Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2025;59(3):376-385*/doi: 10.5578/mb.202503136

Geliş Tarihi (Received): 03.10.2024 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.05.2025

Candida parapsilosis İzolatlarında ERG11 ve MRR1 Direnç Genlerinin Araştırılması

Investigation of ERG11 and MRR1 Resistance Genes in *Candida parapsilosis* Isolates

Özge KURT[1] (ID), Mert Ahmet KUŞKUCU[1,2] (ID), Zeynep YAZGAN[1] (ID), Neşe ARSLAN[1] (ID), Gökhan AYGÜN[1] (ID), Ömer KÜÇÜKBASMACI[1] (ID)

[1]İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[1]İstanbul University-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

[2]Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[2]Koç University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

**Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TYL-2021-36179*

***Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.*

Makale Atıfı: *Kurt Ö, Kuşkucu MA, Yazgan Z, Arslan N, Aygün G, Küçükbasmacı Ö. Candida parapsilosis izolatlarında ERG11 ve MRR1 direnç genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2025;59(3):376-385.*

ÖZ

Candida parapsilosis, özellikle kan kültürlerinden izole edilen önemli fungal patojenlerden biridir. Son yıllarda birçok bölgede merkezler arasında farklılıklar gösterse de kandidemi tedavisinde en sık tercih edilen flukonazole karşı direnç dikkat çekmektedir. Bu artış, enfeksiyon kontrolünü zorlaştırmakta ve tedaviyi olumsuz etkilemektedir. *C.parapsilosis*'te ERG11'de kodon 132 Y/F değişimi baskın mekanizma olarak kabul görmekte ve MRR1'de bazı amino asit değişimlerinin de dirence katkısı olabileceği bildirilmektedir. Bu çalışmada merkezimizde izole edilen *C.parapsilosis* sensu stricto'larda ERG11 ve MRR1 azol direnç mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Kandidemi hastalarından elde edilen 2018 ve 2019 yıllarına ait 30 *C.parapsilosis* sensu stricto'nun sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle flukonazole duyarlılıkları test edilmiş ve koloni polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yaklaşımıyla amplifiye edilerek seçilen bölgelere DNA dizi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda ERG11'de bir duyarlı izolatta Y132F mutasyonu, dirençli izolatlarda Y132F, G307A, K143R mutasyonları; MRR1'de duyarlı izolatta R405K ve dirençli izolatlarda G927C mutasyonu tespit edilmiştir. ERG11'de saptanan R398I mutasyonu ise doza bağımlı duyarlı ve duyarlı izolatlarda tespit edilmiştir. Y132F mutasyonu primer mekanizma ve en sık bulunan mutasyon olmasına rağmen potansiyel mekanizmalar ihmal edilmemelidir. Çalışmada, dirençli izolatlarda tespit edilen G307A ve G927C mutasyonlarının, bazı örneklerde tek mutasyon olarak bulunduğu gözlemlenmiştir. Duyarlı izolatlarda ise R398I mutasyonu yalnız başına saptanmıştır. Bu mekanizmaların anlaşılmasına yönelik çalışmalar tedavi stratejilerinin doğru geliştirilmesine fayda sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Candida parapsilosis; ERG11; flukonazol; MRR1; NGS.*

ABSTRACT

Candida parapsilosis is an important fungal pathogen that is particularly isolated from blood cultures. In recent years, although there are regional differences between centres, resistance to fluconazole which

İletişim (Correspondence): *Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (532) 335 1600,* ***E-posta (E-mail):*** *obasmaci@iuc.edu.tr*

is the most commonly preferred drug for candidemia, has increased in many regions. This increase complicates infection control and adversely affects treatment. In *C.parapsilosis*, codon 132 Y/F change in ERG11 is accepted as the dominant mechanism and it is reported that some amino acid changes in MRR1 may also contribute to resistance. In this study, we aimed to elucidate the azole resistance mechanisms of ERG11 and MRR1 in *C.parapsilosis* sensu stricto isolated in our centre. 30 *C.parapsilosis* sensu stricto obtained from patients with candidemia in 2018 and 2019 were tested for susceptibility to fluconazole by broth microdilution method and amplified by colony polymerase chain reaction approach and DNA sequence analysis was performed on selected regions. As a result of the analysis, Y132F mutation was identified in one susceptible isolate while Y132F, G307A and K143R mutations were detected in resistant isolates in ERG11; R405K mutation was detected in one susceptible isolate whereas G927C mutation was observed in the resistant isolates in MRR1.R398I mutation in ERG11 was detected in dose-dependent susceptible and sensitive isolates. Although Y132F mutation is the primary mechanism and the most frequently detected mutation, potential mechanisms should not be neglected. In our study, the G307A and G927C mutations detected in resistant isolates were observed as single mutations in some of the samples. Similarly, the R398I mutation in susceptible isolates was identified alone. Studies aimed at elucidating these mechanisms will contribute to the proper development of therapeutic strategies.

