

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

**KLİNİK *SAPROCHAETE* İZOLATLARININ TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI, İKİ FARKLI REFERANS YÖNTEMLE ELDE
EDİLEN ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Beyzanur KAŞALTI

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK *SAPROCHAETE* İZOLATLARININ TÜR DÜZEYİNDE
TANIMLANMASI, İKİ FARKLI REFERANS YÖNTEMLE ELDE
EDİLEN ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Beyzanur KAŞALTI

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ**

ANKARA

2022

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Klinik Saprochaete İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanımlanması ,İki Farklı Referans
Yöntemle Elde Edilen Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması ve
Virulans Faktörlerinin Araştırılması**

Öğrenci: Beyzanur KAŞALTI

Danışman: Prof.Dr.Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ

Bu tez çalışması 20.09.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Mikrobiyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr.Sevtap ARIKAN AKDAĞLI

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı:

Prof.Dr.Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr.Aydın KARAARSLAN

Ankara Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

28 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29.1.2022

(İmza)

BEYZANUR KASALTI

¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuraları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN SAYFASI**ETİK BEYAN**

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Beza Nur KASALTI

TEŞEKKÜR

Tüm eğitimim boyunca hem bana kattığı bilgiler için hem de tez çalışmam boyunca her olumsuz anda bana destekleri için, tezin her aşamasında emekleriyle, özverisiyle beni yalnız bırakmayan tez danışmanım Prof. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç'a, Bilgisini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sevtap Arıkan-Akdağlı'ya, Neşesi ve azmiyle örnek olan, sorgulamadan yapmamı sağlayan, tezin yapım aşamasında çok büyük yardımları ve desteği olan Dilek Çakmak'a Tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, Şebnem Budak'a Destek ve yardımlarını esirgemeyen Mevlüde Sarı'ya Beni yalnız bırakmayan hep destekleyen, anne, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Beyzanur KAŞALTI

ÖZET

Beyzanur KAŞALTI, Klinik *Saprochaete* İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanımlanması, İki Farklı Referans Yöntemle Elde Edilen Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması Ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara,2022. *Saprochaete* türleri, özellikle, bağışıklığı

baskılanmış hastalarda ölümle sonuçlanabilen enfeksiyonlara neden olabilen ve nozokomiyal salgınlara yol açabilen fırsatçı patojenlerdir. Virülans faktörleri ile ilgili bilgiler sınırlıdır ve antifungal duyarlılık testleri henüz standardize edilmemiştir. Bu çalışmada klinik *Saprochaete* izolatlarının tür tanısının doğrulanması, virülans faktörlerinin fenotipik yöntemlerle araştırılması ve iki farklı referans antifungal duyarlılık testi ile duyarlılık durumunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Birimi'nde konvansiyonel olarak *Saprochaete* türü olarak tanımlanan 57 izolat dâhil edilmiştir. Tür düzeyinde tanımlama MALDITOF-MS ve dizi analizi ile doğrulanmıştır. Koagülaz, hemoliz, fosfolipaz, salgısal asit proteinaz ve esteraz aktivitesi ve biyofilm oluşturma yeteneği test edilmiştir. Amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve mikafungin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerilerine uygun olarak belirlenmiştir. Çalışmadaya alınan izolatların 53'ü *Saprochaete capitata* 4'ü *Saprochaete clavata* olarak tanımlanmıştır Tüm izolatlar koagülaz, hemoliz, fosfolipaz, asit proteinaz negatiftir. Esteraz pozitifliği tüm izolatlar için %56,1'dir. Tüm izolatlar kristal viyole ve XTT yöntemleriyle güçlü biyofilm pozitif bulunmuştur. Antifungal duyarlılık testlerinde MIC₉₀ değerleri CLSI ve EUCAST için sırasıyla amfoterisin B için 2 g/mL ve 1 mg/l, flukanozol için 8 g/mL ve 32 mg/l, vorikonazol için 0,25 g/ml ve 4 mg/l, mikafungin içinse 16 g/mL ve 32 mg/l olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler:

Saprochaete, *Saprochaete capitata*, *Magnusiomyces capitatus*, *Saprochaete clavata*, antifungal duyarlılık, virülans faktörleri, biyofilm, esteraz, fosfolipaz, proteinaz

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: THD-2022-19827).

ABSTRACT

Beyzanur KAŞALTI, Identification of Clinical Saprochaete Isolates at Species Level, Comparison of Antifungal Susceptibility Test Results Obtained with Two Different Reference Methods and Investigation of Virulence Factors, Hacettepe University Institute of Health Sciences Microbiology Program, Master Thesis, Ankara, 2022. *Saprochaete* species are opportunistic pathogens that can cause fatal infections and nosocomial outbreaks, particularly in immunocompromised patients. Data on virulence factors are limited. In this study, it was aimed to confirm the species diagnosis of clinical *Saprochaete* isolates, to investigate the virulence factors by phenotypic methods and to investigate the susceptibility profiles with two different reference antifungal susceptibility test. 57 isolates defined as *Saprochaete* species in Hacettepe University Hospitals Mycology Unit were included in the study. Species-level identification was confirmed by MALDITOF-MS and sequence analysis. Coagulase, hemolysis, phospholipase, secretory acid proteinase and esterase activity and biofilm forming ability were tested. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of amphotericin B, fluconazole, voriconazole and micafungin were determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Of the isolates included in the study, 53 were identified as *Saprochaete capitata* and 4 as *Saprochaete clavata*. All isolates were negative for coagulase, hemolysis, phospholipase, and acid proteinase. Esterase positivity was 56.1% for all isolates. All isolates were strong biofilm positive by crystal violet and XTT methods. MIC₉₀ values in antifungal susceptibility tests were 2 g/mL and 1 mg/l for amphotericin B, 8 g/mL and 32 mg/l for fluconazole, 0.25 g/ml and 4 mg/l for voriconazole, micafungin for CLSI and EUCAST, respectively.

Keywords:

Saprochaete, *Saprochaete capitata*, *Magnusiomyces capitatus*, *Saprochaete clavata*, antifungal susceptibility, virulence factors, biofilm, esterase, phospholipase, proteinase.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project Code: THD-2022-19827)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe ve Taksonomi	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Tanımlama	5
2.3.1. Morfolojik Özellikler	5
2.3.2. Biyokimyasal Özellikler	5
2.3.3. Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi (“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)	6

2.3.4. Moleküler yöntemler	7
2.4 <i>Saprochaete</i> türlerinin etken oldukları enfeksiyonlar	10
2.5. Virülans Faktörleri	11
2.5.1. Dimorfizm	11
2.5.2. Fenotipik Değişim (“Phenotypic Switching”)	12
2.5.3. Koagülaz	12
2.5.4. Hemoliz	13
2.5.5. Proteinazlar	13
2.5.6 Fosfolipaz	14
2.5.7 Esteraz Enzimi	14
2.5.8 Yüzey Hidrofobisitesi	14
2.5.9 Biyofilm Oluşturma Yeteneği	15
2.6. Antifungal Duyarlılık	18
2.6.1. <i>Saprochaete</i> türlerinde Antifungal Duyarlılık Testleri	18
2.6.2 Mayalar için Önerilen Referans Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri	18
2.6.3 Mayalar için Kullanılabilen Referans Dışı Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri	20
2.6.4. <i>Saprochaete</i> türlerinde Antifungal Duyarlılık Durumunun Değerlendirilmesi	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Çalışmaya Alınan İzolatların Seçimi	24
3.2. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması	24

3.2.1 MALDITOF-MS yöntemi	25
3.2.2 DNA Dizileme	25
3.2.3. İzolatlarda Filogenetik Analiz ile Tür Ayrımının Gösterilmesi	28
3.3. Virülans Faktörlerinin Araştırılması	28
3.3.1. Koagülaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	28
3.3.2. Hemoliz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	28
3.3.3. Asit Proteinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	30
3.3.4. Fosfolipaz Aktivitesinin Belirlenmesi	31
3.3.5. Esteraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	33
3.3.6 Biyofilm Yeteneğinin Test Edilmesi	34
3.4 <i>In Vitro</i> Antifungal Duyarlılık Testleri	37
3.4.1 CLSI Referans Mikrodilüsyon Yöntemi	37
3.4.2. EUCAST Referans Mikrodilüsyon Yöntemi	38
4. BULGULAR	41
4.1. İzolatların Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması	41
4.1.1. MALDI-TOF MS ile Tanımlama Sonuçları	41
4.1.2. DNA Dizi Dizileme ile Tanımlama Sonuçları	41
4.1.3 Filogenetik analiz	42
4. 2. Virülans Faktörleri	43
4.2.1. Koagülaz	43
4.2.2 Hemoliz	44

4.2.3 Asit Proteinaz	45
4.2.4 Fosfolipaz	46
4.2.5 Esteraz	47
4.2.6 Biyofilm Oluşturma Özelliği	47
4.3. Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları	52
4.3.1 İnokulum Hazırlığı Sonuçları	52
4.3.2 Referans Mikrodilüsyon Testleri ile Elde Edilen MİK Değerleri	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	71
7.KAYNAK	72
8.EKLER	85
EK-1 Dijital Makbuz	
EK-2 Turnitin Ekran Görüntüsü	
9.ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Mg	Miligram
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
MOPS	3-(N morfolino)propanesülfonik asit 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
Nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H tetrazolyum-5-karboksanilid
KV	Kristal viyole
ITS	Internal transcribed spacer
EGS	External transcribed spacer
LSU	Large subunit
PBS	Phosphate buffered saline
SDA	Sabouraud dekstroz agar
SSAA	Sığır serum albüminli agar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MLST	Multilocus sequence typing
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
4.1.	Çalışmaya alınan <i>Saprochaete</i> izolatlarının filogenetik analizi a) tüm izolatlar, b) <i>S. clavata</i> izolatlarının ayrımı (kesilmiş şekil)	42
4.2	Koagülasyon testi sonuçları.	43
4.3.	Koyun kanlı agar ve at kanlı agarda hemoliz aktivitesine örnekler.	44
4.4	<i>Saprochaete</i> izolatlarının %1 sığır albümini içeren besiyerinde üremesi.	45
4.5.	<i>Saprochaete</i> izolatlarının %8 yumurta sarısı içeren besiyerinde üremesi.	46
4,6	Tween 80 agarda esteraz testi sonuçlar	47
4.7	<i>Saprochaete</i> izolatlarında biyofilm varlığının gösterilmesi	48
4.8	<i>Saprochaete</i> izolatlarında biyofilm varlığının gösterilmesi	49
4.9	<i>Saprochaete</i> inokulum hazırlığı için Thoma lamında hücre sayımı.	52

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1	Dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler	26
3.2	Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan karışım içeriği	26
3.3	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan döngü sıcaklıkları	27
3.4.	Sığır serum albüminli agar (SSAA) içeriği	30
3.5.	Yumurta sarısı ve sitrik asit disodyum fosfat tamponu içeren besiyeri içeriği	32
3.6.	Tween 80 agar içeriği	33
3.7	YPD besiyeri içeriği	34
4.1	MALDI-TOF MS ile cins ve tür düzeyinde tanımlama skorlarına göre dağılımı	41
4.2.	Esteraz aktivitesi	47
4.3	<i>Saprochaete</i> izolatlarında biyofilm metabolik aktivite ölçümü (XTT)ve biyokütle tespiti (KV) sonuçlarına göre biyofilm oluşturma özelliği (Negatif kontrol sonuçları temel alınarak hesaplanan sınır değere göre)	50
4.4.	<i>Saprochaete</i> izolatlarında biyofilm metabolik aktivite ölçümü (XTT) ve biyokütle tespiti (KV) sonuçlarına göre biyofilm oluşturma özelliği (<i>C. albicans</i> MYA274 pozitif kontrol suşu sonucu %100 kabul edilerek)	51
4.5.	Çalışmaya alınan <i>Saprochaete</i> izolatlarından hazırlanan inokulumlarda hücre sayımı ve spektrofotometrede yapılan ölçüm sonuçları.	53
4.6.	<i>Saprochaete</i> izolatlarında referans CLSI ve EUCAST mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve mikafungin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin geometrik ortalaması (GM), MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	56

- 4.7. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen amfoterisin B MİK değerlerinin türlere göre dağılımı (n). 57
- 4.8. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen flukonazol MİK değerlerinin türler göre dağılımı 57
- 4.9. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen vorikonazol MİK değerlerinin türlere göre dağılımı 58
- 4.10. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen mikafungin MİK değerlerinin türlere göre dağılımı 58

1. GİRİŞ

Fırsatçı fungal patojenler olan *Saprochaete* türleri bağışıklık sistemi baskılanmış, kemoterapi alan, hematolojik malignitesi bulunan, uzun süre yoğun bakım ünitesinde tedavi gören ve ve diğer immünosupresif tedavilere maruz kalan kişilerde nadir görülen enfeksiyonlarda etken olabilmektedirler (1-9). İmmün kompetan kişilerde gelişen enfeksiyonlar da bildirilmiştir (10). Brezilya (11), Hindistan (9, 12, 13), Irak (14), Japonya (15), Tunus (16) gibi dünyanın çeşitli ülkelerinde ve ülkemizde (17-22) bildirilen çok sayıda sporadik vaka bulunmaktadır. Bunların dışında, *Saprochaete*'nin etken olduğu hastane salgınları görülmüştür (2, 23-27). Salgınlarda kaynağın tam olarak saptanamadığı durumlar olsa da, *Saprochaete* türlerinin hastane ortamında yüzey ve cihazlarda kolonize olabileceği düşünülmüştür (27-29). *Saprochaete* türlerinin doğada, toprakta, süt ürünlerinde gösterildiği çalışmalar bu varsayımı desteklemektedir (13, 29).

Enfeksiyon etkeni olarak en sık rastlanan türler olan *Saprochaete capitata* (Teleomorf *Magnusiomyces capitatus*) ve *S. clavata* (teleomorf *Magnusiomyces clavatus*) makroskopik ve mikroskopik olarak benzer olduklarından morfolojik olarak ayrılmalarında güçlük yaşanmaktadır (28, 30). Tür düzeyinde tanımlama için konvansiyonel testlerin (karbon asimilasyon testleri, üreaz, mısır unlu Tween 80 agarda morfolojik görünüm gibi) yanı sıra, MALDITOF-MS ve gen dizileme yöntemleri kullanılması önerilmektedir (28, 30). Altın standart olarak kabul edilen gen dizileme yönteminde *ITS* gen bölgesinin yanında, tür düzeyinde daha spesifik ayırım yaptığı bilinen farklı gen bölgelerinin dizilendiği çalışmalar da bulunmaktadır (27, 28, 30, 31).

Saprochaete enfeksiyonlarında mortalite yüksek seyretmektedir (1, 4, 7). İnvaziv enfeksiyonlarda ölüm oranları %80'lere ulaşabilmektedir (23, 32, 33). Buna rağmen literatür incelendiğinde *Saprochaete* türlerinde virülans faktörlerini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yüzeyel antijenik yapılar, adhezinler, toksinler, asit proteinaz, fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzim yapımı, biyofilm oluşturma yeteneği gibi mantarlara ait bilinen virülans faktörlerinin klinik izolatlarda varlığı tam olarak ortaya konmamıştır (34, 35).

Saprochaete türlerinde antifungal duyarlılık durumunun tespitinde bir görüş birliği henüz bulunmamaktadır. Antifungal duyarlılık durumunu araştıran çalışmalarda mayalar için önerilen test yöntemleri kullanılmakla birlikte, bu yöntemler

daha çok *Candida* ve *Cryptococcus* türleri standardize edilmiştir. Ayrıca, henüz *Saprochaete* türleri için klinik sınır değerler tanımlanmamıştır. Ancak, antifungal duyarlılığın değerlendirildiği durumlarda ekinokandinlere azalmış duyarlılık gözlenmektedir. Antifungal duyarlılık durumunun tam olarak yorumlanabilmesi için referans yöntemlerde *Saprochaete* cinsi için standart koşulların kesinleştirilmesi, farklı yöntemler arasındaki uyumun belirlenmesi, epidemiyolojik eşik değer ve klinik sınır değerlerin ortaya konması için ek araştırmalar gerekmektedir (1, 36-38). Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Birimi'nde izole edilen klinik *Saprochaete* izolatlarında tür dağılımının, virülans faktörlerinin ve antifungal duyarlılık durumunun ortaya konması ve nadir bir fungal enfeksiyon etkeni hakkındaki bilgi birikimine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe ve Taksonomi

Saprochaete cinsi, Ascomycetes içinde taksonomileri yakın zamana kadar netleştirilememiş ve halen taksonomik incelemeleri devam eden bir grup maya benzeri hif oluşturabilen mantar olarak yer almaktadır. Cins ve tür ayrımları için morfolojik, fizyolojik ve kültürel özelliklerin yanı sıra moleküler teknikler de kullanılmaktadır. Bu amaçla cins tanımlamalarında nDNA reasosiasyonu, genomik DNA'nın G+C içeriği ve termal denaturasyon eğrisi, eşleşme tipi sistemleri gibi özellikler; tür kompleksleri düzeyinde ise elektroforetik karyotipleme, PCR "fingerprinting", çok lokuslu enzim elektroforezi ("multilocus enzyme electrophoresis", MLEE) ve çok lokuslu dizileme tiplendirmesi ("multilocus sequence typing", MLST) gibi yöntemler kullanılmaktadır (28, 30). Kullanılan yöntemler ile başlangıçta 1) teleomorfu *Galactomyces* anamorf *Geotrichum*, 2) teleomorfu *Dipodascus* anamorf *Geotrichum*, 3) teleomorfu *Magnusiomyces* anamorf *Saprochaete* olarak isimlendirilmiş üç farklı gruba ayrılmışlardır (39). Bu grup mantarlar ilk olarak 1832'de *Geotrichum* adıyla, 1892'de *Dipodascus*, 1977'de *Galactomyces* adıyla literatürde karşımıza çıkmaktadır. Cinsin tanımlandığı "tip tür" (type species) *Geotrichum candidum* olduğu için, bu cins adı ilgili tür ve akrabalarına ayrılmıştır. İkinci grup için *Dipodascus*, üçüncü için ise *Saprochaete*'ye göre daha yeni olmasına karşın daha bilinen bir isim olduğundan telomorf ismi olan *Magnusiomyces* ismi ön plana çıkmıştır (39).

Günümüzde *Saprochaete* türleri mantarlar âleminin Ascomycetes şubesi Saccharomycetes sınıfında Saccharomycetales takımı Dipodascaceae ailesi içinde sınıflandırılmışlardır (28, 30, 40). Klinik örneklerden en sık izole edilen iki türden biri *Saprochaete capitata* (Tl: *Magnusiomyces capitatus*) diğeri ise *Saprochaete clavata* (Tl: *Magnusiomyces clavatus*) olarak isimlendirilmişlerdir (28, 30).

S. capitata suşlarında yoğun dallanma gösteren konidyal aparatlardan gelişen blastik konidya görülmesi nedeniyle *Blastoschizomyces capitatus* olarak ayrı bir isimlendirme önerisi de getirilmiş ancak *Dipodascus*'ta da bu kadar belirgin olmasa da benzer yapıların görülebilmesi nedeniyle yaygın kabul görmemiştir (30). *S. capitata* için literatürde daha önce kullanılan diğer isimler arasında *Geotrichum capitatum*, *Trichosporon capitatum*, *Dipodascus capitatus* sayılabilir (30). *S. clavata* için ise *Geotrichum clavatum* ismine rastlanabilmektedir (28, 30).

Güncel literatürde *M. capitatus* ve *S. clavata* isimlerinin kullanımı doğru kabul edilmekte ve bu türlerin etken olduğu enfeksiyonlar *Magnusiomyces/Saprochaete* enfeksiyonları olarak tanımlanmaktadır (1). Ancak, bu çalışmada aynı cinse ait türler olduğunun vurgulanması amacıyla anamorf isimleri kullanılmıştır.

2.2. Epidemiyoloji

Saprochaete türleri çevremizde çok farklı nişlerde bulunabilirler. Doğada toprakta (41), süt ürünlerinden (26), evlerde, sağlık kuruluşlarındaki bulaşık makinaları ve tıbbi cihazlardan (27, 42, 43) izole edilmişlerdir. *S. capitata* insan cilt ve mukozasını kolonize olabilmektedir. (41). *S. clavata* da insanda cilt, balgam ve gastrointestinal örneklerden izole edilmiştir (1). Dünyada farklı ülkelerden bildirilen sporadik olgular, *Saprochaete* türleri ile farklı vücut bölgelerini tutan enfeksiyonların gelişebildiğine işaret etmiştir. Fungemi ve organ tutulumları (karaciğer, akciğer, endokard, beyin, kemik, eklem, cilt vb.) bildirilmiştir (1). İnvaziv *Saprochaete* enfeksiyonu görülen hastalar, diğer invaziv fungal enfeksiyonlara benzer şekilde immün sistemin baskılandığı, genel durumu kötü, invaziv girişim uygulanmış, hastanede ve yoğun bakımlarda uzun süre geçiren, geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavi gören hastalardır ve hematoonkolojik hastalar ek risk altındadır(1, 4, 5, 7, 12, 16, 36, 44, 45). Daha önce ekinokandin alan hastalarda riskin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (1, 12, 20, 46-48). İtalya (8, 25, 49), İspanya (26), Fransa (23), Çin(6, 50), Çekya (36), Brezilya (11), Hindistan (9, 12, 13), Irak(14), Japonya (15), Tunus (16) gibi farklı ülkelere enfeksiyonlar bildirilmiştir. 2020 yılında vakalara bakıldığında en yüksek vaka sayısı 87 vaka sayısı ile İtalya'dan bildirilmiştir (1). Ülkemizden de enfeksiyon bildirimleri bulunmaktadır (14, 18-22, 44, 47, 51-55). Bunların dışında nozokomiyal salgınlara bildirildiği durumlar da gözlenmiştir. Özellikle İtalya'da ve Fransa'da yüksek vaka sayılarına sahip *Saprochaete* salgınları yaşanmıştır. İlk salgın Martino ve ark. (25) tarafından 1990 yılında İtalya'da bildirilmiştir. Bu salgınlarda etken tür *Saprochaete clavata* olmuştur. Daha sonra İspanya'da kahvaltılık sütü sıcak tutmak için kullanılan termostan kaynaklanan *S. capitata* salgını bildirilmiştir (26). Avrupa'da görülen bir diğer salgın ise hastanenin bulaşık makinasından kaynaklanan *Saprochaete* salgınıdır (2). Ülkemizden de yoğun bakım ünitesinde üç hastanın etkilendiği bir *S. capitata* salgını

bildirilmiştir (24). Hastalarda tanı daha çok kan ve steril vücut sıvılarının kültürlerinde üreme gözlenmesi ile konulmuştur (1).

Saprochaete enfeksiyonunun nasıl bulaştığı ve yayıldığı hakkında bilgiler kesin değildir. Yaşanan salgınlarda enfeksiyonun insan, çevre veya cihaz kaynaklı olduğu düşünülenler bulunmaktadır (3, 26).

2.3. Tanımlama

2.3.1. Morfolojik Özellikler

Saprochaete kolonileri 24-48 saatte üreyebilmekle birlikte genellikle 5 gün içinde olgunlaşmaktadır. Makroskopik olarak düz ve kırışık, düzensiz şekilde yayılan, olgunlaştıkça aerial hiflerin belirginleştiği, beyaz veya krem renkli, buzlu cam görünümünde koloniler oluştururlar (1, 56). Optimum üreme sıcaklıkları 30°C ile 40°C arasındaki olabilmektedir (57). Bir çalışmada, *S. clavata* izolatlarının 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda üremediği bildirilmişse de, üreme sıcaklığına dayanan bir tür ayrımı yapmak güvenilir bulunmamaktadır (3).

Mikroskopik olarak maya hücreleri, gerçek hifler, yalancı hifler, bol annelokonidya ve az sayıda artrokonidya görülebilir (1, 28, 30, 56).

Klinik örneklerden izole edilebilen iki tür olan *S. capitata* ve *S. clavata* makroskopik ve mikroskopik olarak ayırt edilememektedir ve bu durum tür ayrımında hatalara neden olabilmektedir (5, 28). Bu iki türün birbirinden ayrımı; epidemiyolojik özelliklerin tanımlanması, enfeksiyonların seyirlerinin ve tedavilerdeki olası farklılıkların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (31, 32, 58).

2.3.2. Biyokimyasal Özellikler

Karbohidrat asimilasyonu

Mayalar karbohidratları fermente ve asimile edebilen organizmalardır. Fermantasyon, karbohidratların kullanılıp CO₂ ve etanol üretilen anaerobik bir reaksiyondur. Asimilasyon ise karbonhidratların oksijen varlığında kullanılmasıdır. Mayaların tanımlanmasında karbonhidrat asimilasyon testlerinin önemli rolü bulunmaktadır. *S. capitata* ve *S. clavata* 'nın tür düzeyinde ayrımında kullanılacak

bazı farklılıklar bulunmaktadır. *S. clavata* izolatları genellikle salisin ve selobiyozu tek karbon kaynağı olarak kullanabilirken *S. capitata* kullanamamaktadır (1, 33). Yakın bir tür olan *Magnusiomyces spicifer* (*Dipodascus spicifer*) de salisin, selobiyoz ve arbutin negatiftir (1, 33).

Rutin laboratuvarlarda, temeli karbonhidrat asimilasyon reaksiyonlarına dayalı ticari kitler maya tanımlaması için kullanılmaktadır. Bu ticari kitlere örnek olarak API 20C (BioMérieux, Fransa), ID 32C (BioMérieux, Fransa), VITEK2 YST (BioMérieux, Fransa), Phoenix Yeast ID (Becton Dickinson, ABD), Remel RapID Yeast Plus System (Remel, ABD) verilebilir. Bu testlerde, sık rastlanan cins ve türlerin ayrımı daha başarılı olmakla birlikte *Saprochaete* gibi daha nadir görülen mantarların tanımlanmasında sorun yaşanabilmektedir (59-61).

