beyza Ener'e, mesleki vizyonunu örnek aldığım, kıymetli hocam Prof. Dr. Cüneyt Özakin'a, asistanlığım boyunca bana yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. H. Barbaros Oral, Doç. Dr. Melda Sınırtaş, Doç. Dr. Ferah Budak, Doç. Dr. Oktay Alver, Yrd. Doç. Dr. Harun Ağca'ya; mesleğimin klinik ayağı ile ilgili bilgilerimin olgunlaşmasında faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Safiye Helvacı, Prof. Dr. Reşit Mistik, Prof. Dr. Halis Akalın, Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç. Dr. Emel Yılmaz, Uzm. Dr. Esra Kazak'a; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Burcu Dalyan Cilo, Dr. Saliha Sanem Geçgel, Dr. Özdemir Özkan, Dr. Bülent Özbek, Dr. Fatma Tuğba Dinç, Dr. Fatih Dinç, Dr. Tuncay Topaç, Dr. Sezcan Sağlam, Dr. Kadir Efe ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm asistanlarına; laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı laboratuvardaki tüm çalışma arkadaşlarıma;

Ayrıca hayatım boyunca her türlü emeğini, desteğini ve sevgisini koşulsuz sunan canım anneme ve babama, tanıştığımız andan itibaren beni benden daha fazla düşünen ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim, Dr. Çağdaş Gökhan Özmerdiven'e sonsuz teşekkürler ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülşah Ece Özmerdiven

Doğum Yeri ve Tarihi: Mersin, 22.04.1984

Medeni Durumu: Evli

Ünvanı: Doktor

Yabancı Dili: İngilizce

Yazışma Adresi, Tel, e-posta:

100. Yıl Mah. 522. Sok. Furkan Sitesi B Blok. Kat.4 No:9

Nilüfer, Bursa

Tel: (0 537) 8587207

e-posta: ecesaygili@yahoo.com

Eğitimi:

2009-2014 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD - Bursa

2003-2008 Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi - Edirne

1996-2002 İçel Anadolu Lisesi - Mersin

1991-1995 Barbaros İlköğretim Okulu - Mersin

Uzmanlık Tezi: Hasta örneklerinde izole edilen *Aspergillus fumigatus* suşlarında azol direncinin saptanması

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beyza Ener