Keywords: *Candida parapsilosis; ERG11; fluconazole; MRR1; NGS.*

GİRİŞ

İnvaziv *Candida* enfeksiyonları yüksek oranda ölüm oranlarına sahiptir ve dünya çapında birçok insanı etkilemiştir[1]. Etken olarak saptanan baskın türler bölgelere göre farklılık göstermektedir[2]. Ülkemizde kan kültüründen en sık izole edilen ilk iki *Candida* türünden biri olan *Candida parapsilosis*; son yıllarda, özellikle yoğun bakım ve yenidoğan ünitelerinde sıklıkla hastane enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilmekte ve kontamine tıbbi ekipmanlar ve sağlık çalışanları aracılığıyla hastalar arasında kolayca yayılabilmektedir[3-6]. Çevresel kaynaklardan izole edilmesinin yanı sıra insan gastrointestinal sisteminin de doğal bir üyesidir.

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisinde azoller birinci basamak tedavi olarak önerilirken, artık azollere karşı direnç, ampirik antifungal tedavinin yönetiminde alternatif ajanlara doğru değişimi hızlandırmaktadır[7]. Azoller, ERG11 geni tarafından üretilen, sitokrom P-450'ye bağımlı enzim lanosterol demetilazı (14-α sterol demetilaz veya P-450 DM) inhibe ederek etki gösterirler[8,9]. Gelişen direnç mekanizmaları *Candida* türleri arasında farklılık göstermektedir. İlacın hedef enzimini kodlayan ERG11'de meydana gelen bazı değişiklikler, *C.parapsilosis*'te de gösterilmiştir[10]. Buna ek olarak, membran taşıyıcılarından biri olan MFS taşıyıcılarını kodlayan MDR1'in ekspresyon seviyelerindeki artış, artmış atım pompası etkisiyle dirence katkıda bulunabilir. MRR1 transkripsiyon faktöründeki bazı mutasyonların da MDR1'in ekspresyon seviyesindeki artışlarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir[11].

Nozokomiyal enfeksiyonların en sık saptanan fungal etkenlerinden biri olan *C.parapsilosis* için etkin tedavi planlarının ve kontrol stratejilerin geliştirilebilmesi gerekir. Primer tedavide sıklıkla azol grubu antifungaller, özellikle flukonazol tercih edilmektedir ve bu gruba karşı gelişen direnci ve mekanizmalarını anlamak oldukça önemlidir. ERG11 bölgesindeki Y132F mutasyonu literatürde primer mekanizma olarak geniş çapta kabul edilmekle birlikte, farklı mutasyonlara ilişkin çeşitli raporlar da bulunmaktadır. MRR1 gen bölgesi ve bunun azol direncine etkileri hakkında mevcut veriler sınırlıdır. Bu bağlamda, çalışmada flukonazol dirençli *C.parapsilosis* izolatlarında ERG11 ve MRR1 bölgelerindeki mutasyonların araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, koloni polimeraz

zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yaklaşımı ve yeni nesil dizileme yöntemiyle daha pratik ve maliyet etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 11.10.2021 ve Karar no: 205294).

Tek merkezli ve kesitsel olan bu çalışmaya, merkezimizin çeşitli servislerinde ve yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde yatan kandidemi hastalarından elde edilen *C.parapsilosis* izolatları dahil edildi. Çalışmaya her hastanın kan kültüründe üreyen tek bir izolat alındı. Bu izolatlar, daha önceden matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption ionization-time of light mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] (Bruker, Almanya) kullanılarak tanımlanmış ve ITS1-2 bölgesi analiziyle doğrulanmıştır[12]. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikoloji Laboratuvarında yürütülen bu çalışmada 2018 ve 2019 yıllarına ait -70 °C'de saklanan izolatlar çözdürülerek Sabouraud dekstroz agara (Biolab, Macaristan) pasajlandı. Duyarlılık testi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] önerilerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı ve değerlendirmeler CLSI M27M44S-ED3:2022 doğrultusunda yapıldı[13,14]. Kontrol suşu olarak *C.parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı.