Üre hidrolizi

Üre hidrolizi temelde üre içeren besiyerlerindeki ürenin hidrolize edilmesine dayanan bir testtir. Üreaz enzimi bulunan mikroorganizmalar, üreyi amonyak ve karbondioksite parçalar. Oluşan amonyak ortamın alkaliye dönmesine neden olur ve pH indikatörü olarak kullanılan fenol kırmızısı sayesinde besiyeri koyu pembeye dönüşür. Benzer koloni morfolojisi olan ve artrokonidya oluşturabilen *Trichosporon* türleri üreaz pozitif iken *Saprochaete* türleri üreaz negatiftir (56).

Benzer biyokimyasal özellikleri olan yakın türlerin varlığı, bu özellikleri temel alan testler ve ticari kitler ile güvenilir tür ayrımı yapılmasını güçleştirmektedir (1, 28, 40, 62).

2.3.3. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi (“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS yöntemi, mikroorganizmalara ait protein profillerini kullanarak tür düzeyinde tanımlama yapabilmektedir. Protein, peptid, şeker gibi biyomoleküllerin ve büyük organik moleküllerin iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Çıkarılan bu protein profilleri sistem veritabanında bulunan profillerle karşılaştırılmakta ve tanımlama yapılmaktadır (63). Sistem öncelikle bakteri tanımlamasında kullanılmış,

veritabanlarının gelişmesiyle birlikte mantarlarda da oldukça başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Maya mantarlarının, özellikle veritabanlarında daha çok sayıda izolat ile temsil edilen klinik örneklerde daha sık rastlanan türlerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS yönteminin başarı oranı son derece yüksektir (1, 63).

Saprochaete türlerinin ayırımında da MALDI-TOF MS ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir. *S. capitata* ve *S. clavata* sık kullanılan ticari MALDI-TOF MS sistemleri olan VITEK-MS (BioMérieux, Fransa) (64, 65) ve Bruker BioTyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) (7, 32) sistemlerinde güncel veritabanları veya genişletilmiş kurum içi veri tabanları ile tanımlanabilmektedir (1, 23).

2.3.4. Moleküler yöntemler

Mikroorganizmaların tanımlanması ve taksonomisinde geleneksel olarak kullanılan morfolojik ve fizyolojik özellikler, yerlerini zaman içinde moleküler yöntemlere bırakmaktadır. Mantarların tanımlanması ve sınıflandırmasında da, DNA özelliklerini ve dizilerini inceleyen moleküler yöntemler temel haline gelmiştir. *Saprochaete* türleri ve diğer yakın türlerin ayırımında da DNA baz içeriği ve birden fazla gen dizisinin incelenmesi ile önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve taksonomide değişiklikler ortaya çıkmıştır (30).

Polimer zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hedeflenen gen bölgesine ait küçük DNA parçalarını çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir (66). Kary B. Mullis'in 1985'te geliştirdiği bu yöntem, DNA incelemelerinde devrim niteliğinde bir ilerleme olduğu için Kary B. Mullis 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür (67).

PCR yönteminde ilk aşama, eldeki örnek içinde bulunan DNA'nın ekstrakte edilmesidir. Mantar hücresinden DNA elde etmek için mantar hücre duvar yapısının parçalanması ve DNA'nın ortama salınmasını gerektirmektedir. Bunu için kısa sürede farklı sıcaklıklara maruz bırakarak ısı yoluyla hücrenin parçalanması veya fenol kloroform ile DNA ekstraksiyonu kullanılabilir. Farklı ticari kitler ile de DNA eldesinde başarılı sonuçlar alınabilmektedir (68, 69). Elde edilen DNA, PCR için kalıp DNA olarak kullanılır.

PCR'da çoğaltılacak parçanın özgül olarak belirlenmesini sağlayan bileşen primerlerdir. Primerler, amplifiye edilecek DNA bölgesinin başlangıç ve son kısmına bağlanabilen, 18-25 bp uzunluğunda yapay kısa DNA dizileridir ve her özgül reaksiyon için ilgili gen bölgesine göre belirlenirler.

PCR tekniğinde DNA'nın çoğaltılması için Taq polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim, kalıp DNA'ya komplementer olacak şekilde sentez yapabilmenin yanı sıra yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilmesi nedeniyle farklı sıcaklık döngülerinde dayanıklıdır. Bu sayede PCR işleminin enzim eklenmeden çok sayıda (genellikle 20-35 arasında) sıcaklık döngüsü ile yürütülmesi mümkün olmaktadır (70).

PCR'ın gerçekleşeceği ortam için uygun bir tampon çözeltisi içinde kalıp DNA, primerler, Taq polimeraz ve sentezde kullanılacak DNA yapıtaşları olan 4 farklı bazı içeren deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP) bir araya getirilir.

PCR işlemi sırasında her döngüde ilk olarak çift sarmallı kalıp DNA'da sarmalı oluşturan iki iplik arasındaki hidrojen bağları koparılarak DNA denatüre edilir. Denatürasyon aşaması 94-96°C'de yaklaşık 5 dk'da gerçekleşir. DNA iplikleri ayrıldıktan sonra sıcaklık primerlerin bağlanması ("annealing") için uygun değer sıcaklığa getirilir. Bu sıcaklık tasarlanan primerlere göre değişse de genellikle 45-50°C arasında olabilmektedir. Primerler bağlandıktan sonra Taq polimeraz için optimum sıcaklık olan 72°C'de DNA çoğaltılır. Çoğaltılan DNA çift sarmal olacağı için denatürasyon aşamasından başlayarak döngü tekrarlanır. Döngüler tamamlandıktan sonra elde edilen ürün farklı yöntemlerle belirlenmelidir. Geleneksel olarak, agaroz jel elektroforezi ile örnekteki DNA boyutuna göre ayrılır ve beklenen boyutta bant olup olmadığı kontrol edilir (70).

Klasik PCR yöntemini temel alan farklı teknikler de geliştirilmiştir ve ihtiyaca göre uygun teknik seçilmektedir (66).

DNA dizi analizi

Mantarların cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında altın standart olarak tercih edilen yöntem bazı gen bölgelerine ait DNA dizilerinin analizi olmuştur. Mantarların tanımlanmasında genel olarak ribozomal DNA gen dizileri kullanılmakla birlikte, diğer genlerden yararlanılan çalışmalar da bulunmaktadır. Ribozomal DNA kompleksinde dört adet “transcribed spacer” bölgesi mevcuttur. İki 5.8 rDNA’nın iki yanında, 18S ve 28S rDNA gen bölgeleri arasındadır. Bu bölgeye “internal transcribed spacer” (ITS) bölgeleri denmektedir. Diğer iki bölge ise 18S ve 28SrDNA bölgelerinin dışında kalan “intergenic spacer” (IGS) ve “external transcribed spacer” (EGS) bölgeleridir (71). ITS, mantarlarda cins ve tür düzeyinde tanımlama için en sık kullanılan DNA bölgesidir. Bunun dışında 28 S rRNA “large subunit” (LSU) bölgesi, *Rpb2*, *Act*, *Tef1a* gibi farklı bölgeler kullanılabilir ve *Saprochaete/Magnusiomyces* türlerinin ayırımında bu gen dizilerinden yararlanan çalışmalar bulunmaktadır (1, 28). Bu amaçla, ilgili bölgeler PCR ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen ürün saflaştırılmakta ve baz dizilimi belirlenmektedir. Elde edilen diziler gen bankalarının veri tabanlarında kayıtlı bulunan mikroorganizmaların dizi analizleri ile karşılaştırılır. Bu sayede mikroorganizma tür düzeyinde tanımlanmış olur (72).

Filogenetik analiz

“Filogenetik”, organizmalar arasındaki alt üst soy ilişkilerinin açıklanmasını, cins ve türlerin tanımlanmasını ve organizmaların evrimsel ilişkisinin açıklanmasını sağlamaktadır. Geleneksel olarak, türler arasındaki ilişki “filogenetik ağaçlar” ile gösterilir. Bu gösterim ilk olarak İngiliz biyolog Charles Darwin tarafından (1809-1882) evrim teorisini açıklamada kullanılmıştır (72).

Türler arasındaki ilişkilendirmenin; türler arası morfolojik, fizyolojik, genetik, coğrafi ve ekolojik farklılıklar dikkate alınarak yapılması gerekmektedir (30). Zamanla moleküler temelli çalışmaların filogenetik analiz için kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu sayeden daha hızlı, daha güvenilir ve uluslararası geçerliliği olan sonuçlara ulaşılabilmektedir (71, 73). Filogenetik analiz için öncelik olarak atasal olarak korunmuş DNA, RNA ya da aminoasit dizileri kullanılır (71). Fungal sistematikte en çok tercih edilen bölgeler ITS ve 18S rDNA’dır (71, 74). ITS bölgesi

500-800 bp uzunluğundadır ve evrensel primerler kullanılarak kolaylıkla PCR ile çoğaltılabilir (75). Seçilen bölge verilerinin karşılaştırılması için çeşitli veri tabanları kullanılmaktadır. Amerikan Ulusal Kütüphanesinin bir parçası olarak oluşturulmuş NCBI (National Center for Biotechnology Information); içindeki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ve GenBank sıklıkla kullanılan veri bankalarıdır (76).

2.4 *Saprochaete* türlerinin etken oldukları enfeksiyonlar

Saprochaete türleri insanda kan, steril vücut sıvıları, cilt, solunum yolu ve gastrointestinal sistem örnekleri gibi farklı klinik örneklerden izole edilebilmektedir. Olguların bir kısmında izolasyon kolonizasyon olarak değerlendirilse de, lokal veya yaygın enfeksiyonlarda etken olabilmektedirler (1). *Saprochaete* enfeksiyonları, çoğu fungal enfeksiyona benzer olarak, daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış veya genel durumu iyi olmayan hastalarda görülmektedir (1, 9, 12, 14, 18, 20, 44, 45, 53, 77). İmmünkompetan bireylerde de enfeksiyona neden olabildikleri raporlanmıştır (10).

Klinik bulgular, tutulan organlara göre değişkenlik göstermektedir. Fungemi ile seyreden invaziv enfeksiyonlar sıklıkla bildirilmiştir (17, 20, 22, 32, 62, 78, 79). Kemik iliği örneğinde *S. capitata* üretilen bir olgu da bulunmaktadır (49). Hastaların kan, balgam, dalak, karaciğer, beyin apsesi, idrar gibi farklı klinik örneklerinde *Saprochaete* izole edilmiştir (21, 23-26).

Saprochaete ve yakın cinslerde ekinokandin MİK değerlerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Farklı nedenlerle ekinokandin tedavisi alan hastaların yanı sıra; amfoterisin B, flukonazol ve posakonazol alan hastalarda da *Saprochaete* enfeksiyonlarının (“breakthrough” infection) ortaya çıkabildiği gözlenmiştir (1, 12, 46-49, 62, 80). Fungal enfeksiyon tanısı için histopatolojik, görüntüleme yöntemleri, kültür ve örnekten doğrudan moleküler tespit yöntemleri kullanılabilir. Ancak, enfeksiyon etkeninin kanıtlanması özellikle kan ve steril vücut sıvılarının kültüründe *Saprochaete* türlerinin üretilmesine dayanmaktadır (1). Karşılaştırmalı antifungal tedavi çalışmaları bulunmadığı için tedavi önerileri klinik verilere dayanmaktadır. Hastaya ait klinik durum ve in vitro duyarlılık verilerinin değerlendirilerek tedavinin düzenlenmesi önerilmektedir (1).

Uygun antifungal tedavi altında bile mortalite oranları yüksektir (1, 36). Bildirilen mortalite oranları %60-80 arasında değişmektedir (23, 32, 33).

Hızlı tanı, erken dönemde uygun antifungal tedavi, varsa santral venöz kateterlerin çıkarılması ve altta yatan nütropeni varsa kontrolü ile ölüm oranları azalabilmektedir (1, 33).

2.5. Virülans Faktörleri

Mikroorganizma ve konağa ait birçok faktörün rol aldığı patojen ve konak ilişkisi son derece karmaşıktır. Mantarların gerçek hif oluşturma, maya-hif formu geçişi, yüzeyel antijenik yapılar, fenotipik değişim (“phenotypic switching”), yüzey hidrofobitesi, toksinler ve hidrolitik enzimler gibi virülans faktörlerinin fungal enfeksiyonların patogenezinde rol aldıkları bilinmektedir. Virülans faktörlerinin ekspresyonu çevresel faktörlerle, enfeksiyonun evresine konak veya dokulara göre farklılık gösterebilmektedir (81, 82).

Örneğin hif oluşumu, fagositozdan kaçmayı sağlayan ve doku invazyon yeteneğini arttıran bir virülans faktörüdür. Hif oluşturan mantarlar dokuya veya plastik yüzeylere daha iyi yapışabilmektedir (81). Duvar yapısında bulunan glukoz, mannan, kitin gibi maddeler ise maya hücresine antijenik özellik kazandırmaktadır (81).

Patogeneze neden olan bir diğer faktör olan hidrolitik enzimler ise genel olarak proteinazlar ve fosfolipazlar olarak ayrılabilirlerse bile başka lipolitik aktivite gösteren enzimlerin varlığı da tespit edilmiştir. Hidrolitik enzimlerin hidroliz yapabilme yeteneğinden kaynaklı olarak konak hücreye invazyon sırasında gerçekleşen membran hasarından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Virülans faktörleri bazı mantarlarda örneğin *Candida albicans*'ta sıklıkla çalışılmasına rağmen *Saprochaete* ve benzeri nadir görülen bazı mantarlarda bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır (82-85).

2.5.1. Dimorfizm

Mayaların hif ve maya formu arasında geçiş yapabilmelerine dimorfizm denir. Termal dimorfizm, gerçek sistemik mikoz etkenlerinde temel virülans faktörüdür (86). Maya hücresinin hif formunun invazyon sağladığı, daha küçük olan maya formunun ise yayılmayı sağladığı düşünülmektedir (87). Bu dönüşüm enfeksiyon sırasında çevresel koşullara bağlı olarak devamlı gerçekleşmektedir.

2.5.2. Fenotipik Değişim (“Phenotypic Switching”)

Fenotipik değişim zor çevre şartlarında, üremeye uygun olmayan ortam koşullarında mikroorganizmaların kendini korumak için koloni morfolojilerini değiştirmesidir (88). Organizma, koşullara uyum sağlayabilmek için antijenlerini modifiye etmekte, bunun sonucu olarak koloni morfolojisinde değişiklik gözlenmektedir. Bu fenotipik değişim, geriye dönüşlü olarak gerçekleşmekte, ortam şartları değiştiğinde en baştaki morfolojilerine dönebilmektedir (86). Bir mikroorganizma birçok koloni morfolojisine sahip olabilir ve bu morfolojiler arasında geçiş yapabilir. Fenotipik değişimin immün sistemden kaçışı sağladığı ve biyofilm oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. Hull ve ark. (89) tarafından tanımlanmış olan *C. albicans*'taki beyaz ve opak koloni geçişi en çok üzerinde çalışılan fenotipik değişimdir. Opak formdaki hücrelerde α feromonu üretildiği ve bu feromonun beyaz formdaki hücrelerde biyofilm üretimini uyardığı bildirilmiştir (86).

2.5.3. Koagülaz

Koagülaz enzimi bir plazma pıhtılaşma proteindir. Fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar. Ekstraselüler bir proenzimdir ve iki çeşidi bulunmaktadır. Serbest koagülaz enzimi protein yapılıdır ve “coagulase-reacting factor” (CRF) ile birleşerek aktive olur (90, 91). Bağlı koagülaz enzimi ise aktive olmak için CRF'ye gerek duymadan doğrudan etki gösterebilir (90). Koagülaz, ısıya dirençli ve filtrelerden geçebilen bir enzimdir (91). Organizmalar, özellikle stafilokoklar, koagülaz enzimi aktivitesi ile fibrin tabaka ile kaplanır. Bu tabaka sayesinde fagositozdan korunup patojenite kazanırlar (92-94). Mantarlarda, özellikle *Candida* türlerinde değişken oranlarda koagülaz varlığı gösteren çalışmalar bulunmaktadır (93, 95-99). Koagülaz enziminin varlığını araştırmak için lamda veya tüpte koagülaz testi uygulanabilmektedir. Lamda koagülaz testinde bağlı koagülaz, tüpte koagülaz testinde ise serbest koagülaz tespit edilmektedir (91, 100). Her iki test için EDTA'lı tavşan plazması tercih edilmektedir (91, 92, 94, 101). Kullanılan plazma çeşidinin test sonucunu etkileyebildiği belirtilmiştir (91, 95, 99).

2.5.4. Hemoliz

İnsanlarda özellikler hemoglobinin yapısını oluşturan demir tüm canlılar için esansiyel elementtir. Mikroorganizmaların insandaki hemoglobindeki bulunan demiri kendi metabolik faaliyetlerinde demir kaynağı olarak kullanabilmeleri virülanslarına katkıda bulunmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan fungal patojen olan *C. albicans*'ın *in vivo* ortamda kompleman reseptörleri aracılığıyla eritrositlere bağlanıp eritrositlerin lizine neden olan bir hemoliz faktörü üretebildiği gösterilmiştir (102). Bu hemolitik faktörün yüksek ihtimalle fungal hücre yüzeyine bağlı bulunan bir mannoprotein olduğu düşünülmektedir (103). Hemolizin üretiminin diğer fungal patojenlerin virülansına da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (93, 104, 105).

2.5.5. Proteinazlar

C. albicans'ta tanımlanan proteinazlar diğer mantarlarda da virülans faktörü olabilmektedirler (81). Optimum olarak asit pH'da aktive oldukları için "asit proteinazlar" adı ile de bilinmektedirler. Proteinazlar çoklu SAP ("secreted acid proteinase") gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. SAP gen ailesinde SAP1'den SAP10'a kadar tanımlanmış gen bölgeleri bulunmaktadır. Bu gen bölgeleri; adezyon, invazyon, kutanöz enfeksiyon, penetrasyon, mantar hücresi duvar bütünlüğünden ve tomurcukların ana hücreden ayrılmasından sorumludurlar (81, 106).

Glikoprotein yapısında olan proteinazlar; amino (N) ucunda triptofan, karboksil (C) ucunda lösin bulunan ve çok miktarda aspartik asit rezidüleri içeren bir polipeptid zincire sahiptirler. İçerdikleri aspartik asit miktarından dolayı "aspartik proteinazlar" da denmektedir (81, 107). Sığır hemoglobini, ovalbumin, kolajen, serum albümini, kazein, keratin, immünoglobulin A, hemoglobin, fibronektin gibi azot kaynağı oluşturan proteinler salgısal asit proteinazın substratlarıdır (107, 108). Mayalar, azot kaynağı olarak aminoasit veya amonyum tuzları içeren besiyerlerinde daha düşük, tek azot kaynağı olarak sığır serum albumini gibi bir protein içeren besiyerlerinde ise daha fazla asit proteinaz salgılayabilmektedirler (107, 108). Virülans faktörü olarak asit proteinazların değerlendirildiği çalışmalar çoğunlukla *Candida* türlerinde yapılmıştır ve asit proteinaz üreten *Candida* türlerinde virülansın diğer türlere göre yüksek olduğu görülmüştür (82-84).

2.5.6 Fosfolipaz

Fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerdeki bir veya daha fazla ester bağını hidroliz ederek membran bütünlüğünün bozan enzimlerdir. Hidrolize ettikleri ester bağları temel alınarak fosfolipaz A, B, C, D olarak sınıflandırılırlar (109). Fosfolipaz A1 gliserol molekülünün sn-1 pozisyonundaki, fosfolipaz A2 sn2 pozisyonundaki, fosfolipaz B hem sn-1 hem de sn-2 pozisyonundaki açil ester bağlarını, fosfolipaz C fosfolipid omurgadaki ilk, fosfolipaz D ise ikinci fosfodiester bağını koparmaktadır (109). Mikroorganizmanın hücre dışına salgıladığı fosfolipazlar konak hücreye penetrasyonu kolaylaştırarak, hücreyi lizize uğratarak ya da hasar vererek enfeksiyon patogenezine katkı sağlarlar. Mikroorganizmanın fosfolipaz salgılayabilme yeteneği ve salgılanan enziminin miktarı virülans açısından önemli bulunmaktadır (109-111). *Clostridium perfringens* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriyel patojenlerin yanı sıra *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi fungal patojenlerde de varlığı gösterilmiştir (109). *C. albicans*'ta maya formunun hiflere göre daha fazla fosfolipaz enzimi salgıladığı, fosfolipaz üretiminin ortamdaki glukoz miktarı gibi koşullardan etkilendiği de bildirilmiştir (111). Bildiğimiz kadarıyla *Saprochaete* türlerinde fosfolipaz üretimini araştıran çalışma bulunmamaktadır

2.5.7 Esteraz Enzimi

Fosfolipaz enziminin aksine L-a (alfa) lesitin, triolein ve tripalmitini hidrolize edemeyen esteraz enzimi; triaçilgliserollerin ester bağlarını hidrolize eder. Suda çözünebilen uzun zincirli yağ asitlerine de etki ederler (112). İlk olarak 1978 yılında Rudek tarafından Tween 80 opasite testi ile saptanabileceği gösterilmiştir. Bu testte, esteraz enzimi besiyerinde bulunan Tween 80'i hidroliz etmekte ve açığa çıkan yağ asitleri kalsiyum ile birleşmektedir. Bu sayede esteraz enzim varlığı tespit edilebilmektedir (108, 113).

2.5.8 Yüzey Hidrofobisitesi

Enfeksiyonun patogenezinde ilk olarak etken olan mikroorganizmanın konak hücreye tutunması gerekmektedir (114, 115). Yapılan çalışmalarda hidrofobik

moleküllerle temasın patojenin konak hücreye yapışmasını kolaylaştırdığı görülmüştür (116). Örneğin, hidrofobik özellik gösteren mayaların vajen ve yanak epitellerine daha fazla tutunduğu tespit edilmiştir (117, 118). Hücre yüzeyine hidrofobik özellik kazandıran hidrofobik moleküller suda çözünmeyip eter, alkol gibi apolar çözücülerde çözünebilen moleküllerdir. Hücre duvarı yapısında sıklıkla lipitlere bağlı alifatik hidrokarbon zincirleri olarak bulunurlar. Hidrofobik özellik zincirdeki karbon sayısına bağlı olarak artmaktadır (107, 108). Temas açılı ölçümü, tuz birikimi, hidrokarbon adezyon yöntemi, polistiren mikro küre yöntemi gibi hücre yüzey hidrofobitesini ölçmede kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır (117, 119, 120).

2.5.9 Biyofilm Oluşturma Yeteneği

“Slime” Faktörü (Yapışma Faktörü)

“Slime” faktörü mikroorganizma tarafından salgılanan ve hem organik hem de inorganik yüzeylere (deney tüpleri, kateterler, ortopedik implantlar vb.) tutunmayı sağlayan bir virülans faktördür (121). İlk olarak 1980’li yıllarda koagülaz negatif stafilkoklarda tanımlanmıştır (122, 123). “Slime” faktörü ayrıca opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi immün savunma mekanizmalarına karşı mikroorganizmayı koruyabilmekte ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç sağlayabilmektedir (124). “Slime” faktörü ile mikroorganizma yüzeye tutunup kolonize olduktan sonra çok kısa bir süre içinde fibrinojen, fibrin, fibronektin ve vitronektin gibi konağa ait ekstraselüler matriks proteinleri ile biyofilm tabakaları oluşmaktadır (125). Birkaç milimetre kalınlığında olabilen biyofilm tabakası, mikroorganizmalar ve amorf ekstraselüler glikokaliksten oluşmakta ve mikroorganizmayı çevre şartlarından korumaktadır (121-123).

Mantarlarda biyofilm oluşturma yeteneği sık karşımıza çıkmakta, *Candida* türlerinin “slime” faktörü ile kolonize olduğu bilinmektedir. Bu sebepler tıbbi alanda protezler, endotrakeal tüpler, kateter gibi malzemelerin yaygın kullanılmaya başlanmasıyla *Candida* enfeksiyonlarında artış görülmektedir (126). *Trichosporon* türlerinde de katetere adezyon ve biyofilm oluşturma özelliğinin önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (127). Bonaventura ve ark. (128) tarafından yapılan çalışmada *T. asahii* izolatlarında yüzeye adezyonun gerçekleştiği ve 25-40 µm kalınlığında bir biyofilm tabakası oluştuğu tespit edilmiştir.

D'Antonio'nun santral venöz kateter ile ilişkili fungemisi olan hastaların kan ve kateter uçlarından elde edilen altı *S. capitata* izolatıyla yaptığı çalışmada tüm izolatların, yüksek oranda “slime” üretebildiğini tespit etmiştir (129). Bir diğer çalışmada ise çalışmada *S. capitata* enfeksiyonu olan hastalarda, enfeksiyonun başlamasından sonraki 5 gün içinde santral venöz kateterlerin çıkarılması ile hastaların durumlarının düzeldiği bildirilmiştir (130). Bu durum, *Saprochaete* türlerinin santral venöz kateterler ve diğer protez tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşturabildiğini düşündürmüştür (129).

