

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAKARYADA İZOLE EDİLEN ONİKOMİKOZ
ETKENLERİNİN OCTENİDİN DİHİDROKLORİD VE
HİPOKLORÖZ ASİTE DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve GÜL

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ
Ortak Danışman: Doç. Dr. Özlem AYDEMİR

OCAK-2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAKARYADA İZOLE EDİLEN ONİKOMİKOZ
ETKENLERİNİN OCTENİDİN DİHİDROKLORİD VE
HİPOKLORÖZ ASİTE DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve GÜL

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

“Bu tez 10/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 18/02/2022 tarihinde 37 sayılı karar numarası ile onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi yüksek lisans süresi boyunca her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, hoşgörüsü, öneri ile beni yönlendiren, tez planlama süresince bilgi, fikir ve tecrübelerini benimle paylaşarak yardımcı olan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye, bilgi, fikir ve tecrübelerini sunan aynı zamanda ortak danışmanım olan değerli hocam Doç. Dr. Özlem AYDEMİR'e ve sayın hocam Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU'na, deneyimlerini ve ciddi katkılarını sunan Öğr. Gör. Gülay ERMAN'a, tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen ve teknik desteklerini ve bilgilerini paylaşımlarından dolayı bütün laboratuvar teknisyenlerimize, yaşamım boyunca sevgisini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli annem İsmet GÜL, kıymetli babam Hüseyin GÜL ve canım kardeşlerim Hakan GÜL ve Meryem Müge GÜL'e bana olan inanç ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2022-7-24-70 numaralı proje ile desteklenmiştir

Saygılarımla

Merve GÜL

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
EKLER LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ONİKOMİKOZ NEDİR?.....	3
2.1.1. İnvazyon Yerine Göre Klinik Onikomikoz Türleri	4
2.1.2. Onikomikozun Tanısı ve Tedavisi	6
2.1.2.1. Tanı	6
2.1.2.2. Tedavi yöntemleri	7
2.1.2.2.1. Sistematik ilaçlar	8
2.1.2.2.2. Topikal ilaçlar.....	9
2.2. ANTİFUNGAL DİRENÇ NEDİR?.....	10
2.2.1. Antifungal Duyarlılık Testleri.....	11
2.2.1.1. Seyreltme (dilüsyon) yöntemleri	11
2.2.1.2. Disk difüzyon yöntemleri	12
2.3. AKIŞ SİTOMETRİSİ (FLOW CYTOMETRY, FCM) NEDİR?.....	12
2.3.1. Avantajları.....	13
2.3.2. Dezavantajları.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. SABOURAUD DEXTROSE BROTH VE SABOURAUD DEXTROSE AGAR BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI	15
3.2. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI	16
3.3. İDENTİFİKASYON.....	17

3.3.1. Mikroskopik İnceleme.....	17
3.3.2. Germ Tüp Testi.....	17
3.3.3. Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS).....	18
3.3.3.1. MALDI-TOF MS için alternatif matrikslerin denenmesi.....	19
3.4. AGAR DİLÜSYON TESTİ.....	19
3.5. TÜP DİLÜSYON.....	20
3.5.1. Besiyerlerinin Hazırlanması	21
3.5.1.1. SDB besiyeri hazırlanması.....	21
3.5.1.2. RPMI 1640 besiyeri hazırlanması	21
3.5.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	21
3.5.3. İnokuluma Katılacak Olan Antibiyotiklerin Hazırlanması.....	22
3.5.4. Mikroorganizmaların Ayarlanması	23
3.5.5. Dilüsyon Tüplerine İnokulumların Aşılması	24
3.5.6. Canlılık Kontrolü	24
3.6. HİPOKLORÖZ ASİTİN TİCARİ KONSANTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	24
3.6.1. Time-Kill yöntemi	25
3.7. MİNİMUM FUNGİSİDAL KONSANTRASYON (MFK).....	25
3.8. AKIŞ SİTOMETRİSİ.....	25
3.8.1. Optimizasyon Çalışmaları	26
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR	53
EKLER.....	61
Ek 1 RPMI 1640 İçeriği.....	61
Ek 2 Etik İzin Belgesi.....	62
Ek 3. ÖZGEÇMİŞ.....	63