ERG11 ve MRR1 Genlerinin Amplifikasyonu, Kütüphane Hazırlanması

ERG11 ve MRR1 gen bölgeleri ''outer'' primer çiftleri (ERG11 için, CPERG11F, CTT AGT AGT GGG ATC GGT GGA ve CPERG11R CAT TCT GCA TTA AAC CCC ATT GA ve MRR1 için, MRR1-F, CTG TAT GGA GAG TGA GAT ve MRR1-R, GTT ACA GGT GTA TAG TGG) kullanılarak amplifiye edildi[15]. ''Single round'' koloni PCR yaklaşımı, iProof™ High-Fidelity DNA polimeraz (BioRad, Almanya) ile son hacim 20 µL olacak şekilde gerçekleştirildi. Isı döngüsü; üç dakika 98 °C'de başlangıç denatürasyonu ardından, 30 saniye 95 °C'de denatürasyon, 30 saniye 52 °C'de primer birleşmesi ve iki dakika 72 °C'de uzama olmak üzere 40 döngü şeklinde gerçekleştirildi. Amplikonların kontrolü için agaroz jel elektroforezi uygulandı. ERG11 için 1569 baz çifti [base pair (bp)] ve MRR1 için 3312 bp'lik bantlar oluşturan örnekler pozitif olarak değerlendirilerek dizilemeye dahil edildi. Kütüphane hazırlığı için Nextera XT Library Prep Kit (96 Örnek) ve Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indeks-19 örnek) (Illumina, Amerika Birleşik Devletleri), veri toplamak için Miniseq Sekanslama Sistemi (Illumina, ABD) kullanıldı.

Biyoinformatik Analiz

Analiz için cihazdan elde edilen ham okuma verileri (*.fastq dosyaları) kullanıldı. Burrows-Wheeler Aligner (bwa) paketiyle indekslenen hizalama amacıyla ERG11 geni için KY967266 ve MRR1 geni için MT019524 dizisi referans olarak alındı ve bwa'nın maksimum kesin eşleşme (MEM) parametresi kullanılarak hizalama yapıldı[16]. Hazırlanan hizalama dosyasının sıralama işlemi samtools paketi "sort" parametresiyle gerçekleştirildikten sonra elde edilen sıralanmış ve hizalanmış dosyadan ortak dizinin (consencus sequence) oluşturulması i-Var paketiyle kalite düzeyi Q= 20 ve varyant düzeyi %20 olacak biçimde gerçekleştirildi[17,18]. Tüm bu işlem hatları, Linux ortamında (Ubuntu 20.04.2) Perl diliy-

le yazılmış bir yazılım paketinde (DeepM Aligner, CP_ERG11_MRR1) bir araya getirildi. Her örnek için elde edilen ortak dizi *.fasta uzantısıyla kaydedildikten sonra örneklere ait dizilerin birleştirilmesi ve toplu hizalaması BioEdit 7.2.5 (Ibis Therapeutics) yazılımıyla gerçekleştirildi. Yine elde edilen DNA dizilerinin protein translasyon işlemleri BioEdit 7.2.5 yazılımıyla gerçekleştirildi[19].

İstatistiksel Analiz

Sıvı mikrodilüsyon testiyle elde edilen minimum inhibisyon konstantrasyon (MİK) değerlerinin minimum, maksimum ve medyan değerleri, IBM SPSS İstatistikleri (v27.0) (Armonk, New York, ABD) kullanılarak hesaplandı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen *C.parapsilosis i*zolatlarının 15'i YBÜ, 15'i ise servisteki hastalardan izole edilmiştir. Toplam 30 izolatın 16'sı flukonazole dirençli, ikisi doza bağımlı duyarlı, 12'si ise flukonazole duyarlı saptanmıştır.

ERG11 ve MRR1 genlerinin amplifikasyonu sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforeziyle analiz edilmiştir ve 30 izolat pozitif saptanarak dizileme aşamasına alınmıştır. Dizileme yöntemi uygulanan 30 izolatın %70 (n= 21)'inde amino asit değişimi saptanmıştır. ERG11 genine ait amino asit değişimi incelendiğinde; 30 izolatın %40 (n= 12)'ında kodon 132 Y/F değişimi, %20 (n= 6)'sinde kodon 143 K/R değişimi, %30 (n= 9)'unda kodon 307 G/A değişimi, %13 (n= 4)'ünde kodon 398 R/I değişimi tespit edilmiştir.