“Quorum Sensing”

“Quorum Sensing” mikroorganizmaların bir ortamda yeterli yoğunluğa ulaştıklarında birbirleriyle iletişim kurarak ortak hareket etmeleridir (86, 131). Mikroorganizma belirli sayıya ulaştıklarında gen ekspresyonu ve hücre aktivitesi değişmektedir (86). Aktivite değişimi sırasında hücrelerden küçük sinyal molekülleri de salgılamaktadırlar. Az sayıda hücre varken bu sinyaller değişiklik yaratmazken hücre sayısı arttıkça hücre için bir uyarı görevi görür ve toplu olarak ortama uyumu ve konak savunmasından kaçışı sağlar (132). Biyofilm oluşumunda hücre yoğunluğunun çok arttığı ve ortamda yeteri kadar besin kalmadığı durumlarda gerçekleşen biyofilmden ayrılma aşamasında, biyofilmdeki mikroorganizmalar bu şekilde iletişim kurmaktadır (133, 134).

Biyofilm

Biyofilmler, genel olarak mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak, kendi ürettikleri polisakkarit matriks olarak tanımlanabilir (135). İlk olarak 17. yy 'da Leuwenhoek tarafından diş eti plaklarında gözlemlenmiştir.

Biyofilmler oluşuran mikroorganizmalar konak hücre cevabı, antimikrobiyal tedavi ve olumsuz çevre koşulları gibi etkilerden korunabilmektedir (135, 136).

Günlük hayatta, doğada su ortamlarında, su sistemlerinde, arıtma borularında oluşabildiği gibi canlı dokularda ortopedik implantlarda, kateterler ve vücuda yerleştirilen tıbbi malzemelerde, dişeti ve diş minelerinde oluşabilir. Enfeksiyon nedeni olan biyofilmler morbidite ve mortaliteye neden olan hastane enfeksiyonlarının yarısından fazlasının temel sebebidir (122, 136, 137).

Fungal biyofimler hakkında yapılan çalışmalar bakterilere göre daha sonra başlamıştır. Küçük kateter parçalarında yapılan *in vitro* biyofilm çalışmaları, *C. albicans*'ın *albicans* dışı *Candida* türlerine göre daha iyi biyofilm oluşturabildiğini ve fungal biyofilmlerin bakteri biyofilmlerine benzediğini tespit etmiştir (138). Farklı olarak, mantarlarda hem maya hem de hif formları biyofilm oluşumunda görev alabilmektedir (87, 139).

Biyofilmleri oluşturan yapılar, mikrobiyal hücreler ve ekstraselüler matrikstir. Biyofilmlerin karbon içeriğinin çoğunluğunu polisakkarit yapıda olan ekstraselüler matriks oluşturmaktadır. Bu matriks tabakanın içinde mikrokoloniler halinde canlı mikroorganizmalar ve mikroorganizmaların aralarında madde alışverişine olanak tanıyan mikrokanallar bulunmaktadır (122, 139). Biyofilm oluşurken ilk olarak yüzeye tutunmayı kolaylaştıran hazırlayıcı film tabakası oluşur. Daha sonra mikroorganizmalar yüzeye adezyon yapar. Biyofilm olgunlaşırken kollajen, fibrinojen ve fibronektin gibi makro moleküller birikmektedir. Bu aşamada fungal biyofilmlerde hifal oluşumlar da görülmeye başlamaktadır. Maya hücreleri ince bir tabaka halinde yüzeye tutunurken, hif formları bu tabakanın üstünde kalın bir tabaka oluşturmaktadır. İki fungal formun işlevi birbirini tamamlamaktadır. Hif formu olmazsa, biyofilm maya hücrelerinden oluşan ince bir tabaka ile sınırlanmaktadır. Maya formu olmadığına ise kalın hif tabakası yüzeye yeterince tutunmakta ve kolayca ayrılmaktadır (87, 140, 141). Olgunlaşan biyofilmlerde mikroorganizmaların bir kısmı koparak ayrılmaktadır (142). Biyofilmden ayrılan hücreler planktonik faza geçip başka yüzeylere tutunabilmektedir. Biyofilm gelişme aşamaları ve mikroorganizmaların ayrılması, hücrelerin "quorum sensing" molekülleri ile iletişimi sayesinde belirlenmektedir. İlgili moleküller mikroorganizmalarda gen ekspresyonunu değiştirmektedir (143).

2.6. Antifungal Duyarlılık

2.6.1. *Saprochaete* türlerinde Antifungal Duyarlılık Testleri

Fungal enfeksiyon sıklığının artması, kazanılmış antifungal direncinin bir sorun haline gelmesi ve antifungal tedavi seçeneklerinin çoğalması antifungal duyarlılık testlerine gereksinimi artırmıştır (144, 145). Bu testlerin standardize edilmesi, farklı çalışmalarda elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi için zorunlu olmuştur. Bu amaçla referans test yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Cins ve tür düzeyinde mikroorganizmalar ve farklı antifungaller için öneriler eklenerek bu testlerin kapsamı genişletilmeye devam etmektedir. Günümüzde CLSI ve EUCAST önerileri en sık kullanılan kılavuzlar olarak ön plana çıkmıştır. CLSI (daha önce National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 1968'de laboratuvarlarda antimikrobiyal duyarlılık testlerinin kalite kontrolü ve standardizasyonu için kurulmuş, antifungal duyarlılık için standardizasyon gereksinimini vurgulayan raporunu 1985'te, ilk önerilerini de 1992'de yayınlamıştır (144, 145). Benzer amaçlarla 1997'de kurulan EUCAST da antifungal duyarlılık için ilk önerilerini 2008'de yayınlamıştır (145). Mayalar için geliştirilen referans yöntem önerileri, başlangıç olarak *Candida* ve *Cryptococcus* türleri için geliştirilmiş olmakla birlikte, diğer maya cinsleri için de kullanılmaktadır. (146, 147). Bunların dışında rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan ticari yöntemler de bulunmakla birlikte bu testlerle ilgili deneyimler yine de daha çok sık görülen patojenlere ilişkindir (145).

2.6.2 Mayalar için Önerilen Referans Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri

Buyyon makrodilüsyon yöntemi

CLSI önerilerinde bulunan bu yöntemde test edilecek antifungal dilüsyonları tüplerde hazırlanmaktadır (146). Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri içinde istenen konsantrasyonlarda çözölen antifungalden 0,1 ml tüpe konur. Antifungal içermeyen besiyeri konmuş iki tüp üreme kontrolü ve besiyeri sterilite kontrolü olarak ayrılır. Steril serum fizyolojik (SF) içinde $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak

şekilde hazırlanan maya süspansiyonun RPMI 1640 besiyeri içinde 1:20 sulandırarak $0,5-2,5 \times 10^3$ cfu/ml maya içeren inokulum hazırlanır. Hazırlanan inokulumdan 0,9 ml antifungal içeren tüplere ve üreme kontrolü tüpüne eklenir ve karıştırılır. Tüpler $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de *Candida* türleri için 46-50 saat, *Cryptococcus neoformans* için 70-74 saat inkübe edilir. Sürenin sonunda farklı antifungal dilüsyonların bulunduğu tüplerdeki üreme, antifungal içermeyen üreme kontrol tüpü ile kıyaslanarak görsel olarak değerlendirilirler

Buyyon mikrodilüsyon yöntemi (BMD)

Makrodilüsyon yöntemine benzeyen yöntem daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı olduğu için tercih edilmekte ve altın standart olarak kullanılmaktadır (145). Küçük farklar ile CLSI ve EUCAST önerilerinde yerini almıştır (146, 147). İki kılavuzun önerileri de henüz *Candida* ve *Cryptococcus* türleri ile sınırlanmıştır.

Bu yöntemde, RPMI 1640 besiyerinde hazırlanan antifungal dilüsyonlarından 100'er µl 96 kuyucuklu mikrop plakların her satırında ilk 10 kuyucuğa seri dilüsyon olarak dağıtılır. Her satırda 11.kuyucuk üreme kontrolü, 12.kuyucuk ise sterilit kontrolü olarak ayrılır. CLSI yönteminde U tabanlı plaklar tercih edilmekte, EUCAST yönteminde ise düz tabanlı ve hücre kültürü için hazırlanmış mikrop plaklar önerilmekte ve çift kat konsantrasyonda RPMI 1640 besiyeri kullanılmaktadır. Maya inokulumu CLSI yönteminde RPMI besiyerinde $0,5-2,5 \times 10^3$ cfu/ml, EUCAST yönteminde ise SF içinde $0,5-2,5 \times 10^5$ cfu/ml olarak hazırlanır. Her satırdaki ilk 11 kuyucuğa 100'er µl maya süspansiyonu, 12. kuyucuğa ise 100 µl steril distile su eklenir. Plaklar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir. Sonuçlar CLSI yönteminde üreme yeterli ise 24 saatte, değilse 48 saatte değerlendirilir. Bu süre *C. neoformans* için 72 saate uzatılabilmektedir. EUCAST yönteminde sonuçlar 24 saatte spektrofotometrik olarak (530 nm, 405 nm veya 450 nm) okunur. Okuma sırasında yeterli üreme olmadığı saptanırsa (OD değeri $<0,2$) 12-24 saatlik ek inkübasyon gerekmektedir. *Cryptococcus* türlerinde, 48 saatte yeterli üreme olmaması durumunda testin 30°C 'de tekrar edilmesi önerilmektedir. İlgili mikroorganizma ve antifungal için elde edilen MİK değerleri, varsa, yöntem öze klinik sınır değerler ile karşılaştırılarak duyarlı, artmış maruziyette duyarlı veya dirençli ayrımı yapılmaktadır (37, 38). Bunun bulunmadığı durumlarda tanımlanmış epidemiyolojik eşik değeri ("epidemiological cut-off",

ECOFF) varsa ilgili izolatin sokak suşu (“wild type”) olup olmadığı belirlenebilmektedir (148, 149).

Disk difüzyon yöntemi

Bu yöntem CLSI önerileri arasında bulunmaktadır ve *Candida* türleri ile sınırlıdır (150). Test için %2 glukoz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller–Hinton agar kullanılmaktadır. Steril SF içinde 0,5 MacFarland standardında ($1-5 \times 10^6$ cfu/ml) maya süspansiyonu hazırlanır ve eküvyon ile homojen olacak şekilde agar yüzeyine yayılır. Antifungal diskleri aralıklı olarak besiyerine yerleştirilir. Plaklar 24 saat $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilir. Üremenin yetersiz olduğu durumlarda inkübasyon 48 saate uzatılabilir. Plak, siyah ve ışığı yansıtmayan bir zeminden birkaç cm yukarıda tutulur ve disk çevresinde üremenin belirgin olarak azaldığı zon çapı ölçülür.

2.6.3 Mayalar için Kullanılabilen Referans Dışı Antifungal Duyarlılık Test Yöntemleri

Referans yöntemlerin rutin laboratuvarlarda uygulanması zaman alıcıdır ve deneyim gerektirmektedir. Bu nedenle uygulama kolaylığı sağlayan bazı ticari yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (144, 145, 151).

Gradyent Difüzyon Şeritleri

Antifungal belirlenen bir gradyent ile eklendiği plastik veya nitroselüloz şeritler kullanılmaktadır. Bu yöntemde MİK değeri elde edilebilmesi, disk difüzyon yöntemine göre avantaj sağlamaktadır. Disk difüzyondakine benzer şekilde hazırlanan inokulum besiyeri yüzeyine yayılmakta ve şerit yerleştirilmektedir. Üreme inhibisyonu $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında okunmaktadır. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçükle kesiştiği noktadır. Okuma göz ile yapıldığından deneyimin önemli olduğu belirtilmektedir. Mayalar için referans yöntem ile esansiyel uyumu (“essential aggrement”, EA), mikroorganizma ve antifungale göre değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle %90'nın üzerinde bulunmuştur. BMD yönteminde artan antifungal konsantrasyonlarında üremedeki azalmanın net olmadığı çok sayıda ardışık konsantrasyon boyunca devam ettiği

(“trailing” gösteren) izolatlarda MİK değerinin belirlenmesinde daha başarılı olduğu düşünülmektedir. Amfoterisin B dirençli *Candida* izolatlarının ayırımında BMD yöntemine göre avantaj sağladığı iddia edilmekle birlikte bu konu kesinliğe kavuşturulamamıştır. Ayrıca, şeritlerin ticari olarak sağlanması gerekmektedir. Bu durum maliyeti etkileyebilmekte ve farklı ürünlerde kalitenin korunmasını güçleştirmektedir (145).

Sensititre YeastOne Testi

Sensititre YeastOne (ThermoFisher Scientific, ABD), mayalarda antifungal duyarlılığın test edilmesi için farklı konsantrasyonlarda antifungal konmuş kuyucuklardan oluşan kolorimetrik bir paneldir. Panel kuyucuklarında üremeye bağlı pH değişikliği, içerikte bulunan rezasurinin renk değiştirmesini sağlar ve buna göre okuma yapılır. Çoğu çalışmada laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirlik yüksek ve referans yöntem ile karşılaştırıldığında EA %90’ın üzerinde bulunmuştur (145).

VITEK2 Maya Panelleri

VITEK2 sistemi (BioMérieux, Fransa) için geliştirilmiş maya duyarlılık panelleridir. Farklı konsantrasyonda liyofilize antifungal içeren kuyucuklara SF içinde hazırlanan inokulum eklenir ve otomatize sistem içinde inkübe edilir. Sistemde 12-14 saatte (36 saate kadar uzatılabilir) okunur. Otomasyonun katkıda bulunduğu uygulama ve değerlendirme kolaylığı nedeniyle rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır. CLSI ve EUCAST referans BMD yöntemleri ile uyumu genellikle %95’in üzerinde bulunmuştur (145).

Akım sitometrisi

Seri dilüsyonda antifungale maruz bırakılan maya hücrelerinin canlı/ölü hücreleri farklı boyayan floresan bir boya ile işaretlenmesi ve akım sitometre (“flow cytometer”) cihazı ile canlı/ölü hücrelerin ölçümü temeline dayanmaktadır. Umut vaat eden sonuçlar vermesine karşın henüz standardize edilememiştir (145).

MALDI-TOF MS

Bu yöntemde de maya hücreleri farklı dilüsyonlarda antifungale maruz bırakılmakta ve oluşan hasarın neden olduğu değişim MALDI-TOF MS cihazı ile tespit edilmektedir. Henüz yöntem geliştirilme aşamasındadır ve rutin laboratuvarlarda kullanıma girmemiştir (145).

2.6.4. *Saprochaete* türlerinde Antifungal Duyarlılık Durumunun Değerlendirilmesi

Saprochaete türlerinde antifungal MİK değerlerinin belirlenmesi için genellikle *Candida* türleri için önerilen referans yöntemler uygulanmaktadır. Henüz direnç durumunu yorumlamak için sınır değer belirlenmemiştir. Tedavi seçiminde klinik durum ön planda olmakla birlikte, epidemiyolojik bilgi birikiminin sağlanması ve *Saprochaete* türlerinin etken olduğu olgularda tedavinin yönlendirilmesi amacıyla bu testleri uygulayan ve elde edilen MİK değerlerini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (1, 20, 31, 40, 47, 77). Bu çalışmalarda ekinokandin MİK değerlerinin yüksek bulunduğu raporlanmıştır. *S. capitata* izolatları, ekinokandinlere *in vitro* ve *in vivo* olarak dirençli kabul edilmektedir (1). *S. capitata*'da β -1,3-D-glukan sentazın katalitik alt birimini kodlayan *FKS* geninin “hot spot 1” (HS1) bölgesinde ilk pozisyonda duyarlı mantarlardan (Örneğin *Saccharomyces cerevisiae*) farklı olarak F'den L'ye bir aminoasit değişimi tespit edilmiştir. Bu pozisyonda, ekinokandin doğal dirençli mantarlarda (Örneğin *Fusarium*, *Lomentospora*) ve kazanılmış ekinokandin direnci saptanan *Candida* izolatlarında da farklılık gözlenebilmektedir (152).

Saprochaete izolatlarında flukonazol MİK değerleri de yüksek bulunmaktadır. Vorikonazol (0,03-0,5 mg/l), itrakonazol (0,03-0,5 mg/l), posakonazol (0,016-1 mg/l) ve isavukonazol (0,016-0,5 mg/l) MİK değerleri ise genellikle düşük bulunmuştur (1). Ancak, hem *S. capitata* hem de *S. clavata* için isavukonazol MİK değerlerinin 4 mg/l'yi aştığı izolatlar görülmüştür (1, 153).

Amfoterisin MİK değerleri orta aralıkta (0,5-2 mg/l) seyretmekte ve flusitozin MİK değerleri genelde düşük (0,125-0,5 mg/l) bulunmaktadır (1, 31).

Ekinokandin tedavisi altında daha sık olmakla birlikte; flukonazol, posakonazol hatta amfoterisin B altında “breakthrough” enfeksiyonlar gözlenmiştir. ESCMID-ISHAM kılavuzu, antifungal tedavi için amfoterisin B önermekte, buna

flusitozin veya vorikonazol eklenebileceğini belirtmektedir (1). Tek başına vorikonazol, itrakonazol ve MİK değeri düşük izolatlar için yüksek doz flukonazol kullanımını da öneriler arasındadır (1).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınan İzolatların Seçimi

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Birimi'nde 2006-2022 yılları arasında balgam, safra, vajinal akıntı, pü, kan idrar, DTA ve kan kateter kültürlerinden izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle *Saprochaete* türleri (*S. capitata*, *B. capitatus*, *G. capitatum*, *M. capitatus*, *S. clavata*, *M. clavatus*, *G. clavatum* gibi önceki ve yeni taksonomik isimler dâhil) olarak tanımlanan izolatlar dâhil edilmiştir. İzolatlar rutin laboratuvarında koloni morfolojisi, mısır unlu Tween 80 agarda mikroskopik morfoloji, üreaz negatifliği ve ID32C kitinde (BioMérieux, Fransa) elde edilen karbon asimilasyon profilleri ile tanımlanmıştır (56). Klinik örneklerden üretilip tanımlandıktan sonra -20°C'de %15 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda saklanmışlardır. Üreme listelerinde *Saprochaete* olarak kayıt edilen izolatlar, stoktan çıkarılarak Sabouraud dekstroz agarda (SDA, Oxoid, Birleşik Krallık) 37°C'de canlandırılmıştır. Kültürün saflığının doğrulanması için en az bir kez tek koloni pasajları yapılmıştır. Besiyerlerindeki üremenin karışık olmasından şüphelenildiğinde, kromojenik besiyeri (Himedia, Hindistan) kullanılarak üremenin saflığı kontrol edilmiştir.

Bir hastadan birden fazla üreme olması durumunda ilk izolat çalışmaya dâhil edilmiştir.

3.2. İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmaya alınan izolatların makroskopik ve mısır unlu Tween 80 agardaki mikroskopik morfolojileri kontrol edilmiştir. Cins ve tür düzeyinde tanımlamanın doğrulanması için MALDITOF-MS yöntemi kullanılmıştır ve kesin tanımlama için altın standart olarak kabul edilen dizi analizine başvurulmuştur.

3.2.1 MALDITOF-MS yöntemi

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 24 saatlik mantar kolonisinden alınan örnek, metal plak (“target”) üzerindeki kuyucuğa konulmuştur. Üzerine 1 µl %70’lik formik asit damlatılmış, kuruduktan sonra 1 µl matriks çözeltisi eklenmiştir. Matriks çözeltisi için 2,5 mg α-siyano-4-hidroksisinamik asit (HCCA, Sigma 70990, Birleşik Krallık) 75 µl metanol ve 150 µl organik çözücü (475 µl su, 500 µl asetonitril, 25 µl trifloroasetik asit) içinde çözülmüştür. Kuyucuktaki ekstre, MALDITOF-MS cihazı (Bruker Corporation, ABD) ile değerlendirilmiştir.

3.2.2 DNA Dizileme

Çalışmaya alınan izolatlarda *ITS* ve gerektiğinde *Rpb2* gen bölgeleri çoğaltılarak DNA dizileri değerlendirilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu

İzolatların 24 saat 37°C’de SDA’da üretilmesi ile elde edilen taze kolonilerden alınarak 20 µl steril distile su içeren steril mikrosantrifüj tüplerine konmuş ve homojenize edilmiştir. Maya süspansiyonu içeren tüpler 10 dakika 95°C’ye getirilmiş ısı bloğunda 10 dk ve sonra -80°C’lik derin dondurucuda 30 dk bekletilmiştir. Bu işlemler 3 kez tekrarlanmıştır. Hücrelerin ısı farkı ile lizise uğraması sonucu ekstrakte edilen DNA -20°C’de saklanmıştır ve polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kalıp DNA olarak kullanılmıştır (154).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzolatlara ait DNA’dan *ITS* ve gerektiğinde *Rpb2* genleri PZR ile çoğaltılmıştır. Bunun için kullanılan primerler Tablo 3.1’de, reaksiyon için kullanılan karışım Tablo 3.2’de, kullanılan PZR döngü sıcaklıkları Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.1. Dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler

Gen	Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Boyut (baz)	Kaynak
<i>ITS</i>	ITS1-F	5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3'	348	(28)
	ITS4-R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
<i>Rpb2</i>	Rpb2-6F	5'-TGGGGKWTGGTYTGYCCTGC-3'	708	
	Rpb2-7R	5'-CCCATWGCYTGCTTMCCCAT-3'		

Tablo 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan karışım içeriği

Bileşen	Miktar (µl)
Taq DNA Polimeraz (5U/ µl)	0,125
10X Tampon Çözeltisi (1,5 mM MgCl ₂ içeren)	3,0
MgCl ₂	2,7
dNTP Mix (10 mM)	0,6
Primer, "Forward" (10 pmol/µl)	1,2
Primer, "Reverse" (10 pmol/µl)	1,2
Kalıp DNA	1,0
DNAaz, RNaz içermeyen su	20,7
Toplam hacim	30,0

Tablo 3.3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan döngü sıcaklıkları

	Basamak	Sıcaklık	Süre
Döngüler			
İlk döngü	İlk denatürasyon	94°C	7 dakika
Ara döngüler (35 tekrar)	Denatürasyon	94°C	30 saniye
	Bağlanma (“Annealing”)	60°C (<i>ITS</i>) 51°C (<i>Rpb2</i>)	60 saniye
	Elongasyon	72°C	90 saniye
Son döngü	Son elongasyon	72°C	5 dakika
	Saklama	4°C	Sonsuz

DNA Dizi Analizi

ITS ve *Rpb2* geni PZR ürünlerinin DNA dizilimleri Sanger sekanslama ile belirlenmiştir. Bunun için, üretici firmanın önerilerine göre ürünler saflaştırılmıştır (PureLink PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, ABD). İlgili geni çoğaltan primer çiftinden biri ile BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında PZR ürünlerinin baz dizilimleri elde edilmiştir. Bioedit 7.2.5 Sequence Alignment Editor (Ibis Therapeutics, ABD) yazılımı ile kromatogram pikleri incelenerek dizi kalitesi kontrol edilmiştir. Yeterli kalitede kromatogram elde edilememesi durumunda koloniler yeniden üretilmiş, DNA ekstraksiyonundan başlayarak işlemler tekrarlanmıştır. Uygun bulunan DNA dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet sitesine yüklenmiştir. Burada kayıtlı DNA dizileriyle karşılaştırılmış ve sonuçlar Q skoru (“Query cover”), E skoru (“Expect Value”) ve I skoru (“Identity score”) baz alınarak incelenmiştir. Sonuçlarda Q skoru %100’e ve E skoru 0’a en yakın bulunan, I skoru en az %95 olacak şekilde karşılaştırılan dizi ile benzerlik gösterenler alınarak cins ve tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır (155).

3.2.3. İzolatlarda Filogenetik Analiz ile Tür Ayrımının Gösterilmesi

Filogenetik analiz için ilk olarak GenBank veri tabanında bulunan *S. capitata* ve *S. clavata* ITS gen bölgesi dizilimleri ile data set oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç için yan grup olarak *Trichosporon asahii* kullanılmıştır. Daha sonra sekanslama ile elde edilen izolat ITS dizileri FASTA formatında MEGA 11 programına yüklenmiş, bu programda filogenetik ağaç çizilmiştir. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında) Neighbour Joining (NJ) analizleri uygulanmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulurken Bootstrap 1000 metodu kullanılmıştır.

3.3. Virülans Faktörlerinin Araştırılması

Çalışmaya alınan *Saprochaete* izolatlarında diğer mantarlarda gözlenen bazı virülans faktörlerinin varlığı fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

3.3.1. Koagülaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Koagülaz aktivitesi varlığı tavşan ve insan plazmasında değerlendirilmiştir (95). Suşlar SDA'ya (Merck &Co., Almanya) pasajlanarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Steril tüplere 300 µl plazma konmuştur. Üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak tüplerdeki plazma ile süspanse edilmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Pıhtılaşma varlığı 2, 4, 6 ve 24. saatlerde kontrol edilip not edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

3.3.2. Hemoliz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

İzolatlarda hemolitik enzim varlığının araştırılması için %7 koyun kanlı ve at kanlı SDA kullanılmıştır. SDA besiyerinde 37°C'de 18-24 saat inkübe edilen taze kolonilerden steril serum fizyolojik (SF) içinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspanسیونlar hazırlanmıştır. Bu süspanسیونlardan 10 µl alınarak yaklaşık 5 mm çap oluşturacak şekilde kanlı SDA besiyerlerine ekim yapılmıştır. Plaklar 37°C'de 48 saat süre ile %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Her izolat 3 kez test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır (104, 156).