KISALTMA VE SİMGELER

<i>A. niger</i>	: <i>Aspergillus niger</i>
AI	: Yapay Zeka
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
<i>C. arapsilosis</i>	: <i>Candida parapsilosis</i>
CD3	: Classification Determinant 3
CFU	: Colony Forming Unit
CHCA	: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CO	: <i>Candida</i> Onikomikozu
CV	: Standart Sapma
DLSO	: Distal Lateral Subungual Onychomycosis
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EO	: Endonyx Onychomycosis,
EUCAST E.Def	: EUCAST Definitive Document
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<i>F. solani</i>	: <i>Fusarium Soloni</i>
FCM	: Flow Cytometry
FSC	: Forward Scatter / İleri Saçılım
HIV	: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HOCl	: Hipokloröz Asit
KOH	: Potasyum Hidroksit
LPM	: Laktofenol Pamuk Mavisi
<i>M. canis</i>	: <i>Microsporum canis</i>
<i>M. gypseum</i>	: <i>Microsporum gypseum</i>
<i>M. nanum</i>	: <i>Microsporum nanum</i>
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/İonization Time Of Flight Mass Spectrometry/ Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi

MFK	: Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MOPS	: 3-(N-morpholino) Propanesulfonic Acid
NDM	: Non-Dermatophyte Mould/ Dermatofit Olmayan Küf
OCT-D	: Oktenidin Hidroklorür
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PCR	: Polymerase Chain Reaction/ Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PerCP	: Protein Cyanine Dye
PI	: Propidium iodide/ Propidyum iyodür
PSO	: Proksimal Subungual Onikomikoz
qPCR	: Gerçek Zamanlı/Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Revolutions per Minute/ Dakikadaki Dönüş Sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SDA	: Sabouraud-Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud-Dextrose Broth
Spp	: More Than One Species/ Birden Fazla Tür
SSC	: Side Scatter / Yana Saçılım
<i>T. erinaceii</i>	: <i>Trichophyton erinaceii</i>
<i>T. rubrum</i>	: <i>Trichophyton rubrum</i>
<i>T. schoenleinii</i>	: <i>Trichophyton schoenleinii</i>
<i>T. soudanense</i>	: <i>Trichophyton soudanense</i>
<i>T. tonsurans</i>	: <i>Trichophyton tonsurans</i>
<i>T. violaceum</i>	: <i>Trichophyton violaceum</i>
TDO	: Total Distrofik Onikomikoz
U-FEI	: Ultraviyole Floresan Uyarma Görüntüleme

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* suşlarının üreme kontrol tüplerinin canlılık analizi.

Şekil 2. *Candida albicans* suşunun OCT-D (1000 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi.

Şekil 3. *Candida albicans* suşunun HOCl (200 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

Şekil 4. *Candida albicans* suşunun Terbinafin (64 mg/l) antifungalı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

Şekil 5. *Candida parapsilosis* suşunun OCT-D (1000 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

Şekil 6. *Candida parapsilosis* suşunun HOCl (200 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

Şekil 7. *Candida parapsilosis* suşunun Terbinafin (16 mg/l) antifungalı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Onikomikoz tanı yöntemlerinin özeti

Tablo 2. Nihai inokulum hacmine bağlı olarak katılacak olan kloramfenikol ve sikloheksimid için gerekli hacmin hesaplanması.

Tablo 3. Suşların SDA besiyerinde üreme bilgileri ve görünümleri

Tablo 4. Suşların tanınmasında kullanılan yöntemlerin kıyaslanması

Tablo 5. MALDI-TOF MS ile tanılama için yapılan alternafit matriksler ve cihaz matriksinin kıyaslanması

Tablo 6. Onikomikoz etkenlerinin OCT-D dezenfektanı için agar dilüsyon ile MİK değerleri

Tablo 7. Onikomikoz etkenlerinin HOCl dezenfektanı için agar dilüsyon ile MİK değerleri

Tablo 8. Onikomikoz etkenlerinin Terbinafin için agar dilüsyon ile MİK değerleri

Tablo 9. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungali için SDB'de yapılan tüp dilüsyon testlerinin tüm suşlar üzerindeki MİK değer aralıkları

Tablo 10. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungali için RPMI 1640'da yapılan tüp dilüsyon testlerinin tüm suşlar üzerindeki MİK değer aralıkları

Tablo 11. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungali için yapılan MFK ve time kill testlerinin sonuçları.