MRR1 genine ait amino asit değişimi incelendiğinde sadece iki bölgede değişim saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 30 izolatın %3.3 (n= 1)'ünde kodon 405 R/K değişimi, %13.33'ünde 927 G/C değişimi saptanmıştır. İzolatlarda tespit edilen mutasyonlar ve flukonazol MİK değerleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I. *Kökenlere Ait Flukonazol MİK Değerleri ve Saptanan Mutasyonlar*

Mutasyonlar			
ERG11	**MRR1**	**MİK (mg/L)**	**Örnek No**
Y132F+G307A	TE	> 32	S2, S10, S11, S14, S23, S27, S29, S30
Y132F+K143R	TE	> 32	S9, S20, S21
K143R	G927C	> 32	S19, S26, S28
G307A	TE	> 32	S4
Y132F	R405K	2	S5
		4	S3
R398I	TE	0.125	S7
		1	S16, S24
TE	G927C	> 32	S13

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, S: Sample, TE: Tespit edilmedi.

Yoğun bakım hastalarına ait izolatların MİK açısından minimum değeri 0.25 mg/L, maksimum değeri > 256 mg/L ve medyan değeri > 256 mg/L'dir. Serviste yatan hastalardan elde edilen izolatların ise minimum MİK değeri 0.38 mg/L, maksimum MİK değeri > 256 mg/L, medyan değeri 2 mg/L olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

C.parapsilosis sensu stricto (bu aşamadan itibaren *C.parapsilosis* olarak bahsedilecektir), *Candida metapsilosis* ve *Candida orthopsilosis* ile birlikte *C.parapsilosis* kompleksi olarak ifade edilmektedir. Kompleks içinde *C.parapsilosis*, klinik örneklerden en yaygın şekilde izole edilen türdür ve bu sebeple, sıklıkla direnç sorunlarıyla ilişkilendirilir[3]. Dirençli izolatları saptayabilmek için önerilen referans yöntem; Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] ve CLSI tarafından standardizasyonu yapılan sıvı mikrodilüsyon yöntemidir. Sanger dizileme veya yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak belirli gen bölgelerindeki (ERG11, ERG3, MDR1, MRR1 gibi) değişiklikler veya kantitatif gerçek zamanlı PCR [quantitative real-time PCR (qPCR)] ile ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılarak son yıllarda direnç mekanizması aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Candida türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları dünya çapında hastane enfeksiyonlarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır[20]. İmmünsupresif hasta sayısının artması ve profilaktik ilaçların aşırı kullanımına bağlı olarak artan *Candida* enfeksiyonları, tespit edilen *Candida* türleri arasındaki dengeyi bozmakta ve bazı bölgelerde *Candida albicans* dışı (NAC) türlerinin sayısı artmaktadır[2,21,22]. 1997-2016 yılları arasında 39 ülkenin katılımıyla yürütülen SENTRY Antifungal Sürveyans Programı'nın sonuçlarına göre; *C.parapsilosis*, en çok rastlanan üç *Candida* türünden biridir ve Latin Amerika'da NAC'lar arasında birinci sıradadır[2]. Türkiye'de tek merkezli çalışmalar daha yaygındır ve izolasyon sıklığı merkezlere göre değişim göstermektedir. Ancak merkezlere bağlı olarak genellikle *C.parapsilosis* kan kültüründen en çok izole edilen ilk iki *Candida* türü arasında gösterilmektedir[4-6]. Yakın zamanda gerçekleştirilen ve YBÜ hastalarında kandidemi dağılımını inceleyen bir çalışmada ise *C.parapsilosis* %28'lik oranla *C.albicans* (%32)'tan sonra ikinci sırada etken olarak saptanmıştır[23]. Bu kapsamda merkezimizdeki duyarlı ve dirençli kökenlerdeki moleküler farklılıkların araştırılması çalışmanın odak noktasıdır.

Flukonazolün birçok ülkede birincil tedavi olarak yaygın şekilde kullanılması, antifungal direnç konusunu gündeme getirmiştir. SENTRY raporunda *C.parapsilosis* suşlarının flukonazol direnç oranları (%0.6-%4.6) bölgesel olarak farklılık göstermiş ve genel direnç oranı %3.9 (95/2433) olarak belirtilmiştir[2]. Yakın zamanda, Hubler ve arkadaşlarının çalışmasında[24] 2018-2021 yılları arasında SENTRY Antifungal Sürveyans Programı'na gönderilen flukonazole dirençli *C.parapsilosis* izolatlarının karşılaştırmalı analizleri paylaşılmış ve 30 ülkeyi kapsayan bu geniş çaplı çalışmada genel direnç oranı Türkiye'de %11.3 (125/1103) ve %25.8 (8/31) olarak bildirilmiştir. Türkiye'deki 12 üniversite hastanesinin katılımıyla yürütülen bir çalışmada *C.parapsilosis* kompleksi (n= 575) izolatlarının duyarlılığı merkezler arasında farklılık göstermiş, flukonazole karşı genel direnç oranı

%7.7 ile sıklıkla azol direncinin saptandığı *C.glabrata*'yı geride bırakmıştır[25]. *C.glabrata*'da çeşitli bölgelerde flukonazol direnç oranları daha yüksek olmasına rağmen ülkemizde bu direncin prevalansı *C.parapsilosis*'e kıyasla daha düşüktür[2,25].