İnkübasyon sonrasında koloniler etrafında oluşan ışığı geçiren saydam beta-hemoliz zonları varlığı incelenmiştir. Hemoliz gözlenmesi durumunda, koloni çapının

koloni çapı ile Şeffaf zonun toplamına oranı (Hz) hesaplanması ve Hz değerine göre aşağıdaki Şekilde yorumlanması planlanmıŐtır:

- Hz=1: negatif
- Hz 0,90-1: +
- Hz 0,89-0,80: ++
- Hz 0,79-0,70: +++
- Hz<0,69: ++++

3.3.3. Asit Proteinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Asit proteinaz aktivitesi %1 sığır serum albümini içeren agarda (SSAA) test edilmiştir (157). Besiyerini hazırlamak için Tablo 3.4'te verilen malzemeler karıştırılmış, pH 5'e ayarlanmış ve otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri, 60°C'lik su banyosuna konmuştur. Sığır albümini %1 (w/v) çözeltisi 0,45 µm por çaplı membran filtreden geçirerek steril edildikten sonra ana besiyerine eklenmiştir. Son karışım petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. İzolatlar SDA'da 37°C'de 24 saat inkübe edilerek elde edilen kolonilerden steril SF içinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 10 µl alınarak SSAA yüzeyine damlatılmıştır. Ekim yapılan SSAA plakları 37°C'de altı gün süreyle inkübe edilmiştir. Her izolat için test üç kez tekrarlanmıştır.

İnkübasyon sonrasında koloni çevresinde bulunan proteinlerin yıkımına bağlı olarak koloni çevresinde şeffaf bir lizis zonu görülmesi asit proteinaz varlığı olarak değerlendirilmiştir. Lizis zon çapı ölçülerek, aşağıdaki şekilde proteinaz aktivitesinin düzeyinin belirlenmesi düşünülmüştür:

- Koloni çevresinde lizis zon oluşumu yok ise negatif,
- Lizis zonu 1-2 mm ise orta pozitif (+),
- 3-5 mm ise kuvveti pozitif (++)

Tablo 3.4. Sığır serum albüminli agar (SSAA) içeriği

Çözelti	Malzeme	Miktar
Besiyeri	Dekstroz	20,0 g
	MgSO ₄ (Merck&Co., Almanya)	0,5 g
	KH ₂ PO ₄ (Merck&Co., Almanya)	1,0 g
	Agar (Sigma Aldrich, Almanya)	20,0 g
	Distile su	900 mL
Sığır albümini çözeltisi (%1 w/v)	Sığır albümini fraksiyon V	1 g
	Distile su	100 ml

3.3.4. Fosfolipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Fosfolipaz aktivitesi yumurta sarısı ve sitrik asit disodyum fosfat tamponu içeren besiyerinde test edilmiştir (158). Besiyeri içeriği Tablo 3.5'te verilmiştir. Besiyerini hazırlamak için önce Çözelti C hazırlanmıştır. Yıkayıp etanolde bekletilen yumurtalardan aseptik koşullarda ayrılan yumurta sarıları steril cam boncuk içeren balonda iyice karıştırılarak homojenize edilmiştir. Uygun steril santrifüj tüplerine alınan yumurta sarısı solüsyonu 5000g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı ayrılarak kullanılmıştır. Besiyeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra 60°C'lik su banyosuna alınmıştır. Çözelti A ve Çözelti B'den 8'er ml eklenerek karıştırılmıştır. Son olarak 20 ml yumurta sarısı çözeltisi eklenmiş, pH 4.2'ye ayarlanarak petrilere dökülmüştür.

Test edilecek izotlar SDA'da 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, üreyen kolonilerden steril SF içinde McFarland 0,5 yoğunluğunda süspansiyon hazırlanmıştır. %8 oranında yumurta sarısı içeren pH:4.3 olan besiyerine 10 µl ekilmiştir. 37°C'de 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası presipitasyon zonu varlığı değerlendirilmiştir. Koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı fosfolipaz aktivitesi (Pz değeri) olarak hesaplanmıştır.

- Pz değeri ≤ 1 olanlar fosfolipaz aktivitesi olumsuz,
- < 1 olanlar olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Her izolat için test üç kez tekrarlanmıştır.

Tablo 3.5. Yumurta sarısı ve sitrik asit disodyum fosfat tamponu içeren besiyeri içeriği

Çözelti	Malzeme	Miktar
Besiyeri	SabauraudDekstrozAgar (Merck &Co., Almanya)	13,0 g
	NaCl (Merck&Co., Almanya)	11,7 g
	CaCl ₂ (Merck&Co., Almanya)	0,111 g
	Distile su	184 ml
Çözelti A (0,1 M sitrik asit)	C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O (Merck&Co., Almanya)	5,25 g
	Distile su	125 ml
Çözelti B (0,2 M disodyum hidrojen fosfat)	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Merck&Co., Almanya)	8,90 g
	Distile su	125 ml
Çözelti C	Homojenize yumurta sarısı	20 ml

3.3.5. Esteraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla Tween 80 (Biomatik, Kanada) agar kullanılmıştır (159). Besiyeri içeriği (Tablo 3.6) karıştırılıp homojenize edildikten sonra pH 6,8'e ayarlanmış ve besiyeri otoklavda steril edilmiştir. Yaklaşık 50°C'ye soğutulan besiyerine 5 mL steril Tween 80 eklenmiş ve petrilere dağıtılarak oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir.

Tablo 3.6. Tween 80 agar içeriği

Malzeme	Miktar
Pepton (Oksoid LP0037B ABD)	10,0 g
NaCl (Merck &Co., Almanya)	5,0 g
CaCl ₂ (Merck &Co., Almanya)	0,1 g
Agar (Merck &Co., Almanya)	15,0 g
Distile su	1000 MI

SDA'da 37°C'de 24 saat inkübe edilerek üretilen kolonilerden steril eküvyon ile Tween 80 agara 10 mm çapında daire biçiminde ekim yapılmıştır. Plaklar 30°C'de 10 gün inkübe edilerek her gün incelenmiştir.

Esteraz enzim varlığında serbest kalan yağ asitleri besiyerinin içeriğinde bulunan kalsiyum iyonları ile birleşerek çözünmeyen kalsiyum kristalleri oluşturmaktadır Üreyen koloni etrafında kristallerin çökmesi esteraz aktivitesi pozitifliği olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90030 kullanılmıştır.

3.3.6 Biyofilm Yeteneğinin Test Edilmesi

İzolatlarda biyofilm oluşturma yeteneğinin gösterilmesi için iki yöntem kullanılmıştır (127, 160). İlk yöntem olan 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) (Sigma Aldrich, ABD) indirgenme yöntemi ile biyofilm içindeki metabolik aktivitenin gösterilmesi, kristal viyole boyama yöntemi ile ise biyokütle oluşumunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

Maya özütü pepton dekstroz (“yeast peptone dextrose”, YPD) sıvı besiyeri için Tablo 3.7’de verilen malzemeler karıştırılarak homojenize edilmiş ve otoklavda steril edilmiştir.

Tablo 3.7. YPD besiyeri içeriği

Malzeme	Miktar
Maya özütü (Merck&Co., Almanya)	10 g
Pepton (Oxoid, ABD)	20 g
Dekstroz (Sigma Aldrich, ABD)	20 g
Distile su	1 L

RPMI 1640 besiyeri için, 10,4 g RPMI 1640 (Sigma 6504, Sigma Aldrich, ABD) ve 34,53 g 3-(N-morfolino) propansulfonik asit (MOPS, Sigma M1254, Sigma Aldrich, ABD) karıştırılmış, homojenize edilmiş, 1M NaOH ile pH 7.0’ye ayarlanmıştır. Son hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde distile su eklendikten sonra 0.22 µm por çapı olan filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

XTT çözeltisi için 50 mg XTT (X4251, Sigma Aldrich, ABD) 100 ml PBS (pH 7,0) içerisinde çözülmüş, 0.22 µm por çaplı filtre kullanılarak steril edilmiştir. Çözelti ışıktan korunacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak -70°C’de saklanmıştır.

Menadion 10 mM çözeltisini hazırlamak için 17,22 mg Menadion (M5625, AppliChem, Almanya) 10 ml %100’lük aseton içinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti -70°C’de saklanmıştır.

XTT/menadion çözeltisinin hazırlanması için önceden hazırlanan %0,5’lik XTT ve 10mM menadion çözeltileri dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığına

gelmeleri beklenmiştir. Testte kullanılacak her plak için 10 ml XTT çözeltisine 1 µl menadion eklenerek kullanım çözeltisi hazırlanmıştır.

Biyofilm Testleri için Maya İnokulumunun Hazırlanması

SDA'da üretilen 24 saatlik kolonilerden YPD besiyerine ekim yapılmış, çalkalamalı inkübatör de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreme olan YPD besiyeri 3000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülmüştür. Pellet üzerine önce 5 ml, sonra 2 ml steril tuzlu fosfat tamponu ("phosphate buffered saline", PBS) eklenerek santrifüj ve süpernatantın uzaklaştırılması işlemleri tekrarlanmıştır. Son olarak pellet üzerine 0,5 ml SF eklenip vortekslenmiştir.

PBS ile üç kez yıkanarak elde edilen maya hücresi süspansiyonundan SF içinde 1×10^6 CFU/ml olacak şekilde (spektrofotometrede optik dansite (OD) %62-64) süspansiyon hazırlanmıştır.

Mikroplakta Biyofilm Oluşturulması

Test için 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklar (Greiner Bio-One GmbH, Avusturya) kullanılmıştır. Her kuyucuğa 50 µl RPMI 1640 konulmuş, hazırlanan inokulumdan 50 µl kuyucuklara eklenmiştir. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar dikkatli şekilde 200 µL steril PBS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında plaklar kurutma kâğıdına ters çevrilerek tüm PBS'in akması sağlanmış ve kuyucuklarda PBS kalmayacak şekilde kurutulmuştur. Her teste pozitif kontrol olarak alınan biyofilm pozitif *C. albicans* MYA 274'ün yanı sıra *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 dahil edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Test tüm izolatlar için 2 kez tekrar edilmiştir.

XTT indirgenme yöntemi ile biyofilm metabolik aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma yeteneği XTT indirgenmesi ile test edilmiştir (160). Biyofilm oluşumu sonrasında PBS ile yıkanıp kurutulmuş plaklarda her kuyucuğa 100µl XTT/ menadion solüsyonu konmuştur. Plaklar alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklardaki renk değişimi

spektrofotometrede (BioTek Epoch, ABD) 492 nm dalga boyunda ölçülmüş ve optik dansite (OD) değerleri belirlenmiştir.

Kristal viyole yöntemiyle biyofilmde oluşan biyokütlenin belirlenmesi

Biyofilm oluşumu ile ortaya çıkan biyokütle kristal viyole boyama ile tespit edilmiştir (127, 161). Biyofilm oluşturulmuş, PBS ile yıkanmış ve kurutulmuş plaklarda her kuyucuğa 100 µl %0,05 (w/v) kristal viyole (Merck & Co., ABD) çözeltisi eklenmiştir. Plaklar 10 dk etüvde bekletildikten sonra kuyucuklar boşaltılmış ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kurutulmuş ve 100 µl %95 etanol eklenmiştir. Her kuyucuktan 75 µl alınarak temiz düz tabanlı mikropiçle aktarılmıştır. Plaklar spektrofotometrede (BioTek Epoch, ABD) 570 nm dalga boyunda okutulmuş optik dansite (OD) değerleri belirlenmiştir.

Biyofilm Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Negatif kontrol kuyucuklarının ortalama OD değerine 3 standart sapma eklenerek elde edilen sınır değere göre izolatların biyofilm yeteneği şu şekilde değerlendirilmiştir (162):

- Negatif: İzolata ait sonuç değeri < Sınır değeri
- Zayıf pozitif: Sınır değeri < İzolata ait sonuç değeri < 2x Sınır değeri
- Orta derecede pozitif: 2x Sınır değeri < İzolata ait sonuç değeri < 4x Sınır değeri
- Güçlü pozitif: İzolata ait sonuç değeri > 4x Sınır değeri

Bu değerlendirmeye ek olarak, izolatların OD değerinden negatif kontrol OD değerleri çıkarılmış, pozitif kontrol olarak kullanılan *C. albicans* MYA 274'ye ait değer %100 kabul edilerek izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri pozitif kontrole göre % olarak sınıflandırılmıştır.

3.4 *In Vitro* Antifungal Duyarlılık Testleri

Saprochaete izolatlarının amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve mikafungin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI ve EUCAST referans yöntemleri ile belirlenmiştir (146, 147). Kalite kontrol amacıyla her testte *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları da çalışılmıştır.

3.4.1 CLSI Referans Mikrodilüsyon Yöntemi

CLSI M27-A dokümanında önerilen mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (146).

RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması

CLSI tarafından önerilen mikrodilüsyon yönteminde L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri için 10,4 g RPMI 1640 (Sigma Aldrich 6504, ABD) ve 34,53 g MOPS (Sigma Aldrich M1254, ABD) 900 mL distile suya eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ilave edilerek, oda sıcaklığında 7,0 olarak ayarlanmıştır. Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besiyeri 0.2 µm por çaplı filtre ile süzülerek steril hale getirilmiştir.

Test Plaklarının Hazırlanıp Dondurulması

İlaç dilüsyonları amfoterisin B ve vorikonazol için 0,016- 8 µg/mL, flukonazol için 0,125-64 µg/mL ve mikafungin için 0,03-16 µg/mL aralığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan antifungal dilüsyonlar 96 kuyucuklu U-tabanlı mikropklarlarda her satırdaki 1-10. kuyucuklara 100'er µL dağıtılmıştır. 11. ve 12. kuyucuğa 100'er µl antifungal içermeyen besiyeri eklenmiştir. 11. kuyucuk üreme kontrolü, 12. kuyucuk sterilite kontrolü olarak ayrılmıştır. Plaklar kullanılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

Test Edilecek İzolatların Hazırlanması

İzolatlar 24 saat SDA besiyerinde inkübe edilmiştir. Koloniler ıslatılmış eküvyon ile alınarak 200 µl Tween 20 (Biomatik, Kanada) içeren 5 mL SF içerisinde homojenize edilmiştir. Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapılmış, $2-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak şekilde (1 küçük karede 13-32 hücre) maya solüsyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, hazırlanan inokulum solüsyonlarının bulanıklığı spektrofotometrede 530 nm'de ölçülerek OD değerleri kaydedilmiştir. Hazırlanan inokulumdan 250 µL alınıp 4,75 mL RPMI 1640 içeren tüpe konularak seyreltilmiştir. Seyreltilmiş karışımın bulunduğu tüpten 100 µL alınıp 4,9 ml RPMI 1640 içeren tüpe konularak bir kez daha seyreltilmiştir. Son maya süspansiyonundan ($0,5-2,5 \times 10^6$ cfu/ml) mikroplağa ekim yapılmıştır.

İnokulumların Dağıtılması, İnkübasyon ve Değerlendirme

Daha önce hazırlanan ve -80 de hazırlanıp saklanan antifungal dilüsyon içeren mikroplaklar oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Her sırada ilk 11 kuyucuğa hazırlanan maya süspansiyonları dağıtılmıştır. 12. kuyucuğa sterilit kontrolü için 100 µL RPMI 1640 besiyeri eklenmiştir. Plaklar 37°C'de inkübe edilmiş, 24 ve 48. saatlerde görsel olarak okuma yapılmıştır, üremenin yeterliliği kontrol edilmiştir. Flukonazol, vorikonazol ve mikafungin için üreme kontrol çukuru göre %50, amfoterisin B için ise %100 inhibisyonun görüldüğü çukurdaki değer MİK olarak belirlenmiştir.

3.4.2. EUCAST Referans Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu test için EUCAST Mayalar için Duyarlılık Test Yöntemi v.7.3.2 kullanılmıştır (147).

RPMI 1640 Besiyerinin İki Kat Konsantrasyonda ve %2 Glukozlu Olarak Hazırlanması

EUCAST antifungal duyarlılık testlerinde %2 glukoz eklenmiş ve 2 kat konsantrasyonda hazırlanmış L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 sıvı besiyeri önerilmektedir. Besiyerinin hazırlanması için 900 ml distile suya 20,8 g RPMI

1640, 69,06 g MOPS ve 36 g glukoz eklenmiştir. Besiyeri pH'ı 1 M NaOH çözeltisi ile 7,0'a ayarlanmış ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenmiştir. Çözelti 22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Test Plaklarının Hazırlanıp Dondurulması

CLSI yönteminde hazırlanana benzer şekilde uygun besiyeri içinde hazırlanan antifungal dilüsyonları, amfoterisin B ve vorikonazol için 0,016- 8 µg/mL, flukonazol için 0,125-64 µg/mL, mikafungin için 0,03-16 µg/mL aralığında olacak şekilde düz tabanlı mikropklara (Greiner Bio-One GmbH, Avusturya) dağıtılmıştır. Her satırda 11. ve 12. kuyucuğa antifungal içermeyen 2x RPMI 1640 besiyeri konmuş ve sırasıyla üreme kontrolü ve besiyeri kontrolü olarak ayrılmıştır. Plaklar -80°C'de saklanmıştır.

Test Edilecek İnokulumun Hazırlanması

İzolatların 24 saat SDA besiyerinde inkübe edilmiş kolonilerinden ısılatılmış eküvyon ile alınarak 200 µl Tween 20 (Biomatik, Kanada) içeren 5 mL SF içerisinde süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondaki hücre miktarı Thoma lamında sayılarak $2-5 \times 10^6$ cfu/mL (1 küçük karede 13 -32 hücre) olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonların 530 nm'deki OD değerleri spektrofotometrede ölçülerek not alınmıştır. Uygun sayıda hücre içeren süspansiyondan 500 µl alınarak 4,5 mL distile su içeren tüpe eklenmiş ve bu karışım ($2-5 \times 10^5$ cfu/ml) mikropklara ekim için kullanılmıştır.

İnokulumların Dağıtılması ve Değerlendirme

Önceden hazırlanan plaklar derin dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığında çözülmesi beklenmiştir. Her satırda ilk 11 kuyucuğa hazırlanan maya süspansiyonları dağıtılmıştır. 12. kuyucuğa sterilit kontrolü için 100 µL steril distile su eklenmiştir. Plaklar kapatılarak 37°C'de inkübe edilmiş, 24 ve 48. Saatlerde 530 nm'de spektrofotometrede (BioTek Epoch, ABD) okutularak OD değerleri ölçülmüştür. Tüm kuyucuklardan negatif kontrol kuyucuklarına ait OD değerlerinin ortalaması çıkarılmış ve her izolata ait üreme kontrolü ile karşılaştırılarak üreme oranları

bulunmuştur. Flukonazol, vorikonazol ve mikafungin için üreme kontrolü OD değerine göre $\geq\%50$, amfoterisin B için $\geq\%90$ inhibisyon gözlenen kuyucuklara ait değerler MİK değeri olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmaya stok kültürlerden üretilerek saf olduğu doğrulanan 57 *Saprochaete* izolatu dahil edilmiştir. Rutin laboratuvarında kullanılan konvansiyonel yöntemler ve biyokimyasal asimilasyon testi temelli ID32C sistemi ile izolatlardan 53'ünün *S. capitata*, 4 ünün ise *S. clavata* olarak tanımlandığı not edilmiştir.

4.1.1. MALDI-TOF MS ile Tanımlama Sonuçları

Çalışmaya alınan izolatların tamamı MALDI-TOF MS yöntemi ile cins düzeyinde *Saprochaete* spp. olarak tanımlanmıştır. Tür düzeyinde 53 izolat *S. capitata* 4 izolat *S. clavata* olarak sonuç vermiştir. *S. clavata* izolatlarının birinde skor 1.7'nin altında kalmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 MALDI-TOF MS ile cins ve tür düzeyinde tanımlama skorlarına göre dağılım

Mikroorganizma	MALDI-TOF MS Skoru			Toplam
	≥2	<2-≥1.7	<1.7	
<i>S. capitata</i>	52	1	0	53
<i>S. clavata</i>	2	1	1	4
Toplam	54	2	1	57

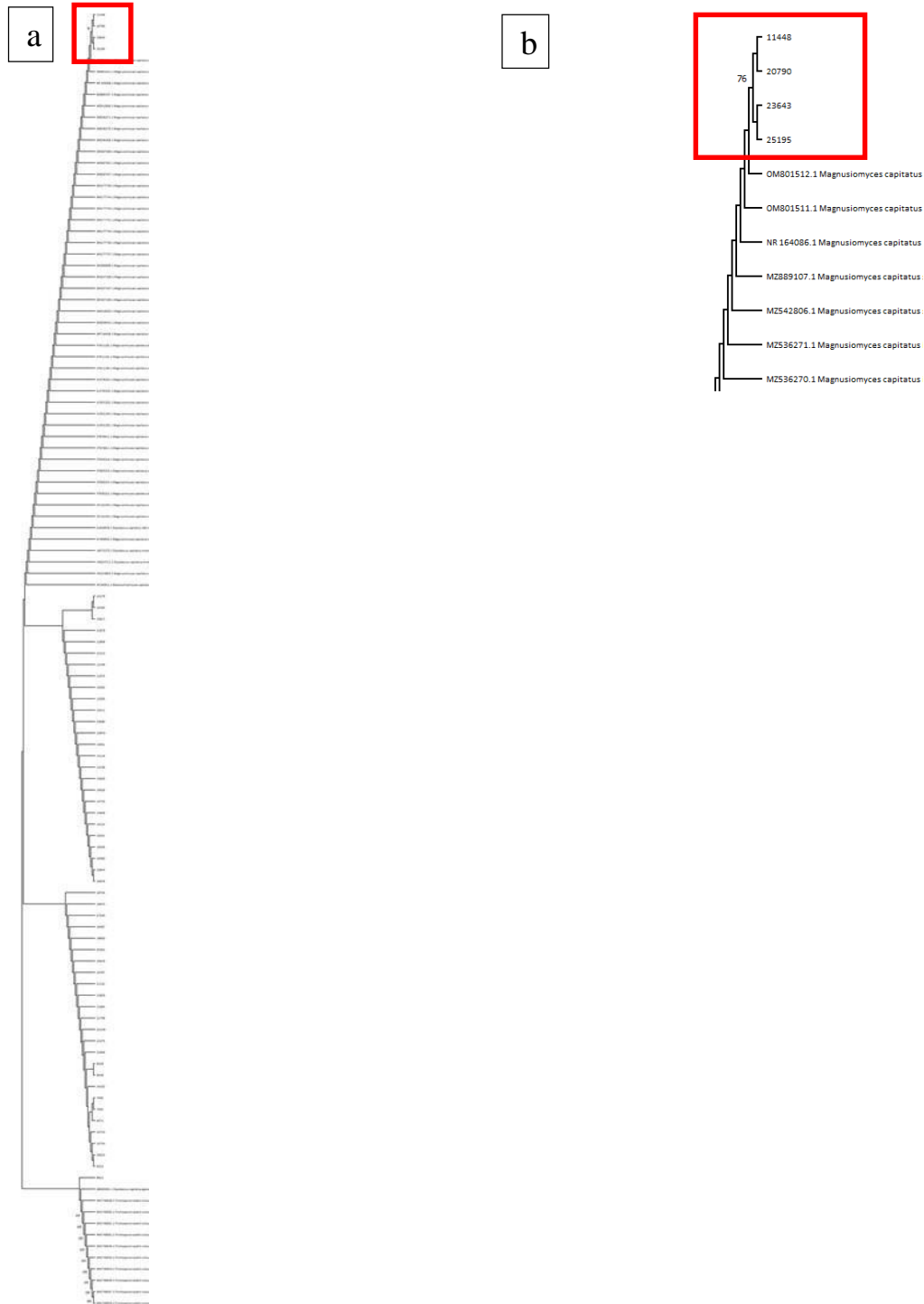
4.1.2. DNA Dizi Dizileme ile Tanımlama Sonuçları

Saprochaete izolatlarının tamamında *ITS* geni çoğaltılmış ve dizisi referans suşlar ile karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal test ve MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçlarına benzer şekilde 53 izolat *S. capitata* (*M. capitatus*) ve 4 izolat *S. clavata* olarak tanımlanmıştır (ID skoru >%97).

S. clavata izolatlarından üçünde ayrıca *rpb2* geni dizisi de incelenmiş ve sonuç aynı tür olarak doğrulanmıştır (ID skoru >%99).

4.1.3 Filogenetik analiz

Saprochaete izolatlarının ITS dizi ile çizilen filogenetik ağaçta dört *S. clavata* izolatının ayrı kümelendiği görülmüştür.

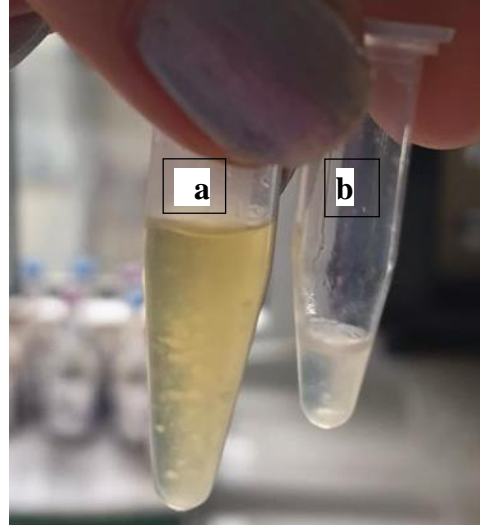


Şekil 4.1. Çalışmaya alınan *Saprochaete* izolatlarının filogenetik analizi a) tüm izolatlar, b) *S. clavata* izolatlarının ayrımı (kesilmiş şekil)

4. 2. Virülans Faktörleri

4.2.1. Koagülaz

Koagülaz açısından değerlendirilen 57 izolatın tavşan plazması ve insan plazmasında yapılan 24 saat ve 48 saatlik gözlemlerde koagülasyon oluşmadığı görülmüş ve tüm izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.2).