ERG11'deki Y132F mutasyonu (lanosterol 14-a-demetilaz enziminin bağlanma afinitesini değiştirebilen), literatürde *C.parapsilosis* azol direnci ile ilişkili en yaygın mutasyondur[26]. Buna ek olarak, dirençli suşlarda tek başına veya Y132F ile kombinasyon halinde başka mutasyonların varlığı da gösterilmiştir. Öte yandan azol direnciyle ilişkili bir diğer mekanizma da atım pompası etkisi sağlayan membran taşıyıcılarını kodlayan genlerde artan şekilde bazı mutasyonların meydana gelmesidir[10,20]. Bu çalışmada sadece direnç mekanizmalarıyla potansiyel bağlantısı olan ERG11 ve MRR1 gen bölgelerine odaklanılmıştır.

Bu çalışmada ERG11'de birkaç (Y132F, K143R, G307A, R398I) mutasyon tespit edilmiştir ve Y132F mutasyonu (dirençli 16 izolatın 11'inde ve bir duyarlı izolatta) en sık tespit edilen mutasyondur. Y132F mutasyonunun yanı sıra; G307A (9/16), Y132F+G307A (8/16), K143R (3/16), Y132F+K143R (3/16), R398I mutasyonları da tespit edilmiştir. Dikkate değer şekilde son yıllarda dirençli *C.parapsilosis* izolatlarında, Y132F mutasyonu birçok ülkeden bildirilmektedir [Güney Kore (30/47), Kuveyt (5/11), İtalya (40/49), İspanya (43/48)] ve bu mutasyon flukonazole duyarlı izolatların hiçbirinde gözlenmemiştir[15,27-29]. Yakın zamanda çok sayıda ülkenin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise dirençli izolatların %83.2 (n= 125)'sinde Y132F tespit edilmiştir[24].

Bu çalışmada, ERG11 bölgesinde tespit edilen Y132F+ G307A (8/16) kombinasyonu en sık tespit edilen mutasyonlardan biridir. Bu örneklerin ait olduğu hastaların merkezimizde bulundukları birim ve zaman değerlendirilmiştir. Sekiz hastadan dördü aynı sene içinde birbirine oldukça yakın birimlerde bulunmuştur ve bu birimlerde çalışan ekip aynı ekiptir. Y132F+G307 kombinasyonunun sık saptanma sebebinin hastanede gerçekleşen bir klonal yayılımla ilgili olması muhtemeldir. Ancak klonal ilişki bu çalışma kapsamında araştırılmamıştır. Öte yandan, dirençli bir izolatta tek başına G307A mutasyonu tespit edilmiştir ve MRR1 gen bölgesinde de herhangi bir mutasyon görülmemiştir (Tablo I). Bilindiği kadarıyla daha önceki araştırmalarda G307A mutasyonunun tekil varlığı bildirilmemiştir. Türkiye'de Y132F ile klonal salgına ilişkin ilk rapor 2020 yılında Arastahfer ve arkadaşları tarafından[30] rapor edilmiş ve Y132F (24/60), Y132F+ K143R (19/60) kombinasyonu tespit edilmiştir. Aynı ekip daha sonraki araştırmalarında ise Y132F ve K143R dışında başka mutasyonlar da bildirmişlerdir [Y132F (17/28), G458S (4/28), Y132F+G307A (3/28) ve G307A+G458S (1/28)]. Yaptıkları çalışmada ''multilocus microsatellite typing'' analizine göre Y132F ve Y132F+G307A içeren dirençli izolatlar genetik olarak benzer kümeler içerisinde bulunmuştur[31].

Bu çalışma kapsamında ERG11 bölgesinde tespit edilen diğer mutasyonlar K143R ve R398I'dır. Dirençli izolatlarda tespit edilen K143R mutasyonu, duyarlı izolatlarda saptanmamıştır ve bazı izolatlarda Y132F ile kombinasyon halinde bulunmuştur (Tablo I). Öte yandan, R398I mutasyonu duyarlı ve doza bağımlı duyarlı izolatlarda saptanmış ve bu izolatlar R398I dışında ek başka bir mutasyon sergilememiştir (Tablo I). Bulgular, R398I

mutasyonunun düşük MİK değerleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, diğer mutasyonların aksine R398I mutasyonun direnç gelişimi üzerinde belirleyici bir etkisi olmayabileceğini düşündürmektedir. K143R ve R398I mutasyonları daha önce Hindistan, İtalya, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye'den gelen raporlarda bildirilmiştir[28,30,32,33]. Hindistan'daki çalışma dirençli kökenlerde ağırlıklı olarak K143R mutasyonunun varlığını belirttiği için dikkat çekicidir[32]. Bununla birlikte, bu mutasyonlar günümüze kadar hem dirençli hem de duyarlı izolatlarda bazen de Y132F ile birlikte gösterilmiştir. Öte yandan, R398I tipik olarak duyarlı izolatlarla ilişkilendirilir ve bazı çalışmalarda Y132F ile kombinasyon halinde bulunmaktadır[28,33].

Öncü bir çalışmada flukonazol, vorikonazol ve posakonazole maruz bırakılarak in vitro direnç geliştiren *C.parapsilosis* izolatlarında, flukonazol ve vorikonazole maruz kalan suşlarda her iki ilaca da direnç gelişmiş ancak sadece posakonazol için MİK değerlerinin arttığı görülmüştür. Flukonazol ve vorikonazole maruz kalan dirençli suşların MRR1 dizilimi duyarlı suşlarla karşılaştırılmış ve G583R ve K873N mutasyonları tespit edilmiştir[34]. Silva ve arkadaşları[34] bu mutasyonların MDR1 ekspresyon seviyelerini artırabileceğini öne sürmüştür. Daha sonra Grossmann ve arkadaşları[35] MRR1 dizilimi ve MDR1 ekspresyon düzeylerini inceledikleri araştırmalarında MRR1'de beş mutasyon tespit etmiştir. Tespit ettikleri mutasyonlardan biri olan A619V'ye sahip dirençli bir izolatta 16 kat artmış MDR1 seviyesi ve doza bağlı duyarlı bir izolatta 10 kat artmış ekspresyon seviyesi bulmuştur. Üstelik MRR1'deki polimorfizmlerin yaygın olduğunu ve bazılarının MDR1'de aşırı ekspresyona neden olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada, MRR1 geni üzerinde yapılan incelemelerde yalnızca R405K ve G927C tespit edilmiştir. Ancak MDR1'in ekspresyon seviyeleri bu çalışmaya dahil edilmemiştir.