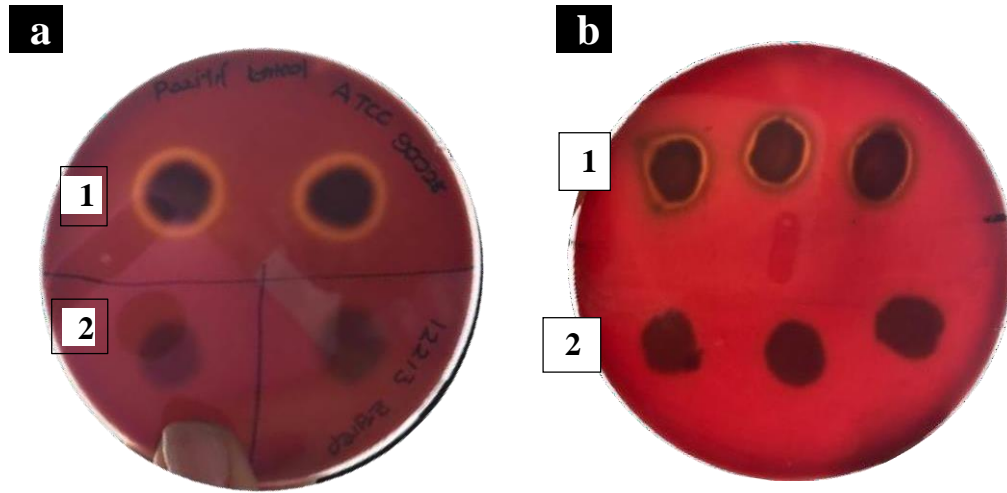


Şekil 4.2. Koagülasyon testi sonuçları.

- a) insan plazmasında,
- b) tavşan plazmasında.

4.2.2. Hemoliz

Hemoliz yapması açısından değerlendirilen 57 izolatın koyu kanı ve at kanında yapılan 24 saat ve 48 saatlik gözlemlerde tüm izolatların hemoliz zonu oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 4.3).

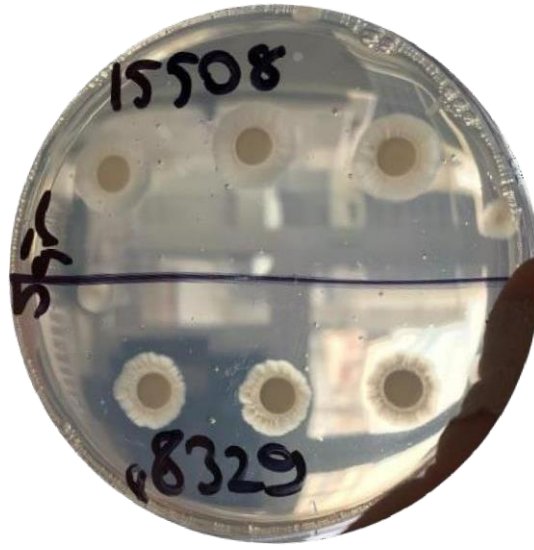


Şekil 4.3. Koyun kanlı agar (a) ve at kanlı agarda (b) hemoliz aktivitesine örnekler.

- 1) pozitif kontrol *Candida albicans* ATCC 90028,
- 2) *Saprochaete* izolatları

4.2.3. Asit Proteinaz

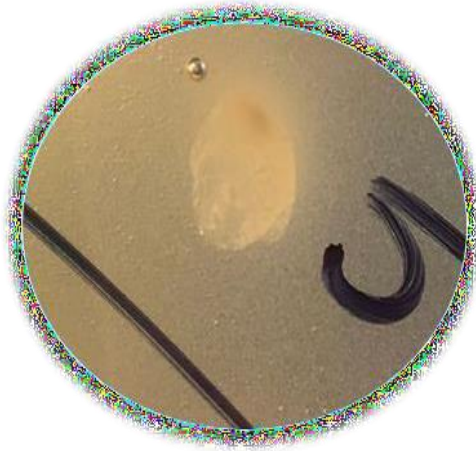
Asit proteinaz aktivitesinin testi için yapılan üç ayrı pasajla ayrı günlerde de yapılan üç tekrarın sonucuna göre 57 izolatın tamamının negatif olduğu, asit proteinaz zonu oluşturmadığı görülmüştür. Tür düzeyinde asit proteinaz aktivitesi için bir ayırım gözlemlenmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *Saprochaete* izolatlarının %1 sığır albümini içeren besiyerinde üremesi. Koloni etrafında saydam lizis zonu tespit edilememiş ve asit proteinaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.2.4 Fosfolipaz

Fosfolipaz aktivitesinin testi için yapılan üç ayrı pasajla ayrı günlerde de yapılan üç tekrarın sonucuna göre 57 izolatın tamamının negatif olduğu, asit proteinaz zonu oluşturmadığı görülmüştür (Şekil 4.5).



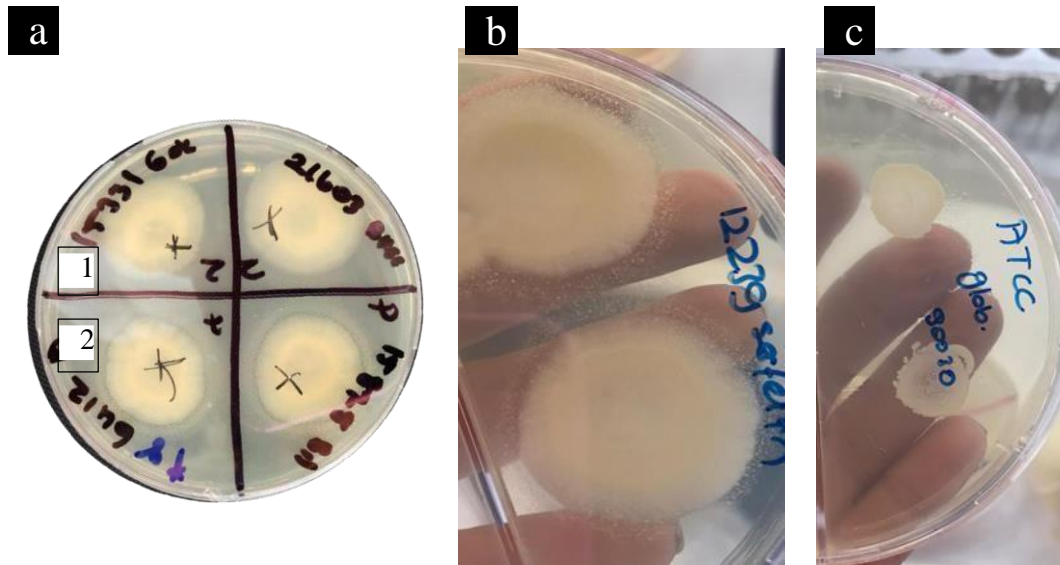
Şekil 4.5. *Saprochaete* izolatlarının %8 yumurta sarısı içeren besiyerinde üremesi. Koloni etrafında presipitasyon zonu tespit edilememiş ve fosfolipaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.2.5. Esteraz

Saprochaete izolatlarında esteraz aktivitesi Tween 80 agarda oluşan kristallerin görülmesi ile fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Test üç kez tekrarlanmış, bir izolat dışında tüm izolatlarda üç test sonucu aynı bulunmuştur. Bir *S. capitata* izolatında iki testte negatif iken, bir testte zayıf pozitiflik gözlenmiştir. Bu izolat negatif kabul edildiğinde, tüm izolatlarda esteraz pozitifliği %56,1; *S. capitata* izolatlarında ise %50,9 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Esteraz aktivitesi

	Test 1		Test 2		Test 3	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>S. capitata</i> (n=53)	27	26	28	25	27	26
<i>S. clavata</i> (n=4)	3	1	3	1	3	1
Toplam (n=57)	32	25	31	24	32	25



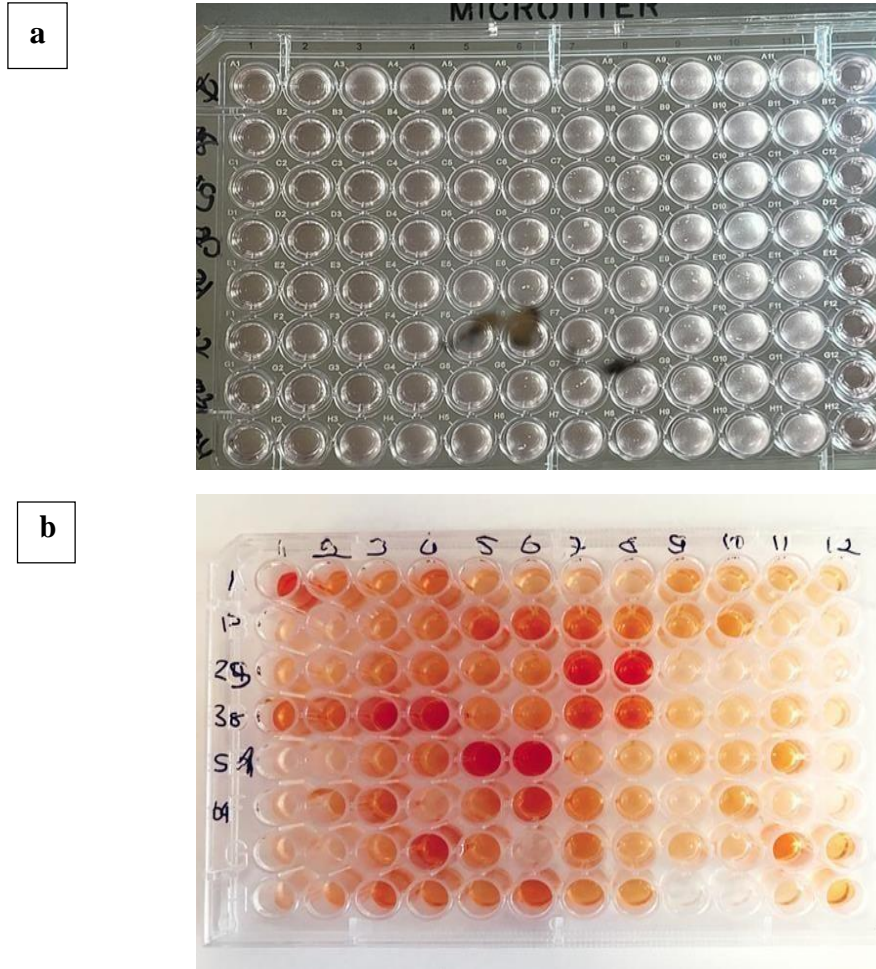
Şekil 4.6. Tween 80 agarda esteraz testi sonuçları

- Esteraz negatif (1) ve esteraz pozitif (2) *Saprochaete* izolatları
- Esteraz pozitif *Saprochaete* spp.
- Esteraz negatif *Candida glabrata* ATCC 90030

4.2.6. Biyofilm Oluşturma Özelliği

Biyofilmde Metabolik Aktivitenin Test Edilmesi

Saprochaete izolatlarında biyofilmde metabolik aktivitenin saptanması için yıkama sonrasında biyofilm varlığı gözlemlenildikten sonra (Şekil 4.7a) XTT ile inkübe edilmiş ve renk değişikliği görülmüştür (Şekil 4.7b). Spektrofotometrik ölçüm ile kantitatif değerlendirme yapılmıştır.

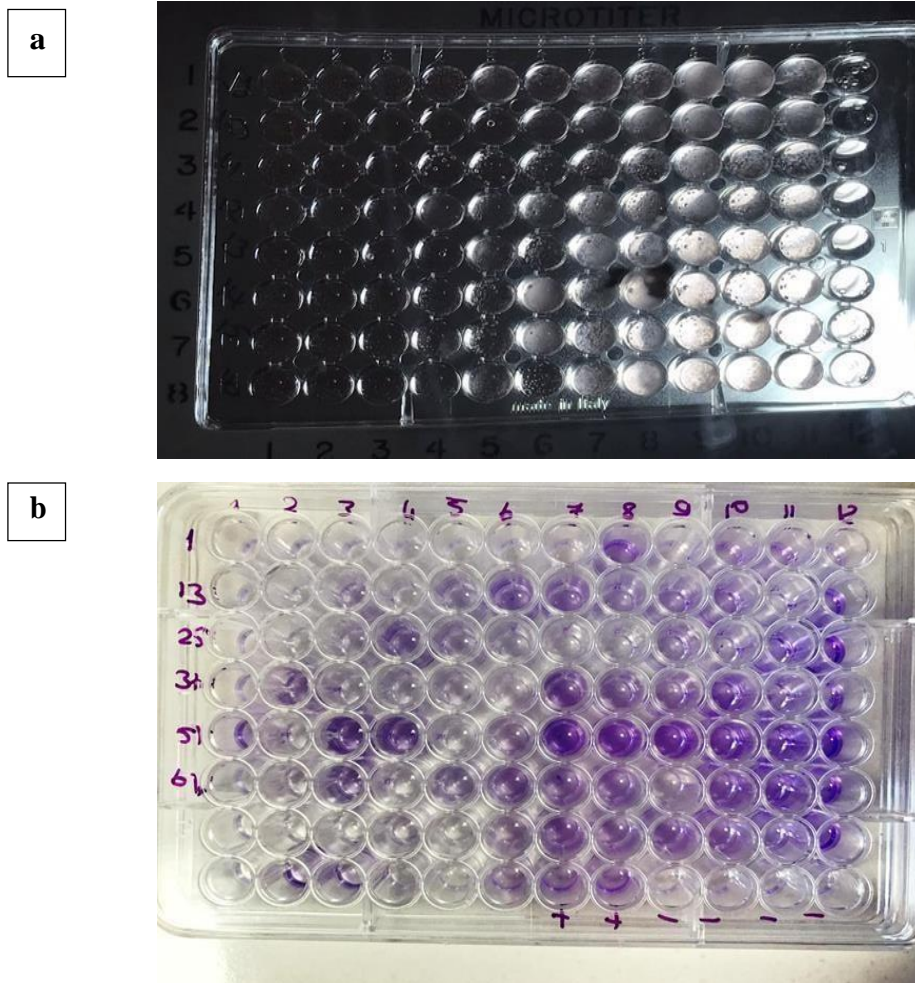


Şekil 4.7. *Saprochaete* izolatlarında biyofilm varlığının gösterilmesi

- a) Yıkama sonrası görülen biyofilm
- b) Yıkama sonrası XTT ile gösterilen metabolik aktivite

Biyofilmde Oluşan Biyokütlenin Gösterilmesi

Saprochaete izolatlarında oluşan biyofilmde elde edilen biyokütlenin ölçümü için kristal viyole yöntemi kullanılmış, biyofilm varlığı gözle saptandıktan sonra (Şekil 4.8a) boyama yapılmış (Şekil 4.8b) ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. *Saprochaete* izolatlarında biyofilm varlığının gösterilmesi

- a) Yıkama sonrası görülen biyofilm
- b) Yıkama sonrası kristal viyole ile boyanarak gösterilen biyokütle

Biyofilm Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Saprochaete izolatlarında biyofilm oluşturma yeteneğinin gösterilmesi kullanılan iki yöntemde de okuma spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Elde edilen OD değerleri, önceki çalışmalarda önerilen şekilde (124, 162), negatif kontrolün standart sapmasına göre sınır değer hesaplanarak incelendiğinde XTT testinde ve kristal viyole testinde izolatların tümü güçlü pozitif bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *Saprochaete* izolatlarında biyofilm metabolik aktivite ölçümü (XTT) ve biyokütle tespiti (KV) sonuçlarına göre biyofilm oluşturma özelliği. (Negatif kontrol sonuçları temel alınarak hesaplanan sınır değere göre)

Test	Mikroorganizma	Negatif		Güçlü Pozitif		Toplam
		n	%	N	%	N
XTT	<i>S. capitata</i>	-	-	53	100,0	53
	<i>S. clavata</i>	-	-	4	100,0	4
	Toplam	-	-	57	100,0	57
KV	<i>S. capitata</i>	-	-	53	100,0	53
	<i>S. clavata</i>	-	-	4	100,0	4
	Toplam	-	-	57	100,0	57

XTT: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

KV: Kristal viyole

İzolatların biyofilm yeteneğinin daha ayırt edici olarak sınıflandırılabilmesi için pozitif kontrol izolatu için elde edilen sonuç %100 kabul edilerek izolatların sonuçları yüzde olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Bu değerlendirme ışığında, metabolik aktivite pozitif kontrole göre %26-50 aralığında yoğunlaşmıştır. İzolatların %40,4'ünün pozitif kontrolden fazla biyokütle oluşturabildiği gözlenmiştir.

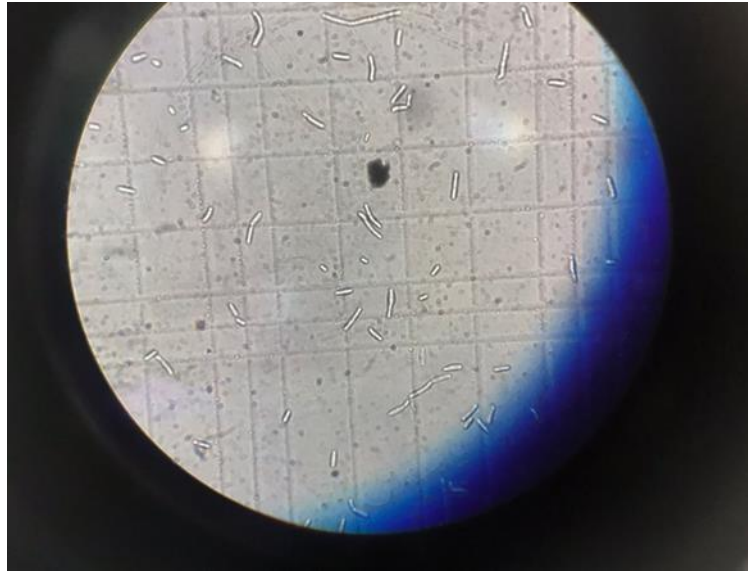
Tablo 4.4. *Saprochaete* izolatlarında biyofilm metabolik aktivite ölçümü (XTT) ve biyokütle tespiti (KV) sonuçlarına göre biyofilm oluşturma özelliği. (*C. albicans* MYA274 pozitif kontrol suşu sonucu %100 kabul edilerek)

Test	Mikroorganizma	≤%25		%26-50		%51-75		%76-100		>%100		Toplam
		n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	
XTT	<i>S. capitata</i>	3	5,7	40	75,5	6	11,3	4	7,5	-	-	53
	<i>S. clavata</i>	-	-	1	25,0	-	-	2	50,0	1	25,0	4
	Toplam	3	5,3	41	71,9	6	10,5	6	10,5	1	1,8	57
KV	<i>S. capitata</i>	-	-	10	18,9	6	11,3	14	26,4	23	43,4	53
	<i>S. clavata</i>	-	-	1	25,0	3	7,5	-	-	-	-	4
	Toplam	-	-	11	19,3	9	15,8	14	24,6	23	40,4	57

4.3. Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları

4.3.1 İnokulum Hazırlığı Sonuçları

CLSI ve EUCAST antifungal duyarlılık testleri için belirtilen prosedüre göre hazırlanan inokulum için her örnek için Thoma lamında sayım yapılmıştır (Şekil 4.9). Mantar hücrelerinin morfolojisine dikkat edilerek uygun miktarda hücre içeren solüsyonlar hazırlanmıştır.



Şekil 4.9. *Saprochaete* inokulum hazırlığı için Thoma lamında hücre sayımı.

İnokulum yoğunluğu her izolat için $2-5 \times 10^6$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Thoma lamında sayılarak ayarlanan her inokulum için spektrofotometrede 530 nm'de absorbans ölçülerek not edilmiştir. Antifungal duyarlılık testleri için uygun inokulum absorbans değerinin %62,0- 65,8 arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Çalışmaya alınan *Saprochaete* izolatlarından hazırlanan inokulumlarda hücre sayımı ve spektrofotometrede yapılan ölçüm sonuçları.

İzolat no	Hücre Sayısı (x10⁶)	Spektrofotometrik Ölçüm (%)
1	4,8	63,4
2.	4,8	62,8
3.	5,1	62,4
4.	3,8	64,5
5.	3,8	64,0
6.	4,0	64,1
7.	5,0	62,0
8.	4,6	63,1
9.	3,5	65,2
10.	5,0	62,0
11.	4,0	63,8
12.	3,7	65,1
13.	4,8	62,6
14.	4,6	63,1
15.	5,0	62,5
16.	4,8	63,0
17.	4,5	62,8
18.	4,3	63,1
19.	4,3	63,9
20.	4,6	63,2
21.	3,5	65,2
22.	3,5	65,1
23.	5,1	62,5
24.	3,8	64,8
25.	3,7	64,5
26.	4,2	63,4
27.	5,0	62,0

Tablo 4.5. (devam) Çalışmaya alınan *Saprochaete* izolatlarından hazırlanan inokulumlarda hücre sayımı ve spektrofotometrede yapılan ölçüm sonuçları.

28.	5,0	62,5
29.	4,8	62,7
30.	4,3	63,4
31.	3,8	65,5
32.	4,0	64,6
33.	4,2	63,0
34.	4,2	64,1
35.	5,1	62,2
36.	4,8	62,8
37.	5,1	62,1
38.	4,3	63,3
39.	4,8	62,4
40.	3,4	65,2
41.	5,1	62,1
42.	3,2	65,8
43.	5,0	62,0
44.	5,1	62,0
45.	5,1	62,1
46.	4,6	62,9
47.	4,6	63,0
48.	4,8	62,5
49.	5,0	62,5
50.	4,5	63,5
51.	4,2	64,0
52.	4,6	63,1
53.	5,3	62,0
54.	5,4	62,0
55.	4,8	62,3
56.	4,3	63,0
57.	5,3	62,0

4.3.2 Referans Mikrodilüsyon Testleri ile Elde Edilen MİK Değerleri

Amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve mikafungin için CLSI ve EUCAST referans yöntemleri ile 24 ve 48 saatte MİK değerleri not alınmıştır.

CLSI yönteminde, 24 saatlik inkübasyon sonrasında üreme kontrolündeki bulanıklık okuma için yetersiz bulunduğu için, mikafungin hariç 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen MİK değerleri alınmıştır. Ek olarak 72 saatlik inkübasyon sonrasında da değerlendirilen 14 izolatta, 48 saate göre elde edilen MİK değerlerinin amfoterisin B için değişmediği, flukonazol için en fazla 1 dilüsyon, vorikonazol için 2 dilüsyon değişebildiği gözlenmiştir. Mikafungin için inkübasyon süresi uzatıldığında MİK değerlerinde artış eğilimi gözlenmiş; ancak, öneriler doğrultusunda 24 saatlik okuma değerleri alınmıştır.

EUCAST yönteminde, MİK değerinin tespiti için üreme kontrol kuyucuğunda yeterli üreme OD değerinin $\geq 0,200$ olması olarak belirlenmiştir. İnkübasyon 24 saat ile sınırlandığında üreme kontrolünün uygun düzeye eriştiği izolatlar (3/57) sınırlı kalmıştır. Flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B için 24 saatte üreme kontrolünü $\geq 0,200$ olduğu 3 izolat için 24, diğerleri için 48 saatlik okuma değerleri alınmıştır. Okumanın 72 saate uzatıldığı 26 izolatta MİK değerlerinin 2 dilüsyona kadar değişebildiği görülmüştür. Mikafungin için kılavuz önerilerine uyularak 24 saatlik MİK değerleri alınmış, 48 ve 72 saatte MİK değerlerinde artış eğilimi gözlenmiştir.

Referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen MİK değerlerinin geometrik ortalaması, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

EUCAST yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ile CLSI yöntemiyle elde edilenler karşılaştırılmıştır. Amfoterisin B için 5 izolatta, mikafungin için 2 izolatta (%3,5) EUCAST ile CLSI yöntemine göre 2 dilüsyon daha düşük MİK değeri saptanmıştır. Flukonazol, vorikonazol ve mikafungin için ise sırasıyla izolatların %56,1, %84,2 ve %63,2'sinde EUCAST ile CLSI yöntemine göre ≥ 2 dilüsyon yüksek MİK değerleri bulunmuştur. İzolatların geri kalanında EUCAST ve CLSI yöntemiyle elde edilen MİK değerleri ± 1 dilüsyon aralığında dağılmıştır.

Tablo 4.6. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve mikafungin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin geometrik ortalaması (GM), MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

		CLSI				EUCAST			
		AMB	FLU	VOR	MİKA	AMB	FLU	VOR	MİKA
<i>S. capitata</i>	GM	1,74	3,33	0,11	2,94	0,95	8,21	0,93	12,81
(n=53)	MİK50	2	4	0,125	2	1	8	1	16
	MİK90	2	8	0,25	32	1	16	4	32
<i>S. clavata</i>	GM	1,41	2,83	0,07	1,68	0,84	16,00	1,00	4,00
(n=4)	MIC50	-	-	-	-	-	-	-	-
	MIC90	-	-	-	-	-	-	-	-
Tüm	GM	1,71	3,06	0,11	3,50	0,94	8,61	0,94	11,81
(n=57)	MIC50	2	4	0,125	4	1	16	1	16
	MIC90	2	8	0,25	16	1	32	4	32

AMB: Amfoterisin B
 FLU: Flukonazol
 VOR: Vorikonazol
 MİKA: Mikafungin

Her iki referans yöntem ile elde edilen, MİK değerlerinin dağılımları amfoterisin B için Tablo 4.7’de, flukonazol için Tablo 4.8’de, vorikonazol için Tablo 4.9’da ve mikafungin için Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.7. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen amfoterisin B MİK değerlerinin türlere göre dağılımı (n).