Bugüne kadar MRR1 sekanslarında K177N, G927D, G927C, S614P, G982R gibi çeşitli mutasyonların varlığı bildirilmiştir[27,36,37]. Son yıllarda Türkiye'de yapılan bir çalışmada flukonazole dirençli suşların MRR1 geninde R405K (26/46) ve G927C (4/46) rapor edilmiştir. Aynı araştırma kapsamında flukonazole dirençli izolatların çoğunda ERG11 bölgesinde Y132F (33/46) mutasyonu tespit edilirken, bunu sırasıyla G458S (5/46) ve D421N (2/46) mutasyonları izlemiştir[36]. Çalışmada sadece dört dirençli izolatta ve bir duyarlı izolatta MRR1 bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir (Tablo I). G927C barındıran dirençli izolatlar, ERG11 bölgesindeki K143R mutasyonu ile kombinasyon halinde bulunmuştur. Geriye kalan bir dirençli izolatın ERG11 bölgesinde başka mutasyon bulunmamıştır. G927C taşıyan bu örnekte MİK değerinin > 32 mg/L olması dikkat çekicidir. Duyarlı bir izolat, Y132F ile birlikte R405K'yı barındırmaktadır. Çalışmada MRR1 genindeki R405K mutasyonunun yalnızca ilgili kökende bulunduğu saptanmıştır. Bu mutasyonun ilgili kökendeki fenotipik özelliklerle bağlantısı, mekanizmalara yönelik farklı bir perspektif sunabilir. Yine de genotipik farklılıkların her zaman fenotipe doğrudan yansımadığı bilinmektedir. Bununla birlikte, fenotipik özellikler yalnızca incelenen genotipik değişikliklerle değil, aynı zamanda çalışmada değerlendirmeye alınmayan farklı genetik faktörlerin etkileşimiyle de şekillenebilmektedir. Bu nedenle, ilişkilerin tam olarak anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar oldukça elzemdir. Benzer şekilde Demirci ve arkadaşları[36] tarafından da daha önce R405K mutasyonu saptadıkları 26 izolatın da Y132F'yi barındırdığı ve MİK değerlerinin değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, 2018-2019 yılları arasında kan kültürü örneklerinden izole edilen 30 *C.parapsilosis* izolatı değerlendirilmiştir. Mutasyon tespit edilen 21 izolatın %95.2'sinin ERG11'inde, %23.8'inin MRR1 bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan koloni PCR yöntemi, başarılı ve güvenilir bir yöntem olup, direkt ekstraksiyon gerektirmeden incelenecek bölgenin fragmente edilmeden tüm genin amplifikasyonunu sağlaması açısından önemli bir avantaj sunmaktadır. Bu yaklaşımı, özellikle yeni nesil dizileme (NGS) için kütüphane hazırlığında daha az karmaşık bir süreç ve düşük maliyet avantajı sağlaması nedeniyle mevcut tekniklere kıyasla daha verimli ve maliyet-etkin bir yaklaşım ortaya koymaktadır. Nitekim, bu yöntem sayesinde NGS, tek seferde tüm hedef bölgeyi kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiş ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ayrıca, analiz sürecinde biyoinformatik değerlendirme için özel olarak tasarlanmış bir "pipeline" oluşturulmuş ve bu çalışma kapsamında özgün bir şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte, MRR1 geninde mutasyon taşıyan izolat sayısı, çalışmanın bilimsel olarak anlamlı olması için yeterli örneklem sayısına ulaşamadığı için, MDR1 ekspresyon profillerinin detaylı incelenmesi mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak, çalışmada ERG11 (Y132F, K143R, G307A, R398I) ve MRR1 (R405K, G927C) genlerinde mutasyonlar tespit edilmiştir. Dirençli izolatlarda en sık rastlanan Y132F mutasyonu, literatürde flukonazol direncinin baskın mekanizması olarak kabul görmesine rağmen çalışmada dirençli izolatlarda tek başına Y132F mutasyonu tespit edilmemiştir. Buna karşılık, dirençli tespit edilen iki izolatta; ERG11'de G307A mutasyonu, MRR1'de G927C mutasyonu tek başına saptanmıştır. *C.parapsilosis* izolatlarında direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik yapılacak çalışmaların, tedavi stratejilerinin doğru geliştirilmesine fayda sağlaması beklenmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar tarihi: 11.10.2021 ve Karar no: 205294).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. Nat Commun 2018; 9(1): 5135. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07556-5
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for Candida species from 1997-2016. Open Forum Infect Dis 2019; 6(Suppl 1): S79-S94. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358
3. Guo J, Zhang M, Qiao D, Shen H, Wang L, Wang D, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis species complex in Eastern China: A 15-year retrospective study by ECIFIG. Front Microbiol 2021; 12: 644000. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644000
4. Kılınçel Ö, Akar N, Karamurat ZD, Çalışkan E, Öksüz Ş, Öztürk CE, et al. Distribution and antifungal susceptibility of Candida species isolated from blood cultures. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2018; 48(4): 256-62. https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.256

5. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Retrospective evaluation of distribution and antifungal susceptibilities of Candida species isolated from blood cultures. ANKEM Derg 2015; 29(4): 105-13. https://doi.org/10.5222/ankem.2015.0105
6. Tümtürk A. Distribution of species and antifungal resistance in candidemia cases observed in intensive care unit: A single-center experience. NWSA Acad J 2020; 15(1): 26-34. https://doi.org/10.12739/NWSA.2020.15.1.1B0087
7. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2016; 62(4): e1-e50. https://doi.org/10.1093/cid/civ933
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 9th ed. Philadelphia (PA): Elsevier; 2020.
9. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. Biochem Pharmacol 2017; 133: 86-96. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019
10. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. Clin Microbiol Infect 2019; 25(7): 792-8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028
11. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. Antibiotics 2020; 9(6): 312. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312
12. Hasanlı M. Kan kültüründe üreyen Candida parapsilosis'lerin antifungal duyarlılığı ve klonal ilişkilerinin araştırılması. İstanbul: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa; 2021.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
15. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Epidemiology and molecular basis of resistance to fluconazole among clinical Candida parapsilosis isolates in Kuwait. Microb Drug Resist 2017; 23(8): 966-72. https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0336
16. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 2009; 25(14): 1754-60. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324
17. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. Gigascience 2021; 10(2): giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008
18. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. Genome Biol 2019; 20(1): 8. https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7
19. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 1999; (41): 95-8.
20. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. Candida parapsilosis: from genes to the bedside. Clin Microbiol Rev 2019; 32(2): e00111-8. https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18
21. Pfaller MA, Carvalhaes C, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M. Activity of a long-acting echinocandin, rezafungin, and comparator antifungal agents tested against contemporary invasive fungal isolates (SENTRY Program, 2016 to 2018). Antimicrob Agents Chemother 2020; 64(4): e00099-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00099-20
22. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of Candida bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3435-42. https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12
23. Mete B, Zerdali EY, Aygun G, Saltoglu N, Balkan II, Karaali R, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2021; 40(2): 325-33. https://doi.org/10.1007/s10096-020-03994-6