		Amfoterisin B MİK (mg/l)										
		0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>8
CLSI	<i>S. capitata</i>	-	-	-	-	-	-	11	42	-	-	-
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-
	Tüm izolatlar	-	-	-	-	-	-	13	44	-	-	-
EUCAST	<i>S. capitata</i>	-	-	-	-	-	8	41	4	-	-	-
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-
	Tüm izolatlar	-	-	-	-	-	9	44	4	-	-	-

Tablo 4.8. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen flukonazol MİK değerlerinin türlere göre dağılımı (n).

		Flukonazol MİK (mg/l)										
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64
CLSI	<i>S. capitata</i>	-	2	1	7	8	23	11	1	-	-	-
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	2	-	1	-	1	-	-	-
	Tüm izolatlar	-	2	1	9	8	24	11	2	-	-	-
EUCAST	<i>S. capitata</i>	-	-	3	3	3	3	15	21	4	1	-
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	-	-	1	-	2	-	1	-
	Tüm izolatlar	-	-	3	3	3	4	15	23	4	2	-

Tablo 4.9. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen vorikonazol MİK değerlerinin türlere göre dağılımı (n).

		Vorikonazol MİK (mg/l)										
		0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	>8
CLSI	<i>S. capitata</i>	1	9	7	20	14	2	-	-	-	-	-
	<i>S. clavata</i>	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-
	Tüm izolatlar	2	10	8	20	14	2	1	-	-	-	-
EUCAST	<i>S. capitata</i>	-	2	1	-	1	9	26	8	6	-	-
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1
	Tüm izolatlar	-	2	1	-	2	11	26	8	6	-	1

Tablo 4.10. *Saprochaete* izolatlarında referans CLSI ve EUCAST yöntemleri ile elde edilen mikafungin MİK değerlerinin türlere göre dağılımı (n).

		Mikafungin MİK (mg/l)										
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
CLSI	<i>S. capitata</i>	-	-	-	-	3	14	17	8	1	-	10
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-
	Tüm izolatlar	-	-	-	-	3	15	20	8	1	0	10
EUCAST	<i>S. capitata</i>	-	-	-	-	-	1	5	7	4	16	20
	<i>S. clavata</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2
	Tüm izolatlar	-	-	-	1	0	2	5	7	4	16	22

5.TARTIŞMA

Saprochaete nadir görülen fırsatçı fungal patojenlerden biridir (1). Başıklık sistemi baskılanmış kişilerde invaziv ve hayatı tehdit eden enfeksiyonların yanı sıra (3-6, 8, 9, 12, 44, 45), altta yatan hastalığı olmayan kişilerde de (10) enfeksiyonlara neden olabilmekte ve sağlıklı kişilerde deri ve solunum yolu ve gastrointestinal sistem kolonizasyonu (1, 163) gözlenebilmektedir. Nozokomiyal salgınlara neden olabilmesi dikkati çekmiştir (2, 3, 23, 27). Ülkemizde de sporadik vakalar (14, 20-22, 44, 47, 51-55, 164) ve bir nozokomiyal salgın (24) bildirilmiştir.

Saprochaete fırsatçı bir patojen olarak, beklendiği gibi çoğunlukla immün sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Hematolojik malignitesi olan hastalarda daha sık bildirilmiştir (2, 4, 11, 12, 36, 44, 45, 53). Bunun dışında aplastik anemi gibi diğer hematolojik hastalıklarda (5, 54), böbrek nakli yapılan hastalar gibi immün supresif ilaç kullananlarda (9, 46, 165), altta yatan hastalığı olanlarda (32, 49) ve kritik durumdaki yoğun bakım hastalarında (24) da görülebilmektedir. *S. capitata* daha sık görülen bir enfeksiyon etkeni olmakla birlikte, *S. clavata* nozokomiyal salgınlarda ön plana çıkan tür olmuştur (1-3, 23, 27). Literatürde *S. capitata*'nın etken olduğu salgınlar da vardır (25, 26) ve ülkemizden yoğun bakım ünitesinde gözlenen üç olguluk bir bildirim de bulunmaktadır (24).

Saprochaete türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda mortalite oldukça yüksektir (7, 32). Buna rağmen, *Saprochaete* türlerinde virülans faktörlerini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yüzeyel antijenik yapılar, adhezinler, toksinler, koagülazlar, hemolizinler, asit proteinazlar, fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler, biyofilm oluşturma yeteneği gibi bilinen virülans faktörleri daha çok *C. albicans* ve *A. fumigatus* gibi sık görülen fungal patojenlerde gösterilmiştir (10, 34, 35, 81). Ancak, *Saprochaete* türlerinde varlıkları ve enfeksiyon patogenezi katkılarını henüz ortaya konmamıştır.

Saprochaete türlerinde antifungal duyarlılık testleri ve bunların sonucunun nasıl yorumlanacağı da henüz kesinlik kazanmamıştır. Antifungal duyarlılık durumunu araştırmak için kullanılan referans test yöntemleri, daha çok *Candida* ve

Cryptococcus türleri için test edilmiştir ve test parametreleri ile ilgili öneriler öncelikle bu iki cinsi kapsamaktadır. Ayrıca, elde edilen MİK değerlerinin yorumlanabilmesi için elimizde klinik sınır değerler bulunmamaktadır. *Saprochaete* izolatlarında antifungal duyarlılık durumunun değerlendirilebilmesi için referans yöntemlerde test parametrelerine ilişkin önerilerin belirtilmesi, elde edilen MİK değerlerinden epidemiyolojik eşik değerlerin saptanması ve klinik verilerle uyumu araştırılarak sınır değerlerin tespit edilmesi gerekmektedir. Sonraki aşamalarda, referans yöntemlerle rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılabilen ticari testler ile elde edilen sonuçların uyum düzeyinin anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (2, 36-38, 146, 147, 152).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *Saprochaete* izolatları tür düzeyinde tanımlanmış, virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık durumları incelenmiştir.

Saprochaete izolatları cins düzeyinde diğer R koloni oluşturan ve artrokonidya yapan mantarlardan konvansiyonel yöntemlerle ayrılabilir (56). Ancak, makroskopik ve mikroskopik morfoloji tür düzeyinde tanımlama için yeterli olmamaktadır. Sellobiyoz, salisin ve arbutin gibi bazı kimyasallarda üreme özelliklerinin. *S. capitata* ve *S. clavata* türlerinin ayırımında yararlı olabileceği düşünülse de, yakın başka türlerin varlığı sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır (1, 28, 30, 40, 166).

Literatürde konvansiyonel yöntemler ile tür düzeyinde tanımlama yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmaların hepsinde makroskopik ve mikroskopik özellikler tanımlamada kullanılmış; ancak, bazılarında biyokimyasal özelliklerine göre yapılan tür ayırımı dizi analizi ile doğrulanmamıştır. Bu çalışmalara örnek olarak ID32C (53, 62), VITEK2 (BioMérieux, Fransa) (9, 13, 25), API20C (BioMérieux, Fransa) (22, 25) ile tür düzeyinde *S. capitata* olarak tanımlama bildiren bazı çalışmalar gösterilebilir. Bunlardan bazılarında biyokimyasal yöntem sonucunun yeterli düzeyde ayırım yapamadığı veya hatalı cins/tür ismi verdiği belirtilmiştir (7, 130). Biyokimyasal yöntemlerle tür tanısı yapılan ve dizileme ile tanımlamanın doğrulandığı çalışmalar da bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda API20C (51), ID32C (21) veya VITEK2 (7) ile etken *S. capitata* olarak tanımlanmış ve ITS dizileme ile doğrulanmıştır. Biyokimyasal yöntemlere ek olarak veya tek

başına MALDI-TOF MS yöntemi ile tür düzeyinde *S. capitata* veya *S. clavata* olarak tanımlama yapan çalışmaların bazılarında da dizileme ile doğrulama yapılmıştır (21, 27, 44, 52). Bu çalışmalarda tür tanımlama sonuçları doğrulama ile uyumlu görünmektedir.

Bu çalışmaya konvansiyonel yöntemler ile cins düzeyinde *Saprochaete* olarak tanımlanmış izolatlar dahil edilmiştir. İzolatların SDA'daki koloni morfolojileri ve Mısır Unlu Tween 80 agardaki mikroskobik morfolojileri kontrol edilmiştir. Sonrasında, rutin laboratuvarında kullanılan ID32C sistemi ile elde edilen tür tanımlama kayıtları ile MALDITOF-MS ve dizi analizi sonuçları karşılaştırılmıştır.

MALDI-TOF MS yöntemi, kısa sürede sonuç vermesi ve manuel işlemlerin sınırlı olması sayesinde maya tanımlamasında hızla kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan veritabanının genişlemesi ile birlikte daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir ve *Saprochaete* tanımlamasında da önerilmektedir (1). MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig Almanya) ile artrokonidya oluşturan maya-benzeri mantarların cins ve tür ayrımı yapmaya çalışan ilk araştırmalardan birinde 85 standart suş ve 71 klinik izolat çalışılmış, tanımlamalar dizileme ile doğrulanmıştır (130). Çalışmaya dahil edilen 3 farklı türe ait 28 standart *Saprochaete* suşu ve klinik izolatlar doğru tanımlanmış, sadece birinde düşük skor (<1.7 *S. clavata*) elde edilmiştir. Sonraki çalışmalarda da bu cihaz ile *S. capitata* ve *S. clavata* izolatlarının yüksek skorla (≥ 2) tanımlandığı bildirilmiştir (7, 21, 32). Bizim çalışmamızda izolatlardan sadece bir *S. clavata* izolatı için düşük skor (<1.7) gözlenmiştir.

Mantar taksonomisinde ele alınan çok sayıda morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellik bulunmaktadır. Tür tanımlamasında ise bazı genlerin dizilerinin incelenmesi öne çıkmıştır. Daha çok ITS bölgesi dizisi incelenmekte, bazı mantarlar için tür ayrımında diğer genlerin de dizilenmesi gerekebilmektedir (28, 30). *Saprochaete* türlerinde tür düzeyinde tanımlama yapan çalışmalar genellikle ITS dizilemesi ile *S. capitata* ve *S. clavata* türlerini ve yakın bir cins olan *G. candidum*'u rapor etmişlerdir (21, 32, 51, 79). Çalışmalardan bazılarında ITS dizisine ek olarak başka gen bölgeleri de incelenmiştir. Esposto ve ark. (40) 46 izolatın ITS bölgesini analiz ederek 28'ini *S. capitata*, 18'ini *S. clavata* olarak

tanımlamışlardır. Ancak, dört izolatta ayrıca *Rpb2* gen dizisi ile *S. capitata* tanımlamasını doğrulamışlardır.

Bu çalışmaya dahil edilen 57 izolatin morfolojik özellikler ve ID32 C ile, MALDI-TOF MS ile ve ITS dizileme ile elde edilen tür tanımları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Ancak, ITS dizileme ile daha düşük Q ve I skoru ile de olsa ikinci bir tür ismi (*M. spicifer*) sonucu gözlenen üç *S. clavata* izolatında ayrıca *Rpb2* geni de dizilenmiş ve sonuç doğrulanmıştır.

Saprochaete izolatlarında filogenetik analiz tür ayrımında da kullanılabilir. Bu yöntemle tür düzeyinde farklılıkları inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (28, 30). Bu çalışmada da çizilen filogenetik ağaçta farklı türe ait (*S. clavata*) dört izolatin ayrı olarak kümelendiği gözlenmiştir. Ancak, birden fazla gen bölgesi kullanımının daha ayrıntılı değerlendirmeye olanak tanıyacağı düşünülmüştür.

Literatürde klinik *Saprochaete* izolatlarında virülans faktörlerini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, çalışmamızda öncelikle mantarlarda bilinen virülans faktörleri fenotipik olarak araştırılmıştır. Sonuçlarımız başta *C. albicans* olmak üzere *Candida* türleri ile, veri bulunması durumunda diğer nadir görülen diğer maya-benzeri mantarlar olan *Trichosporon* ve *Geotrichum* ile karşılaştırılmıştır.

Koagülaz aktivitesi, mantarlarda araştırılan önemli virülans faktörlerinden biridir. Klinik 125 izolatin koagülaz özelliğini araştıran bir çalışmada tavşan plazmasında 52 (%41,6), koyun plazmasında ise 26 (%20,8) pozitiflik saptanmış, insan plazmasında koagülasyon gözlenmemiştir (95). Tavşan plazmasında koagülaz pozitifliği *Candida* türlerinde en sık *C. albicans*'ta (29/64, %45,3) *C. glabrata*'da (6/14, %42,8) ve *C. tropicalis*'te (6/15, %40,0) bildirilmiştir. Test edilen dört *G. candidum* izolatından 2'sinde de pozitiflik gözlenmesi dikkati çekmiştir. 48 *Candida* izolatinında tavşan plazması ile koagülaz aktivitesi araştıran bir çalışmada da 21 (%43,7) izolat pozitif bulunmuştur (11 *C. albicans*, 3 *C. glabrata*, 2 *C. krusei*, 3 *C. kefyr*, 2 *C. parapsilosis*) (93). İnsan plazmasında 40 *C. parapsilosis* izolatını test eden başka bir çalışma ise hepsini negatif bulmuştur (140). Farklı *Candida* türlerini tavşan plazması ile test eden bir çalışma, iki *C. albicans* izolatinın 4 saatte pozitiflik verdiğini ama diğer izolatlarda 24 saatlik

inkübasyon sonrası pozitiflik tespit edebildiklerini belirtmişlerdir (98). Bu çalışma, *C. albicans*'ta %88,5, *C. tropicalis*'te %82, *C. parapsilosis*'te %34,5, *C. guilliermondii*'de %33,3 ve *C. glabrata*'da %20 pozitiflik bildirmiştir. *C. krusei* izolatlarında ise pozitiflik görülmemiştir. Buna karşın, 100 vulvovajinal *C. albicans* izolatını tavşan plazmasında test eden başka bir çalışmada koagülaz pozitifliği %5 bulunmuştur (97).

Trichosporon'da da kullanılan plazma test sonucunu etkilemiştir. Kırk *Trichosporon* izolatının 11'inde (%27,5) tavşan plazmasında koagülaz pozitif iken, insan plazmasında sadece ikisi pozitif olmuştur (99).

Çalışmamızda ise koagülazın test edilmesi için tavşan ve insan plazması kullanılmıştır. İnkübasyon süresi 24 saate kadar uzatıldığı halde tüm izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir.

Hemolitik aktiviteyi kan içeren besiyerlerinde, genellikle %7 koyun kanı ve %3 glukoz içeren SDA'da test edilmekte ve mantarlarda yüksek oranda pozitiflik rapor eden çalışmalar bulunmaktadır. Yiğit ve ark. (156) 104 mayayı test etmiş, dört *C. parapsilosis* dışında tüm izolatlarda 24 saat sonunda alfa-hemoliz; 48 saat sonunda ise üç *C. guilliermondii* ve üç *G. candidum*'da alfa, diğerlerinde beta-hemoliz gözlemişlerdir (156). Yenişehirli ve ark. (167) test ettikleri 147 *C. albicans* izolatının tamamının beta-hemolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine Yiğit ve ark. (93) *C. parapsilosis* (n=5) dışında test ettikleri tüm *Candida* izolatlarında (17 *C. albicans*, 10 *C. glabrata*, 9 *C. krusei*, 7 *C. kefyr*) 48 saatte beta-hemoliz saptamışlardır. *C. kefyr*'de hemoliz indeksi daha düşük bulunmuştur. Ekşi ve ark. (104) ise test ettikleri 88 *Candida* izolatının %42,1'inde beta-hemoliz, %26,1'inde alfa-hemoliz gözlemiş; %31,8'inde ise hemoliz tespit etmemişlerdir.

Sun ve ark. (35) 23 *Trichosporon asahii* izolatının tamamında, %5 CO₂ içeren atmosferde 96 saat inkübasyon gerekmesine karşın hemolitik aktivite göstermişlerdir.

Çalışmamızda ise koyun kanlı ve at kanlı besiyerlerinde *Saprochaete* izolatlarında 48 saatlik inkübasyon sonrasında hemolitik aktivite tespit edilmemiştir. Plakların farklı atmosfer koşullarında ve/veya daha uzun süre inkübe edilmemiş olması çalışmamızın eksikliği olarak düşünülmüştür.

Proteinazlar *C. albicans*'ta önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Çoğu çalışma, klinik *C. albicans* izolatlarında yüksek proteinaz pozitifliği bildirmiştir. Fotedar ve ark.(168) %100 (52/52), Arslan ve ark. (169) %64, Yenişehirli ve ark. (167) %81, Borst ve ark. (170) ise Türkiye'nin de içinde bulunduğu çok merkezli bir çalışmada %95 proteinaz aktivitesi rapor etmişlerdir. *Trichosporon* izolatlarında ise, Demir ve Kuştimur (99) proteinaz tespit etmemişlerdir.

S. capitata'da proteinaz varlığı gösteren bir çalışma da bulunmaktadır. Pontieri ve ark. (166) test ettikleri 9 standart suş ve 18 klinik *S. capitata* izolatından sadece 3'ünde sığır serum albüminli agar da salgısal aspartil proteinaz varlığı saptamışlardır. Çalışmamızda ise test edilen 57 klinik *Saprochaete* izolatında proteinaz aktivitesi gözlenmemiştir.

Fosfolipaz da *C. albicans*'ta sık görülen bir virülans faktörüdür. Mahmoudabadi ve ark. (171) vajinal *C. albicans* izolatlarında %84,7, idrar izolatlarında ise %75 fosfolipaz varlığı belirlemişlerdir. Arıkan ve ark. (110) %78,7, Kuzucu ve ark. (172) 123 *C. albicans*'ta %57'sini fosfolipaz pozitif bulmuşlardır. Birinci ve ark. (173) %61,3, Arslan ve ark. (169) %75, Fotedar ve ark. (168) %100, Yenişehirli ve ark. (167) %76 pozitiflik bildirmişlerdir. Çok merkezli bir çalışmada ise *C. albicans*'ların %95'i fosfolipaz aktivitesi göstermiştir (170). *Trichosporon*'da ise durum farklıdır. Demir ve Kuştimur (99) 40 *Trichosporon* izolatında fosfolipaz enzim üretimine rastlamamışlardır. *G. candidum* ve bazı *Candida* türlerinde (*Candida lipolytica*, *Candida cylindracea*) lipaz varlığı bildirilmişse de fosfolipaz aktivitesi bilinmemektedir (174). Çalışmamızda *Saprochaete* izolatlarında fosfolipaz aktivitesi tespit edilememiştir.

Esteraz varlığı, *C. albicans*'ta yüksek oranlarda karşımıza çıkmakta, diğer *Candida* türlerinde ise değişkenlik gözlenebilmektedir. Fatahinia ve ark. (175) 52 *C. albicans*'ın %89,1'inde, 12 *C. glabrata*'nın ise %14'ünde esteraz aktivitesi görülmüştür. Ranjith ve ark. (96) 50 klinik izolatta *C. albicans* ve *C. albicans* dışı izolatların tümünde esteraz aktivitesi göstermişlerdir. Slifkin ve ark. (159) *C. albicans*'ta (n=15) ve *C. tropicalis*'te (n=10) 2-3 günde, *C.guilliermondii* (n=5) ve *Candida rugosa*'da (n=3) 8-10 günde esteraz pozitifliği belirlemişlerdir. Diğer *C. albicans* dışı türlerde ise (16 *C. dubliniensis* 15 *C. glabrata*, 15 *C. parapsilosis*, 15

Candida famata, 5 *C. kefir*, 10 *C. krusei* ve 2 *C. lusitaniae*) esteraz aktivitesi görülmemiştir. Dolapçı ve Tekeli (113) 252 *Candida* izolatını test etmiş; 182 *C. albicans* ve 21 *C. tropicalis* izolatı esteraz pozitif, 42 diğer *albicans* dışı *Candida*'yı negatif bulmuşlardır.

Demir ve Kuştimur (99) *Trichosporon* izolatlarında birinci günden başlayarak 4 gün içinde tüm izolatlarda esteraz saptamışlardır.

Baloch ve ark. (176) palmiye yağı ile kontamine atıklarından izole edilen, aralarında *S. capitata* (n=3) ile *S. clavata*'ya (n=2) yakın olduğu belirlenen ve *M. spicifer* (n=1) olarak tanımlanan izolatların bulunduğu bir grup mayada lipaz varlığını göstermişlerdir. Bu izolatlardan bazılarının esterifikasyon yapabildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada tüm izolatlarda esteraz pozitifliği %56,1, *S. capitata* izolatlarında ise %50,9 olarak bulunmuştur. Bu durum, esteraz pozitifliğinin *Saprochaete*'de yaygın olabileceğini düşündürmüştür. Dikkati çeken bir durum da bir *S. capitata* izolatında üç tekrardan sadece birinde zayıf pozitif bulunmasıdır.

Birden fazla izolatın aynı plakta test edilmesi durumunda, oluşan kristallerin yayılmasının neden olabileceği hataların önüne geçilmesi açısından aralarındaki mesafenin daha fazla olmasının uygun olacağı değerlendirilmiş ve bu izolat hesaplamalarda negatif kabul edilmiştir.

Biyofilm oluşturma yeteneği ve "slime" faktörünün mantarlarda görülme oranları, test yöntemine ve mantarın test edildiği ortam koşullarına göre değişebilmektedir. Bu nedenle, farklı çalışmalarda değişken oranlar bildirilebilmektedir. Örneğin, *C. albicans*'ta "slime" varlığını tüp adherens yöntemiyle Ekşi ve ark. (104) %64,5 Dolapçı ve Tekeli (113) ise %9,7, Kuzucu ve ark. (172) %63 bulurken; Kongo kırmızısı agar ile Arslan ve Fındık (169) %48 olarak saptamışlardır. Aslan ve Gülmez (124) farklı *Candida* türlerinde Kongo kırmızısı agarda %24, XTT indirgenmesi ile ise %100 biyofilm pozitifliği bildirmişlerdir. Turan ve ark. (177) da XTT redüksiyon yöntemi tüm izolatlarda biyofilm gözlemiş, 47 izolatta zayıf, 61'inde orta, 37'sinde güçlü biyofilm yeteneği göstermişlerdir. Gültekin ve ark. (178) kristal viyole yöntemiyle *C. albicans*'ların (n=17) hiçbirinde biyofilm gösterememiş; ancak, *C. parapsilosis*'lerin (n=18) tamamında saptamamışlardır. Tüzüner ve İnci ise (179) *C. albicans* ve *albicans* dışı

Candida'larda sırasıyla XTT redüksiyonu ile %15,6 ve %32,9, kristal viyole ile %12,5 ve %29,5 biyofilm pozitifliği bildirmişlerdir.

Dağ ve ark. (34) tüp aderens yöntemiyle 48 *T. asahii* izolatının 28'inde (%58,3) "slime" pozitifliği belirlemişlerdir.

Bu çalışmada *Saprochaete* izolatlarında biyofilm oluşumu hem metabolik aktivitenin ölçüldüğü XTT redüksiyonu yöntemiyle, hem de biyofilmde oluşan biyokütlenin gösterildiği kristal viyole yöntemiyle test edilmiştir. Tüm izolatların biyofilm oluşturabildiği gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda önerilen sınır değer hesaplamaları kullanıldığında (162) tüm izolatlar her iki yöntemle de güçlü pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, biyofilm pozitif kontrol olarak kullanılan *C. albicans* MYA izolatının biyofilm özelliği %100 kabul edilerek yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma, izolatların %40,4'ünün pozitif kontrolden daha fazla biyokütle oluşturduğunu göstermiştir. Metabolik aktivite ise pozitif kontrolün %25-50'si aralığında yoğunlaşmıştır. Ancak, XTT ölçümü ile yapılan karşılaştırmanın *Saprochaete* izolatları ile *C. albicans* MYA274 suşunun metabolizması arasındaki farktan da etkileneceği akılda tutulmalıdır.

Saprochaete türleri için antifungal duyarlılığın belirlenmesinde mayalar için önerilen yöntemler kullanılmaktadır. Diğer mantarlarda da tercih edilen şekilde, referans yöntemlerle elde edilen MİK değerleri daha güvenilir bulunmaktadır. Ancak, bu yöntemler öncelikle *Candida* ve *Cryptococcus* türlerini test etmek hedeflenerek geliştirilmiştir. Bu nedenle, inokulum hazırlığında spektrofotometrik ölçüm yapılması, okuma yapılmadan önce gerekli inkübasyonun süresi gibi sonuçları etkileyebilecek ayrıntıların kesinleştirilmesi için veri birikimine gerek duyulmaktadır. Buna ek olarak, *Saprochaete* türlerinde direnç yorumu yapmak için klinik sınır değerler, hatta epidemiyolojik eşik değerleri henüz belirlenmemiştir. Antifungal tedavi önerileri klinik durumun değerlendirmesine, literatürde bildirilen olguların prognoz sonuçlarına ve "breakthrough" enfeksiyon raporlarını temel almaktadır. Ayrıca *Saprochaete* türlerinde farklı yöntemlerle elde edilmiş antifungal MİK değerlerini bildiren çalışmalar kullanılabilir (1).

Çalışmamızda iki farklı referans yöntem ile 57 *Saprochaete* izolatında amfoterisin B, flukanazol, vorikonazol ve mikafungin MİK değerleri belirlenmiştir.

Antifungal duyarlılık testlerinin inokulum hazırlama aşamasında çeşitli zorluklar yaşanmıştır. EUCAST ve CLSI mayalar için 0,5 MacFarland yoğunluğunda inokulum hazırlanmasını ve bunun spektrofotometrik olarak ölçülmesini önermektedirler. Bu aralık *Candida* için %78-82 absorbans değerine karşılık gelmektedir. Ancak, *Saprochaete* izolatlarıyla hazırlanan ve spektrofotometrede bu aralığa karşılık gelen süspansiyon içerisindeki hücre sayısı Thoma lamında sayıldığında, hücre sayısının gerekli $0,5-2,5 \times 10^5$ CFU/ml'den az olduğu ve antifungal duyarlılık testlerinde üremenin 24 ve 48 saatlik ölçümlerde yetersiz kaldığı görülmüştür. Literatürde bu soruna dikkat çeken bir çalışma bulunmaktadır. *Saprochaete* izolatlarında 0,5 MacFarland yoğunluktaki inokulum ile hücre sayımlarının ve RPMI 1640 besiyerinde üremenin yetersiz kaldığını gözleyen Noster ve ark. (77), yoğunluğu 0,75 MacFarland'a yükseltmiştir. Bu çalışmada, inokulum tüm izolatlar için Thoma lamında sayım yapılarak hazırlanmış ve uygun yoğunluktaki süspansiyonlarda spektrofotometrik ölçüm yapılarak *Saprochaete* izolatları için uygun inokulum absorbans değerinin %62-66 arasında olması gerektiği sonucuna varılmıştır (Tablo 4.1).

Antifungal duyarlılık testlerinin sağlıklı okunabilmesi için pozitif kontrol kuyucuğundaki üremenin yeterli olması esastır. Bu durum CLSI'da göz ile değerlendirilmekte, EUCAST yönteminde ise spektrofotometrik optik dansite ölçümünün $\geq 0,200$ olması istenmektedir (146, 147). *Saprochaete* izolatlarında antifungal duyarlılık testi uygulayan çalışmalarda genellikle plaklar 48 saat inkübasyon sonrasında değerlendirilmiştir. CLSI (19) ve EUCAST (77) yöntemiyle okumanın 48 saatte yapıldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da CLSI yönteminde 24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol kuyucuklarında üreme yetersiz bulunmuş ve 48 saatlik değerlendirmeler kullanılmıştır. EUCAST yönteminde ise izolatların çoğunun 24 saatlik inkübasyon sonrasında istenen $\geq 0,200$ değerine ulaşamadığı gözlenmiş, amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için 24 saatte yeterli üreme olan 3 izolat dışında 48 saatlik okumalar değerlendirilmiştir. Mikafungin için ise inkübasyonun 24 saatten uzun olması önerilmediğinden 24 saatlik okumalar alınmış, 48 ve 72 saatte MİK değerlerinde artma eğilimi olduğu vurgulanmıştır (146, 147). *Saprochaete* izolatlarında ekinokandine karşı azalmış duyarlılık beklendiği için, bu grup

antifungaller için düşük MİK değerlerine şüphe ile yaklaşılması uygun olacaktır (1).

Literatürde *Saprochaete* izolatlarını farklı yöntemler ile test ederek sonuçları raporlayan çalışmalar bulunmaktadır. Aşağıda, test edilen antifungaller ile ilişkili veriler tartışılmıştır.

Saprochaete izolatlarında amfoterisin B MİK değerleri farklı yöntemler ile daha çok 0,5-2 mg/l aralığında bildirilmiştir (1). Esposto ve ark. (40) CLSI, EUCAST ve Sensititre YeastOne (Thermo Fisher INC. ABD) yöntemleriyle elde edilen amfoterisin B MİK değerlerinin *S. capitata*'da sırasıyla 0,06-1mg/l, 0,06-1mg/l ve 0,5-2 mg/l; *S. clavata*'da ise 0,12-1 mg/l, 0,06-1 mg/l ve 0,5-1 mg/l arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Girmenia ve ark. (180) 23 *S. capitata* izolatında antifungal duyarlılığı farklı yöntemlerle test etmişlerdir. Amfoterisin B MİK değerlerini CLSI mikrodilüsyon ile 0,06-0,25 mg/l, Sensititre YeastOne panelleriyle 0,016-0,5 mg/l ve Mueller Hinton agarda (MHA) Etest gradiyent şeritleriyle (BioMérieux, Fransa) 0,016-1 mg/l bulmuşlardır. Vaux ve ark. (23) salgına neden olan 45 *S. clavata* izolatında EUCAST yöntemiyle 0,125-1 arasında değişen amfoterisin B MİK değerleri bildirmiştir. Antifungal duyarlılığın çalışıldığı olgu sunumlarında bildirilen amfoterisin B MİK değerleri en fazla 2 mg/l'ye ulaşmıştır (47, 58). Amfoterisin B duyarlılığını test etmek için Etest kullanan ve benzer sonuçlar bulan çalışmalar da bulunmaktadır (62, 78, 181). Ancak, bir çalışmada Etest ile 4 mg/l amfoterisin B MİK değeri elde edilmiştir (164). Noster ve ark. (77) ise amfoterisin B için referans yöntem ile Etest arasındaki zorunlu uyumu ("Essential agreement, EA) *S. clavata*'da %92 bulurken *S. capitata*'da %80'e kadar düşebildiğini bildirmiş ve gradiyent şerit yönteminin kullanılmasının uygun olmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda amfoterisin B MİK değerleri CLSI ile 1-2 mg/l, EUCAST ile 0,5-2 arasında değişmiştir. Bu durum literatürde bildirilen değerlerle uyumlu görünmektedir. EUCAST ve CLSI yöntemlerinin uyumu incelenmiş, 5 izolat (%8,8) dışında MİK değerleri ± 1 dilüsyon içinde bulunmuştur.

S. capitata'da flukonazol MİK değerleri, daha düşük olabilse de, genellikle 16-32 mg/l arasında bulunmaktadır (1). CLSI, EUCAST ve Sensititre YeastOne yöntemlerini kullanan bir çalışma flukonazol MİK değerlerini *S. capitata*'da

sırasıyla 1-32 mg/l, 1-32mg/l ve 2-16 mg/l; *S. clavata*'da 4-32 mg/l, 1-32 mg/l ve 8-64 mg/l arasında rapor etmiştir (40). Girmenia ve ark. (180) flukonazol MİK değerlerini CLSI mikrodilüsyon ile 1-32 mg/l, Sensititre YeastOne panelleriyle 1-64 mg/l ve MHA'da Etest ile 2-64 mg/l, MHA'da CLSI disk difüzyon yöntemiyle 2-64 mg/l'ye karşılık gelecek aralıkta bildirmişlerdir. Sancak ve ark. (19) 15 *S. capitata* izolatında CLSI ve Etest ile 2-64 mg/l flukonazol MİK değeri rapor etmişlerdir. Noster ve ark. (77) *S. capitata* ve *S. clavata*'da 0,25-16 mg/l arasında değişen EUCAST MİK değerleri bildirmişlerdir. Bu çalışmada gradiyent şerit yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin *S. capitata*'da %100, *S. clavata*'da ise %88 oranında referans yöntemine göre >1 dilüsyon fark gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda da flukonazol MİK değerleri genellikle yüksek seyretmektedir (36, 47, 62, 78). Salgın sırasında izole edilen 7 *S. capitata*'da CLSI ile flukonazol MİK 2 mg/ml tespit eden bir çalışmada farklı olarak mikroplaklar 30°C'de inkübe edilmiştir (58).

Çalışmamızda *Saprochaete* izolatlarında CLSI ile 0,25-16, EUCAST ile 0,5-64 arasında değişen flukonazol MİK değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.8). Yüksek MİK değerleri literatür ile uyumlu bulunmuş, EUCAST yönteminde MİK değerlerinin yükselme eğilimi dikkati çekmiştir. İzolatların 32'sinde (%56,1) EUCAST yöntemi ile ≥ 2 dilüsyon yüksek MİK değerleri elde edilmiştir.

S. capitata'da beklenen vorikonazol MİK değerleri 2 mg/l'nin altındadır ve genellikle 0,03-0,5 mg/l arasında değişmektedir (1). Vorikonazol duyarlılığını CLSI, EUCAST ve Sensititre YeastOne ile test eden bir çalışma *S. capitata*'da sırasıyla 0,03-1 mg/l, 0,03-0,5 mg/l ve 0,06-1 mg/l; *S. clavata*'da 0,03-1 mg/l, 0,03-0,5 mg/l ve 0,03-1 mg/l MİK değerleri saptamıştır (40). Birden fazla test yöntemi kullanan başka bir çalışma, CLSI mikrodilüsyon ile 0,03-0,5 mg/l, Sensititre YeastOne panelleriyle 0,016-0,25 mg/l ve MHA'da Etest ile 0,06-0,5 mg/l, MHA'da CLSI disk difüzyon yöntemiyle 0,06-4 mg/l'ye karşılık gelecek aralıkta vorikonazol MİK değerleri saptamışlardır (180). Sancak ve ark. (19) *S. capitata*'da vorikonazol MİK değerlerini CLSI ile 0,06-0,5 mg/l ve Etest ile 0,125-1 mg/l aralığında tespit etmişlerdir. *S. clavata*'da ise EUCAST ile 0,06-2 mg/l arasında değişen değerler bildirilmiştir (23). Genel olarak farklı yöntemlerle *Saprochaete*'de düşük MİK değerleri tespit edilmiştir (36, 47, 62, 78, 164). Ancak, *Saprochaete*

vorikonazol MİK değerlerinde EUCAST referans yöntemi ile Etest arasındaki uyumun düşük olduğunu vurgulayan bir çalışma da bulunmaktadır (77).

Çalışmamızda vorikonazol MİK değerleri CLSI ile 0,016-1 mg/l, EUCAST ile 0,03->8 mg/l arasında bulunmuştur (Tablo 4.9). Genel olarak literatürle uyumlu olarak düşük MİK değerleri gözlenmekle birlikte, EUCAST yöntemi ile 7 izolatta MİK değerinin ≥ 4 mg/l'ye ulaşması dikkat çekmiştir. EUCAST yöntemi ile 48 izolatta (%84,2) CLSI yöntemiyle elde edilenlere göre ≥ 2 dilüsyon daha yüksek MİK değeri bulunması da ilgi çekicidir.

Saprochaete türleri ekinokandinlere doğal dirençli kabul edilmektedir (1). Bu nedenle mikafungin ve diğer ekinokandinlere ait MİK değerlerinin yüksek olması beklenmektedir. Subramanya Supram ve ark. (58) CLSI ile 0,125 mg/l olarak bulunan bir kaspofungin MİK değeri hariç, 1-4 mg/l arasında değişen mikafungin, anidulafungin ve kaspofungin MİK değerleri bildirmişlerdir. Fernandez-Ruiz ve ark. (79) CLSI ve EUCAST ile sırasıyla, mikafungin için 2 mg/l ve 0,5-32 mg/l; anidulafungin için 4 mg/l ve 2-32 mg/l MİK değerleri rapor etmişlerdir. Buchta ve ark. (36) Etest ve Sensititre YeastOne ile yüksek mikafungin, anidulafungin ve kaspofungin MİK değerleri tespit etmişlerdir. Sensititre YeastOne (181) ve Etest (78, 164) ile yüksek ekinokandin MİK değerleri bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Çalışmamızda mikafungin MİK değerleri CLSI ile 0,5->16 mg/l, EUCAST ile 0,25->16 mg/l arasında değişmiştir (Tablo 4.10). Değerler, referans yöntem önerilerine uyararak 24 saatte okunmuş, inkübasyon uzatıldığında MİK değerlerinde yükselme eğilimi ortaya çıkmıştır. Bu durum, *Saprochaete* cinsindeki doğal ekinokandin direnci ile uyumludur. Ayrıca; izolatların 36'sında (%63,2) EUCAST yöntemiyle, ikisinde (%3,5) CLSI yöntemiyle diğer yöntemlere göre ≥ 2 dilüsyon yüksek MİK değeri gözlenmiştir. Test edilen *Saprochaete* izolatları için mikrodilüsyon testinde yeterli üremeye ulaşmada da güçlük yaşanmıştır. Bu durumun düşük ekinokandin MİK değerlerine neden olabilir. *Saprochaete* izolatlarının MİK değerinden bağımsız olarak ekinokandinlere doğal dirençli olduğu akılda tutulmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. *Saprochaete* cinsinde tür ayırımını yapmak için kullanılan ticari kitler, biyokimyasal yöntemler, MALDI-TOF MS ve ITS dizileme, birbirleri ile tutarlı ve doğru sonuçlar vermiştir.

2. ITS dizileme ile tür ayırımı bazen yeterli olamamaktadır. Böyle olduğunda başka bir gen bölgesinin dizilenmesi ile sonuçlar doğrulanmalıdır.

3. Çalışılan hiçbir izolatta fenotipik olarak koagülaz aktivitesi, hemolitik aktivite, proteinaz ve fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır.

4. *S. capitata* izolatlarında %50,9, tüm izolatlarda %56,1 oranında esteraz pozitifliği bulunmuştur.

5. İzolatların biyofilm oluşturma yeteneği değerlendirilmiş, XTT redüksiyonu metabolik aktivite ve kristal viyole yöntemiyle biyokütle oluşumu ölçülmüş, her ikisi de güçlü pozitiflik göstermiştir. İzolatların %40,4'ünün biyofilm pozitif olduğu, *C. albicans* MYA 274 suşundan daha fazla biyokütle oluşturabildiği gözlenmiştir.

6. Antifungal duyarlılık testlerinde her iki referans yöntemde de inokulum başlangıçta $0,5-2,5 \times 10^6$ CFU/ml olarak hazırlanmakta ve sonra uygun seyreltme yapılmaktadır. Bunun için mayalarda spektrofotometrik olarak 0,5 MacFarland (absorbans %78-82) yoğunluğunda inokulum hazırlanması uygun olabilmektedir. Ancak, *Saprochaete* izolatlarında inokulum yoğunluğu 0,5 MacFarland'a ayarlandığında inokulumdaki hücre sayısının yetersiz olduğu görülmüştür. Bu nedenle her izolat için Thoma lamında sayım yapılarak uygun yoğunlukta inokulum hazırlanmış ve spektrofotometrik ölçümlerde uygun absorbans aralığının %62-66 olduğu bulunmuştur.

7. Flukanazol vorikonazol ve mikafungin için EUCAST MİK değerlerinin CLSI'a göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Amfoterisin B MİK değerleri ise benzer bulunmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Chen, S.C., J. Perfect, A.L. Colombo, O.A. Cornely, A.H. Groll, D. Seidel, ve diğ. (2021). Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis*, **21**(12), p. e375-e386.
2. Lo Cascio, G., M. Vincenzi, F. Soldani, E. De Carolis, L. Maccacaro, A. Sorrentino, ve diğ. (2020). Outbreak of *Saprochaete clavata* sepsis in hematology patients: Combined use of MALDI-TOF and sequencing strategy to identify and correlate the episodes. *Front Microbiol*, **11**, p. 84.
3. Stanzani, M., M. Cricca, C. Sassi, E. Sutto, G. De Cicco, F. Bonifazi, ve diğ. (2019). *Saprochaete clavata* infections in patients undergoing treatment for haematological malignancies: A report of a monocentric outbreak and review of the literature. *Mycoses*, **62**(12), p. 1100-1107.
4. Girmenia, C., L. Pagano, B. Martino, D. D'Antonio, R. Fanci, G. Specchia, ve diğ. (2005). Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*, **43**(4), p. 1818-28.
5. Favre, S., A. Rougeron, L. Levoir, B. Perard, N. Milpied, I. Accoceberry, ve diğ. (2016). *Saprochaete clavata* invasive infection in a patient with severe aplastic anemia: Efficacy of voriconazole and liposomal amphotericin B with adjuvant granulocyte transfusions before neutrophil recovery following allogeneic bone marrow transplantation. *Med Mycol Case Rep*, **11**, p. 21-3.
6. Liu, X., W. Zhou, Y. Jiang ve L. Kuang. (2019). Invasive fungal infection caused by *Geotrichum clavatum* in a child with acute leukemia: First documented case from mainland China. *Jpn J Infect Dis*, **72**(2), p. 130-132.
7. Del Principe, M.I., L. Sarmati, M. Cefalo, C. Fontana, G. De Santis, F. Buccisano, ve diğ. (2016). A cluster of *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*) infection in haematological patients: a first Italian report and review of literature. *Mycoses*, **59**(9), p. 594-601.
8. Pavone, P., A. Oliva, G. Raponi, F. Pugliese, S. Martelli, P. Celli, ve diğ. (2019). Disseminated fungal infection due to *Saprochaete clavata* in a kidney transplant recipient. *J Mycol Med*, **29**(3), p. 278-281.
9. Mandarapu, S., V. Krishna, S.B. Raju, U. Pamidimukkala ve S. Nimmagadda. (2016). *Saprochaete capitata* fungal infection in renal transplant recipient. *Indian J Nephrol*, **26**(6), p. 464-466.
10. Tanabe, M.B. ve S.A. Patel. (2018). *Blastoschizomyces capitatus* pulmonary infections in immunocompetent patients: case report, case series and literature review. *Epidemiol Infect*, **146**(1), p. 58-64.
11. Parahym, A.M., P.J. Rolim Neto, C.M. da Silva, F. Domingos Ide, S.S. Goncalves, E.P. Leite, ve diğ. (2015). Invasive infection due to *Saprochaete capitata* in a young patient with hematological malignancies. *Braz J Microbiol*, **46**(2), p. 527-30.
12. Bansal, N., V. Devarajan, K.A. Ghafur, N. Sethuraman ve V.L. Sree. (2018). Breakthrough *Saprochaete capitata* infections among patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, **59**(7), p. 1762-1763.

13. Pamidimukkala, U., A. Kancharla, S. Sudhaharan, S. Gundeti, S. Mandarapu, V.K. Nagalla, ve diğ. (2017). Isolation of the rare opportunistic yeast *Saprochaete capitata* from clinical samples-experience from a tertiary care hospital in Southern India and a brief review of the literature. *J Clin Diagn Res*, **11**(9), p.DC36-DC42.
14. Erman, B., S. Firtina, B.A. Aksoy, S. Aydogdu, G.E. Genc, O. Dogan, ve diğ. (2020). Invasive *Saprochaete capitata* infection in a patient with autosomal recessive CARD9 deficiency and a review of the literature. *J Clin Immunol*, **40**(3), p. 466-474.
15. Ikuta, K., Y. Torimoto, M. Yamamoto, N. Okamura, T. Hosoki, K. Sato, ve diğ. (2010). Successful treatment of systemic *Geotrichum capitatum* infection by liposomal amphotericin-B, itraconazole, and voriconazole in a Japanese man. *Intern Med*, **49**(22), p. 2499-503.
16. Ben Neji, H., M. Bchir, M. Hamdoun, A. Kallel, K. Kallel, O. Bahri, ve diğ. (2019). *Geotrichum capitatum* fungemia in patients treated for acute leukemia. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, **49**(4), p. 284-286.
17. Gultekin, B., I. Yavasoglu, M. Eyigor, G. Kadikoylu, Z. Bolaman ve N. Aydin. (2012). [*Blastoschizomyces capitatus* fungemia: three case reports and review of the literature]. *Mikrobiyol Bul*, **46**(1), p. 134-43.
18. Ozdemir, Z.C., A. Bozkurt Turhan, Y. Duzenli Kar, C.E. Dinleyici ve O. Bor. (2017). Fatal course of *Saprochaete capitata* fungemia in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, **34**(2), p. 66-72.
19. Sancak, B., S. Alp, G. Hascelik ve S. Arikan. (2009). [Investigation of in vitro activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against clinical isolates of *Blastoschizomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) by two different methods]. *Mikrobiyol Bul*, **43**(2), p. 269-76.
20. Alp, S., D. Gulmez, C.M. Ayaz, S. Arikan-Akdagli ve M. Akova. (2020). Fungaemia due to rare yeasts in a tertiary care university centre within 18 years. *Mycoses*, **63**(5), p. 488-493.
21. Hazirolan, G., A. Aypak ve N. Aksu. (2017). An unusual case of urinary tract infection caused by *Saprochaete capitata* under anidulafungin treatment. *J Mycol Med*, **27**(3), p. 387-390.
22. Koc, A.N., A. Copur Cicek, L. Kaynar, H. Sav, F.F. Kasap Tekinsen ve M.A. Atalay. (2013). [Three cases of fungemia caused by *Blastoschizomyces capitatus*]. *Mikrobiyol Bul*, **47**(4), p. 734-41.
23. Vaux, S., A. Criscuolo, M. Desnos-Ollivier, L. Diancourt, C. Tarnaud, M. Vandenbergert, ve diğ. (2014). Multicenter outbreak of infections by *Saprochaete clavata*, an unrecognized opportunistic fungal pathogen. *mBio*, **5**(6).
24. Ersoz, G., F. Otag, Z. Erturan, G. Aslan, A. Kaya, G. Emekdas, ve diğ. (2004). An outbreak of *Dipodascus capitatus* infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn J Infect Dis*, **57**(6), p. 248-52.
25. Martino, P., M. Venditti, A. Micozzi, G. Morace, L. Polonelli, M.P. Mantovani, ve diğ. (1990). *Blastoschizomyces capitatus*: an emerging cause of invasive fungal disease in leukemia patients. *Rev Infect Dis*, **12**(4), p. 570-82.
26. Gurgui, M., F. Sanchez, F. March, J. Lopez-Contreras, R. Martino, A. Cotura, ve diğ. (2011). Nosocomial outbreak of *Blastoschizomyces capitatus* associated with contaminated milk in a haematological unit. *J Hosp Infect*, **78**(4), p. 274-8.

27. Menu, E., A. Criscuolo, M. Desnos-Ollivier, C. Cassagne, E. D'Incan, S. Furst, ve diğ. (2020). *Saprochaete clavata* outbreak infecting cancer center through dishwasher. *Emerg Infect Dis*, **26**(9), p. 2031-2038.
28. Kaplan, E., A.M.S. Al-Hatmi, M. Ilkit, A.H.G. Gerrits van den Ende, F. Hagen, J.F. Meis, ve diğ. (2018). Molecular diagnostics of arthroconidial yeasts, frequent pulmonary opportunists. *J Clin Microbiol*, **56**(1).
29. Garcia-Ruiz, J.C., L. Lopez-Soria, I. Olazabal, E. Amutio, I. Arrieta-Aguirre, V. Velasco-Benito, ve diğ. (2013). Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy. *Revista Iberoamericana De Micologia*, **30**(4), p. 248-55.
30. de Hoog, G.S. ve M.T. Smith. (2004). Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology*, (50), p. 489-516.
31. Desnos-Ollivier, M., C. Blanc, D. Garcia-Hermoso, D. Hoinard, A. Alanio ve F. Dromer. (2014). Misidentification of *Saprochaete clavata* as *Magnusiomyces capitatus* in clinical isolates: utility of internal transcribed spacer sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and importance of reliable databases. *J Clin Microbiol*, **52**(6), p. 2196-8.
32. Duran Graeff, L., D. Seidel, M.J. Vehreschild, A. Hamprecht, A. Kindo, Z. Racil, ve diğ. (2017). Invasive infections due to *Saprochaete* and *Geotrichum* species: Report of 23 cases from the FungiScope Registry. *Mycoses*, **60**(4), p. 273-279.
33. El Zein, S., J.R. Hindy ve S.S. Kanj. (2020). Invasive *Saprochaete* Infections: An emerging threat to immunocompromised patients. *Pathogens*, **9**(11).
34. Dag, A. ve N. Cerikcioglu. (2006). [Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients]. *Mikrobiyol Bul*, **40**(3), p. 225-35.
35. Sun, W., J. Su, S. Xu ve D. Yan. (2012). *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol*, **61**(Pt 12), p. 1750-1757.
36. Buchta, V., R. Bolehovska, E. Hovorkova, O.A. Cornely, D. Seidel ve P. Zak. (2019). *Saprochaete clavata* invasive infections - a new threat to hematological-oncological patients. *Front Microbiol*, **10**, p. 2196.
37. CLSI, (2022) CLSI Document M24M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. Vol. . Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
38. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents Version 10.0. [cited 2020; Available from: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>].
39. Daniel, H.M., M.A. Lachance ve C.P. Kurtzman. (2014). On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **106**(1), p. 67-84.