24. Hubler CM, Carvalhaes CG, Castanheira M. Recent increase in fluconazole-nonsusceptible Candida parapsilosis in a global surveillance with the expansion of the ERG11 Y132F genotype and a rapid detection method for this alteration. Diagn Microbiol Infect Dis 2023; 106(3): 115957. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115957

25. Arikan Akdagli S, Gülmez D, Doğan Ö, Çerikçioğlu N, Doluca Dereli M, Birinci A, et al. First multicentre report of in vitro resistance rates in candidaemia isolates in Turkey. J Glob Antimicrob Resist 2019; 18: 230-4. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.003

26. Escribano P, Guinea J. Fluconazole-resistant Candida parapsilosis: A new emerging threat in the fungi arena. Front Fungal Biol 2022; 3: 1010782. https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1010782

27. Choi YJ, Kim YJ, Yong D, Byun JH, Kim TS, Chang YS, et al. Fluconazole-resistant Candida parapsilosis bloodstream isolates with Y132F mutation in ERG11 gene, South Korea. Emerg Infect Dis 2018; 24(9): 1768-70. https://doi.org/10.3201/eid2409.180625

28. Martini C, Torelli R, de Groot T, De Carolis E, Morandotti GA, De Angelis G, et al. Prevalence and clonal distribution of azole-resistant Candida parapsilosis isolates causing bloodstream infections in a large Italian hospital. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10: 232. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00232

29. Díaz-García J, Gómez A, Alcalá L, Reigadas E, Sánchez-Carrillo C, Pérez-Ayala A, et al. Evidence of fluconazole-resistant Candida parapsilosis genotypes spreading across hospitals located in Madrid, Spain and harboring the Y132F ERG11p substitution. Antimicrob Agents Chemother 2022; 66(8): e00710-22. https://doi.org/10.1128/aac.00710-22

30. Arastehfar A, Daneshnia F, Hilmioğlu Polat S, Fang W, Yaşar M, Polat F, et al. First report of candidemia clonal outbreak caused by emerging fluconazole-resistant Candida parapsilosis isolates harboring Y132F and/or Y132F+K143R in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2020; 64(10): e01001-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01001-20

31. Arastehfar A, Hilmioğlu Polat S, Daneshnia F, Pan W, Hafez A, Fang W, et al. Clonal candidemia outbreak by Candida parapsilosis carrying Y132F in Turkey: Evolution of a persisting challenge. Front Cell Infect Microbiol 2021;11:676177. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676177

32. Singh A, Singh PK, de Groot T, Kumar A, Mathur P, Tarai B, et al. Emergence of clonal fluconazole-resistant Candida parapsilosis clinical isolates in a multicentre laboratory-based surveillance study in India. J Antimicrob Chemother 2019; 74(5): 1260-8. https://doi.org/10.1093/jac/dkz029

33. Berkow EL, Manigaba K, Parker JE, Barker KS, Kelly SL, Rogers PD. Multidrug transporters and alterations in sterol biosynthesis contribute to azole antifungal resistance in Candida parapsilosis. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(10): 5942-50. https://doi.org/10.1128/AAC.01358-15

34. Silva AP, Miranda IM, Guida A, Synnott J, Rocha R, Silva R, et al. Transcriptional profiling of azole-resistant Candida parapsilosis strains. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7): 3546-56. https://doi.org/10.1128/AAC.01127-10

35. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida parapsilosis isolates from a U.S. surveillance system. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(2): 1030-7. https://doi.org/10.1128/AAC.04613-14

36. Demirci Duarte S, Arikan Akdagli S, Gülmez D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive Candida parapsilosis complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years. Mycoses 2021; 64(8): 823-30. https://doi.org/10.1111/myc.13296

37. Kim TY, Huh HJ, Lee GY, Choi MJ, Yu HJ, Cho SY, et al. Evolution of fluconazole resistance mechanisms and clonal types of Candida parapsilosis isolates from a tertiary care hospital in South Korea. Antimicrob Agents Chemother 2022; 66(11). https://doi.org/10.1128/aac.00889-22

Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.
Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.
©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.