40. Esposito, M.C., A. Prigitano, G. Lo Cascio, C. Ossi, A. Grancini, C. Cavanna, ve diğ. (2019). Yeast-like filamentous fungi: Molecular identification and in vitro susceptibility study. *Med Mycol*, **57**(7), p. 909-913.
41. Bouza, E. ve P. Munoz. (2004). Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Infect*, **10 Suppl 1**, p. 76-85.
42. Gumral, R., B. Ozhak-Baysan, A. Tumgor, M.A. Sarach, S.T. Yildiran, M. Ilkit, ve diğ. (2016). Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. *Fungal Diversity*, **76**(1), p. 1-9.
43. Zupancic, J., M. Novak Babic, P. Zalar ve N. Gunde-Cimerman. (2016). The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. *PLoS One*, **11**(2), p. e0148166.
44. Aydin Kaynar, L., Z.N. Ozkurt, B. Ulkuden, O.G. Tunccan, G. Aygencel, N. Akyurek, ve diğ. (2016). A rare and mortal infection agent in patients with hematological malignancies: *Saprochaete capitata*. *Mikrobiyoloji Bulteni*, **50**(4), p. 613-620.
45. Duminuco, A., C. Vetro, C. Maugeri, E. Mauro, G.A.M. Palumbo, M.S. Parisi, ve diğ. (2022). *Saprochaete capitata*: Emerging infections from uncommon microorganisms in hematological diseases. *Hematol Rep*, **14**(2), p. 67-72.
46. Oya, S. ve T. Muta. (2018). Breakthrough infection of *Geotrichum capitatum* during empirical caspofungin therapy after umbilical cord blood transplantation. *Int J Hematol*, **108**(5), p. 558-563.
47. Baris, A., H. Gencer, N. Dalgic, G. Sik, F. Ozakkas ve E. Aktas. (2017). *Magnusiomyces capitatus* peritonitis in a child with acute lymphocytic leukemia as a breakthrough infection during caspofungin therapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **36**(12), p. E351-E353.
48. Yilmaz Karapinar, D., N. Karadas, Z. Onder Sivis, P. Yazici, M. Duyu, D. Metin, ve diğ. (2015). Rare severe mycotic infections in children receiving empirical caspofungin treatment for febrile neutropenia. *Braz J Infect Dis*, **19**(5), p. 549-52.
49. Mazzocato, S., E. Marchionni, A.W. Fothergill, D.A. Sutton, S. Staffolani, R. Gesuita, ve diğ. (2015). Epidemiology and outcome of systemic infections due to *Saprochaete capitata*: case report and review of the literature. *Infection*, **43**(2), p. 211-5.
50. Zhu, M., L. Yan, S. de Hoog, W. Liao, H. Zhang, R. Zhao, ve diğ. (2022). Invasive infections due to *Magnusiomyces capitatus*: case report and review of its prevalence in China. *Mycology*, **13**(1), p. 76-80.
51. Koc, A.N., M.A. Atalay, D. Timur, G. Demir ve L. Kaynar. (2016). Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Saprochaete capitata* (*Blastoschizomyces capitatus*) isolates causing nosocomial infection in Kayseri/Turkey. *Infect Dis (Lond)*, **48**(8), p. 596-603.
52. Ozkaya, E., I. Tosun, I.E. Tufekc, C.K. Buruk, N. Kaklikkaya ve F. Aydin. (2020). Identification and antifungal susceptibility of *Saprochaete clavata* from invasive infections in Turkey. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **67**(4), p. 252-257.
53. Ozkaya-Parlakay, A., A.B. Cengiz, E. Karadag-Oncel, B. Kuskonmaz, Z. Saribas, A. Kara, ve diğ. (2012). *Geotrichum capitatum* septicemia in a hematological malignancy patient with positive galactomannan antigen: case report and review of the literature. *Turk J Pediatr*, **54**(6), p. 674-8.

54. Parkan, O.M., M.A. Atalay, A.N. Koc, C. Pala, G. Aydemir ve L. Kaynar. (2017). [Fungemia and septic arthritis caused by *Saprochaete capitata* in a patient with fanconi aplastic anemia: a case report]. *Mikrobiyol Bul*, **51**(1), p. 87-93.
55. Ulu-Kilic, A., M.A. Atalay, G. Metan, F. Cevahir, N. Koc, B. Eser, ve diğ. (2015). *Saprochaete capitata* as an emerging fungus among patients with haematological malignencies. *Mycoses*, **58**(8), p. 491-7.
56. Walsh, T.H., R.T. Hayden ve D.H. Larone, (2018) Larone's Medically Important Fungi A Guide to Identification. 6th bs. Washington DC: ASM Press.
57. Kaplan, E., D. Aktas, A. Dogen, S. Hilmioglu-Polat, R. Gumral, F. Hagen, ve diğ. (2021). Development and analysis of qPCR for the identification of arthroconidial yeasts of the genus *Magnusiomyces*. *Mycopathologia*, **186**(1), p. 41-51.
58. Subramanya Supram, H., S. Gokhale, A. Chakrabarti, S.M. Rudramurthy, S. Gupta ve P. Honnavar. (2016). Emergence of *Magnusiomyces capitatus* infections in Western Nepal. *Med Mycol*, **54**(2), p. 103-10.
59. Karabicak, N., H. Uludag Altun, O. Karatuna, G. Hazirolan, N. Aksu, A. Adiloglu, ve diğ. (2015). [Evaluation of common commercial systems for the identification of yeast isolates in microbiology laboratories: a multicenter study]. *Mikrobiyol Bul*, **49**(2), p. 210-20.
60. Grant, M.L., S. Parajuli, R. Deleon-Gonsalves, R. Potula ve A.L. Truant. (2016). Comparative evaluation of the BD Phoenix Yeast ID Panel and Remel RapID Yeast Plus System for yeast identification. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, **2016**, p. 4094932.
61. Ramani, R., S. Gromadzki, D.H. Pincus, I.F. Salkin ve V. Chaturvedi. (1998). Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*, **36**(11), p. 3396-8.
62. Schuermans, C., M. van Bergen, L. Coorevits, J. Verhaegen, K. Lagrou, I. Surmont, ve diğ. (2011). Breakthrough *Saprochaete capitata* infections in patients receiving echinocandins: case report and review of the literature. *Med Mycol*, **49**(4), p. 414-8.
63. van Veen, S.Q., E.C. Claas ve E.J. Kuijper. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, **48**(3), p. 900-7.
64. Westblade, L.F., R. Jennemann, J.A. Branda, M. Bythrow, M.J. Ferraro, O.B. Garner, ve diğ. (2013). Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol*, **51**(7), p. 2267-72.
65. Prigitano, A., C. Cavanna, M. Passera, M. Gelmi, E. Sala, C. Ossi, ve diğ. (2020). Evolution of fungemia in an Italian region. *J Mycol Med*, **30**(1), p. 100906.
66. Joshi, M. ve D.J. D. (2010). Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. *IJBR*, **1**(5), p. 81-97.
67. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts>. [cited 2022 18.08.2022].
68. Radstrom, P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lovenklev ve C. Lofstrom. (2004). Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol*, **26**(2), p. 133-46.

69. Akyol, V. ve N. Cerikcioglu. (2010). [Morphotyping, genotyping and investigation of some virulence factors in different morphotypes of *Candida parapsilosis* clinical isolates]. *Mikrobiyol Bul*, **44**(4), p. 605-17.
70. Rahman, M.T., M.S. Uddin, R. Sultana, A. Moue ve M. Setu. (2013). Polymerase chain reaction (PCR): A short review. *AKMMC J*, **4**(1), p. 30-36.
71. Çebi Kılıçoğlu, M. ve İ. Özkoç. (2008). Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *OMU Zir Fak Derg*, **23**(1), p. 65-72.
72. Sarıçam, S. ve H.K. Müştak. (2015). Filogenetik ağaçlandırma metotları. *Etlik Ver Mikrobiyol Derg*, **26**(2), p. 58-64.
73. Taylor, J.W., D.J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D.M. Geiser, D.S. Hibbett, ve diğ. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol*, **31**(1), p. 21-32.
74. Salazar, O., M.C. Julian ve V. Rubio. (2000). Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R-solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, **104**, p. 281-285.
75. White, T.J., T. Bruns, S. Lee ve J. Taylor, (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, in *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, Editör, Editor^Editörler., Academic Press.
76. Turan, M.K., Ö.C. Günay, S.A. Kayış ve M. Çörtük. (2018). Mikrobiyotada 16S rRNA ve basit biyoinformatik analizler. *J Biotechnol and Strategic Health Res*, **2**(1), p. 23-34.
77. Noster, J., M.B. Koepfel, M. Desnos-Olivier, M. Aigner, O. Bader, K. Dichtl, ve diğ. (2022). Bloodstream infections caused by *Magnusiomyces capitatus* and *Magnusiomyces clavatus*: Epidemiological, clinical, and microbiological features of two emerging yeast species. *Antimicrob Agents Chemother*, **66**(2), p. e0183421.
78. Alobaid, K., A.A. Abdullah, S. Ahmad, L. Joseph ve Z. Khan. (2019). *Magnusiomyces capitatus* fungemia: The value of direct microscopy in early diagnosis. *Med Mycol Case Rep*, **25**, p. 32-34.
79. Fernandez-Ruiz, M., J. Guinea, M. Puig-Asensio, O. Zaragoza, B. Almirante, M. Cuenca-Estrella, ve diğ. (2017). Fungemia due to rare opportunistic yeasts: data from a population-based surveillance in Spain. *Med Mycol*, **55**(2), p. 125-136.
80. Purohit, P., I. Al-Obaid, E. Al-Oneizi, O. Al-Hindi, L. Joseph, S. Ahmad, ve diğ. (2014). Breakthrough disseminated *Saprochaete capitata* infection in a child with acute myeloid leukaemia receiving caspofungin therapy. *JMM Case Reports*, **1**(2), p. 1-4.
81. Çerikçioğlu, N. (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *ANKEM Derg*, **26**(Ek2), p. 261-269.
82. Yucesoy, M. ve S. Marol. (2003). [Determination of esterase activity of *Candida* varieties]. *Mikrobiyol Bul*, **37**(1), p. 59-63.
83. Monod, M. ve M. Borg-von Zepelin. (2002). Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*, **81**, p. 114-28.

84. Monod, M., S. Capoccia, B. Lechenne, C. Zaugg, M. Holdom ve O. Jousson. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol*, **292**(5-6), p. 405-19.
85. Rudek, W. (1978). Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **8**(6), p. 756-9.
86. Murray, P.R., K.S. Rosenthal ve M.A. Pfaller, (2013) *Medical Microbiology*. Philadelphia, PA: Elsevier.
87. Baillie, G.S. ve L.J. Douglas. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, **48**(7), p. 671-679.
88. Soll, D.R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **5**(2), p. 183-203.
89. Hull, C.M. ve A.D. Johnson. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, **285**(5431), p. 1271-1275.
90. Anderson, J.C. (1976). Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br Vet J*, **132**(3), p. 229-45.
91. Aydın, N. ve H. Ayhan. (1992). Stafilokok'ların koagülaz ve clumping factor aktivitelerinin belirlenmesinde plazma seçiminin önemi. *Etlik Ver Mikrobiyol Derg*, **7**(2), p. 87-92.
92. Peetermans, M., P. Verhamme ve T. Vanassche. (2015). Coagulase activity by *Staphylococcus aureus*: A potential target for therapy? *Semin Thromb Hemost*, **41**(4), p. 433-44.
93. Yigit, N., E. Aktas, S. Dagistan ve A. Ayyildiz. (2011). Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *Eurasian J Med*, **43**(1), p. 27-32.
94. Çelik, İ., M. Cihangiroğlu, E. Sevim, M. Çabalak ve A. Akbulut. (2005). Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen koagülaz pozitif ve negatif stafilokoklarda metisilin direnci ve slime pozitifliği. *Fırat Tıp Derg*, **10**(3), p. 123-126.
95. Yigit, N., A.E. Aktas ve A. Ayyildiz. (2008). Detection of coagulase activity in pathogenic *Candida* species. *J Int Med Res*, **36**(6), p. 1378-82.
96. Ranjith, K., B. Sontam, S. Sharma, J. Joseph, K.N. Chathoth, K.C. Sama, ve diğ. (2017). *Candida* species from eye Infections: Drug susceptibility, virulence factors, and molecular characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **58**(10), p. 4201-4209.
97. Jafari, M., S. Salari, K. Pakshir ve K. Zomorodian. (2017). Exoenzyme activity and possibility identification of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* species isolated from vaginal candidiasis. *Microb Pathog*, **110**, p. 73-77.
98. Rodrigues, A.G., C. Pina-Vaz, S. Costa-de-Oliveira ve C. Tavares. (2003). Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **41**(12), p. 5792-3.
99. Demir, F. ve S. Kustimur. (2014). Investigation of some virulence factors in *Trichosporon* spp. strains. *Mikrobiyoloji Bulteni*, **48**(4), p. 628-638.
100. Durmaz, G., A. Aydın ve Y. Akgün. (1997). *Staphylococcus aureus* identifikasyonunda tüp koagülaz, lam koagülaz ve lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması. *Flora*, **2**(3), p. 208-211.

101. Keyvan, E. (2019). Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direnç özelliklerinin tespiti. *Vet Hekim Der Derg*, **90**(1), p. 9-14.
102. Moors, M.A., T.L. Stull, K.J. Blank, H.R. Buckley ve D.M. Mosser. (1992). A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *J Exp Med*, **175**(6), p. 1643-51.
103. Rossoni, R.D., J.O. Barbosa, S.F. Vilela, A.O. Jorge ve J.C. Junqueira. (2013). Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Braz Oral Res*, **27**(6), p. 484-9.
104. Ekşi, F., E. Sözen, A. Bayram, T. Karslıgil ve İ. Balcı. (2008). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında slime üretimi ve hemolitik aktivitenin araştırılması. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*, **38**(1), p. 27-32.
105. Deepa, K., T. Jeevitha ve A. Michael. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *J Microbiol Antimicrob*, **7**(3), p. 28-32.
106. Schaller, M., C. Borelli, H.C. Korting ve B. Hube. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48**(6), p. 365-77.
107. Cerikcioglu, N. ve R. Alacam. (1993). [Detection of secretory acid proteinase enzyme from *Candida* strains on protein supplemented agar media]. *Mikrobiyol Bul*, **27**(4), p. 344-51.
108. Dağdeviren, M., (2002) Hastanede yatan fungemili olgulardan izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinin virülans faktörleri. Marmara Üniversitesi.
109. Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **13**(1), p. 122-43, table of contents.
110. Arıkan, S., B. Sancak, G. Hascelik ve A. Günalp. (1998). *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Flora*, **3**(4), p. 240-243.
111. Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R.G. Wilson ve J.F. Ryley. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol*, **131**(5), p. 1217-21.
112. Youngchim, S., N. Vanittanakom ve A.J. Hamilton. (1999). Analysis of the enzymatic activity of mycelial and yeast phases of *Penicillium marneffeii*. *Med Mycol*, **37**(6), p. 445-50.
113. Dolapci, I. ve A. Tekeli. (2002). [Production of slime factor by various *Candida* types]. *Mikrobiyol Bul*, **36**(3-4), p. 323-8.
114. Panagoda, G.J., A.N. Ellepola ve L.P. Samaranayake. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, **44**(1-2), p. 29-35.
115. Minagi, S., Y. Miyake, Y. Fujioka, H. Tsuru ve H. Suginaka. (1986). Cell-surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods. *J Gen Microbiol*, **132**(4), p. 1111-5.
116. Fujioka-Hirai, Y., Y. Akagawa, S. Minagi, H. Tsuru, Y. Miyake ve H. Suginaka. (1987). Adherence of *Streptococcus mutans* to implant materials. *J Biomed Mater Res*, **21**(7), p. 913-20.

117. Hazen, K.C., B.J. Plotkin ve D.M. Klimas. (1986). Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect Immun*, **54**(1), p. 269-71.
118. Calderone, R.A. ve P.C. Braun. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, **55**(1), p. 1-20.
119. Sweet, S.P., T.W. Macfarlane ve L.P. Samaranayake. (1987). Determination of the cell-surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *Fems Microbiology Letters*, **48**(1-2), p. 159-163.
120. Rosenberg, M., D. Gutnick ve E. Rosenberg. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons - a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Fems Microbiology Letters*, **9**(1), p. 29-33.
121. Cengiz, A.S., E. Us ve A.T. Cengiz. (2006). Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **13**(3), p. 193-197.
122. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, **8**(9), p. 881-90.
123. Gotz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, **43**(6), p. 1367-78.
124. Aslan, H. ve D. Gulmez. (2016). [Investigation of the correlation between biofilm forming ability of urinary *Candida* isolates with the use of urinary catheters and change of antifungal susceptibility in the presence of biofilm]. *Mikrobiyol Bul*, **50**(2), p. 256-65.
125. Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, **11**(1), p. 30-6.
126. Yucesoy, M. ve M. Karaman. (2004). [Biofilm production and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species]. *Mikrobiyol Bul*, **38**(1-2), p. 91-8.
127. Melo, A.S., F.C. Bizerra, E. Freymuller, B.A. Arthington-Skaggs ve A.L. Colombo. (2011). Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*, **49**(3), p. 253-62.
128. Di Bonaventura, G., A. Pompilio, C. Picciani, M. Iezzi, D. D'Antonio ve R. Piccolomini. (2006). Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(10), p. 3269-76.
129. D'Antonio, D., G. Parruti, E. Pontieri, G. Di Bonaventura, L. Manzoli, R. Sferra, ve diğ. (2004). Slime production by clinical isolates of *Blastoschizomyces capitatus* from patients with hematological malignancies and catheter-related fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **23**(10), p. 787-9.
130. Koleccka, A., K. Khayhan, M. Groenewald, B. Theelen, M. Arabatzis, A. Velegraki, ve diğ. (2013). Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(8), p. 2491-2500.
131. Fuqua, W.C., S.C. Winans ve E.P. Greenberg. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, **176**(2), p. 269-75.

132. Hornby, J.M., E.C. Jensen, A.D. Lisee, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, ve diğ. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, **67**(7), p. 2982-92.
133. Spoering, A.L. ve M.S. Gilmore. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol*, **9**(2), p. 133-7.
134. Dunne, W.M., Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, **15**(2), p. 155-66.
135. Hoiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*, **125**(4), p. 272-275.
136. Costerton, J.W., P.S. Stewart ve E.P. Greenberg. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**(5418), p. 1318-22.
137. Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, **33**(8), p. 1387-92.
138. Hawser, S.P. ve L.J. Douglas. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*, **62**(3), p. 915-21.
139. Desai, J.V., A.P. Mitchell ve D.R. Andes. (2014). Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **4**(10).
140. Aşkın Keçeli, S., M. Kurt, D. Özgür ve Z.F. Otağ. (2020). Klinik örneklerden izole edilmiş *Candida parapsilosis* suşlarının biyofilm oluşturma, hemolitik ve koagülaz aktiviteleri ile antifungal duyarlılıklarının karşılaştırılması. *KOU Sag Bil Derg*, **6**(3), p. 203-208.
141. Blankenship, J.R. ve A.P. Mitchell. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*, **9**(6), p. 588-94.
142. O'Toole, G., H.B. Kaplan ve R. Kolter. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, **54**, p. 49-79.
143. Hogan, D.A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, **5**(4), p. 613-9.
144. de Sousa, E.S.O., A.C.A. Cortez, M. de Souza Carvalho Melhem, H. Frickmann ve J.V.B. de Souza. (2020). Factors influencing susceptibility testing of antifungal drugs: a critical review of document M27-A4 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Braz J Microbiol*, **51**(4), p. 1791-1800.
145. Berkow, E.L., S.R. Lockhart ve L. Ostrosky-Zeichner. (2020). Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clin Microbiol Rev*, **33**(3).
146. CLSI, (2022) CLSI Document M27A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Edition. Vol. . Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
147. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. EUCAST Definitive Document E.DEF 7.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. [cited 2020; Available from: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>].


148. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2022. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. [cited 2022; Available from: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>].
149. Pfaller, M.A. ve D.J. Diekema. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*, **50**(9), p. 2846-56.
150. CLSI, (2018) CLSI Document M44. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition. Vol. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
151. Espinel-Ingroff, A. (2022). Commercial methods for antifungal susceptibility testing of yeasts: Strengths and limitations as predictors of resistance. *J Fungi (Basel)*, **8**(3).
152. Arrieta-Aguirre, I., P. Menendez-Manjon, M.S. Cuetara, I.F. de Larrinoa, J.C. Garcia-Ruiz ve M.D. Moragues. (2018). Sequencing of FKS Hot Spot 1 from *Saprochaete capitata* to search for a relationship to reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(2).
153. Desnos-Ollivier, M., S. Bretagne, A. Boullie, C. Gautier, F. Dromer, O. Lortholary, ve diğ. (2019). Isavuconazole MIC distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect*, **25**(5), p. 634 e1-634 e4.
154. Lockhart, S.R., S.A. Messer, M.A. Pfaller ve D.J. Diekema. (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, **46**(8), p. 2659-64.
155. <https://guides.lib.berkeley.edu/ncbi/blast>. [cited 2022 18.08.2022].
156. Yiğit, N. ve A.E. Aktaş. (2008). *Candida* türlerinde hemolitik aktivite araştırılması. *Turk J Infect*, **22**(2), p. 91-96.
157. Evci, C., (2015) Genotip 1 ve 3 *Trichosporon asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığın araştırılması. Uludağ Üniversitesi.
158. Özyavuz Alp, Ş., (2005) Klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* suşlarında ekstraselüler elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitelerinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi.
159. Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **38**(12), p. 4626-8.
160. Pierce, C.G., P. Uppuluri, S. Tummala ve J.L. Lopez-Ribot. (2010). A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *J Vis Exp*, (44).
161. Ball, A.L., E.D. Augenstein, T.M. Wienclaw, B.C. Richmond, C.A. Freestone, J.M. Lewis, ve diğ. (2022). Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. *Microb Pathog*, **167**, p. 105554.

162. Christensen, G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M. Baddour, F.F. Barrett, D.M. Melton, ve diğ. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, **22**(6), p. 996-1006.
163. Gokahmetoglu, G., F. Mutlu Sariguzel, A.N. Koc, O. Behret, S. Gokahmetoglu, M.A. Atalay, ve diğ. (2016). [Determination of *Candida* colonization and *Candida* score in patients in anesthesia intensive care unit]. *Mikrobiyol Bul*, **50**(3), p. 438-48.
164. Kangul, H., N. Ozcan, N. Uzuner, M. Mete ve U. Mert Erginer. (2020). *Saprochaete clavata* (*Geotrichum clavatum*) septicemia in a patient with multiple myeloma; An emerging case from Southeastern Turkey. *Curr Med Mycol*, **6**(4), p. 66-69.
165. Dupont, B.F., O. Lortholary, L. Ostrosky-Zeichner, F. Stucker ve V. Yeldandi. (2009). Treatment of candidemia and invasive candidiasis in the intensive care unit: post hoc analysis of a randomized, controlled trial comparing micafungin and liposomal amphotericin B. *Crit Care*, **13**(5), p. R159.
166. Pontieri, E., C. Caracciolo, T. Ceddia, B. Oliva, A. Ferrini, C. Girmenia, ve diğ. (2005). Genetic variability among *Blastoschizomyces capitatus* isolates from different clinical sources. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **18**(3), p. 531-9.
167. Yenisehirli, G., Y. Bulut ve E. Tuncoglu. (2010). [Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens]. *Mikrobiyol Bul*, **44**(1), p. 71-7.
168. Fotedar, R. ve S.S. Al-Hedaithy. (2005). Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, **48**(1), p. 62-7.
169. Arslan, U. ve D. Fındık. (2003). Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in vitro araştırılması. *Turk J Infect*, **17**(4), p. 471-481.
170. Borst, A. ve A.C. Fluit. (2003). High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol*, **52**(Pt 11), p. 971-974.
171. Mahmoudabadi, A.Z., M. Zarrin ve S. Miry. (2010). Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **3**(4), p. 169-173.
172. Kuzucu, Ç., Z. Çizmeci ve B. Durmaz. (2003). *Candida* türlerinde biyofilm ve fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, **60**(3), p. 73-76.
173. Birinci, A., C.C. Cihan, K. Bilgin, C. Acuner ve B. Durupinar. (2005). [Phospholipase activity of *Candida* species isolated from different clinical samples]. *Mikrobiyol Bul*, **39**(2), p. 205-9.
174. Jensen, R.G., F.A. deJong ve R.M. Clark. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids*, **18**(3), p. 239-52.
175. Fatahinia, M., M. Halvaezadeh ve A. Rezaei-Matehkolaei. (2017). Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *J Mycol Med*, **27**(2), p. 188-194.
176. Baloch, K.A., A. Upaichit, B. Cheirsilp ve F. Fibriana. (2021). The occurrence of triple catalytic characteristics of yeast lipases and their application prospects in

- biodiesel production from non-edible *Jatropha curcas* oil in a solvent-free system. *Curr Microbiol*, **78**(5), p. 1914-1925.
177. Turan, H. ve M. Demirbilek. (2018). Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Rev Argent Microbiol*, **50**(1), p. 62-69.
178. Gultekin, B., M. Eyigor, Y. Tiryaki, S. Kirdar ve N. Aydin. (2011). [Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR]. *Mikrobiyol Bul*, **45**(2), p. 306-17.
179. Tüzüner, U. ve R. İnci. (2017). *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun modifiye mikropalak ve modifiye XTT redüksiyon yöntemleri ile saptanması. *Ege J Med*, **56**(4), p. 178-182.
180. Girmenia, C., G. Pizzarelli, D. D'Antonio, F. Cristini ve P. Martino. (2003). In vitro susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(12), p. 3985-8.
181. Gurrieri, F., S. Corbellini, G. Piccinelli, A. Turra, E. Morello, M. Malagola, ve diğ. (2021). Management of invasive infections due to a rare arthroconidial yeast, *Saprochaete capitata*, in two patients with acute hematological malignancies. *Vaccines (Basel)*, **9**(11).

8. EKLER

Ek 1. Dijital Makbuz




Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Beyzanur Kaşaltı
Ödev başlığı:	Beyzanur Kaşaltı-yüksek lisans tezi
Gönderi Başlığı:	KLİNİK SAPROCHAETE İZOLATLARININ TÜR DÜZEYİNDE TANI...
Dosya adı:	Beyzanur_tez-d_zeltilen-28.09.2022-turnitin.docx
Dosya boyutu:	6.16M
Sayfa sayısı:	72
Kelime sayısı:	14,526
Karakter sayısı:	98,822
Gönderim Tarihi:	28-Eyl-2022 02:00ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1911163838



Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

Ek 2 Turnitin Ekran Görüntüsü

KLİNİK SAPROCHAETE İZOLATLARININ TÜR DÜZEYİNDE TANIMLANMASI, İKİ FARKLI REFERANS YÖNTEMLE ELDE EDİLEN ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 7	% 5	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	% 2
3	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	Feyza DEMİR, Semra KUŞTİMUR. "Investigation of Some Virulence Factors in Trichosporon spp. Strains", Mikrobiyoloji Bulteni, 2014 Yayın	<% 1

klinikmikrobiyoloji2013.org

9. ÖZGEÇMİŞ