Tablo12. Akış sitometrisi ile yapılan analizinden elde edilen canlı ve ölü hücre oranları

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Onikomikozun birincil etkenlerinin LPM boya ile hif, makrokonidyumları ve mikrokonidyumları.

Resim 2. Onikomikozun birincil etkenlerinin SDA besiyerindeki olgun kolonilerinin besiyerinin üstünden ve altından (zemininden) görünüşleri.



EKLER LİSTESİ

Ek-1 RPMI 1640 İçeriği

Ek-2 Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı

Ek-3 zgemiş



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada Sakarya ilinde izole edilen onikomikoz etkenlerinin Octenidin Dihidroklorid ve Hipokloröz Asite duyarlılıklarının agar dilüsyon, tüp dilüsyon ve akış sitometrisi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada kültür koleksiyonunda bulunan onikomikoz etkeni olan dermatofitlerin (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida* vb.) ve ikincil etken olan *Aspergillus niger* ve *Fusarium soloni*'nin çalışmaya hazır hale getirmek için SDA besiyerinde kültürü yapılmıştır. Türlerine göre isimlendirmek için MALDI-TOF MS kullanılmıştır. Üreme olan plaklardaki dermatofitlerin Oktenidin Dihidroklorür (OCT-D), Hipokloröz Asit (HOCl) ve Terbinafin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemi ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından belirtilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak tüp dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. MİK değerlendirmelerinden sonra minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerlendirilmiştir. MFK sonuca göre OCT-D, HOCl ve Terbinafin'in fungisidal etkisinin incelenmesi için SYTO 9 ve PI boya ları kullanılarak akış sitometrisi analizi yapılmıştır.

BULGULAR: Onikomikoz etkenleri üzerinde yapılan antifungal duyarlılık testlerinin sonucunda agar dilüsyon testi için yaklaşık MİK değeri OCT-D, HOCL ve Terbinafin için sırası ile 250 mg/l, 128 mg/l ve 0,064 mg/l olarak bulunmuştur. Tüp dilüsyon testinin sonucunda yaklaşık MİK değerleri OCT-D, HOCL ve Terbinafin için sırası ile 62,5 mg/l, 64 mg/l ve 0,032 mg/l olarak bulunmuştur. Akış sitometrisi ile yapılan canlılık analizleri neticesinde ise tüp dilüsyon testi kullanılarak bulunan değerlerin daha tutarlı olabileceği görülmüştür.

SONUÇ: OCT-D ve HOCl'nin ticari olarak satılmakta olan konsantrasyonlarının çok daha altında MİK değerlerine sahip olması ve öldürücülük oranlarının fazla olmasından dolayı yapılacak olan testler ile topikal tedavi için güçlü bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dermatofitler, Flow Sitometri, Hipokloröz Asit, MALDI-TOF MS, Octenidin Dihidroklorid, Onikomikoz.

SUMMARY

Determination of the Susceptibility of Onychomycosis Agents Isolated in Sakarya to Octenidine Dihydrochloride and Hypochlorous Acid.

INTRODUCTION AND AIM: In this study, it was aimed to examine the susceptibility of onychomycosis agents isolated in Sakarya province to Octenidine dihydrochloride and Hypochlorous Acid by agar dilution, tube dilution and flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS: In the study, dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Candida* etc.), which are the causative agents of onychomycosis in the culture collection, and *Aspergillus niger*, *Fusarium soloni*, which are the secondary causative agents, were cultured in SDA medium to make them ready for the study. MALDI-TOF MS was used to identify them according to their types. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for Octenidine Dihydrochloride (OCT-D), Hypochlorous Acid (HOCl) and Terbinafine of the dermatophytes in the growing plaques were determined by the agar dilution method and the tube dilution method with reference to the broth microdilution method specified by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). After MIC evaluations, the minimum fungicidal concentration (MFC) was evaluated. According to the MFC results, flow cytometry analysis was performed using SYTO 9 and PI dyes to examine the effects of OCT-D, HOCl and Terbinafine on cell viability.

RESULTS: As a result of antifungal susceptibility tests performed on onychomycosis agents, the approximate MIC value for the agar dilution test was found to be 250 mg/l, 128 mg/l and 0,064 mg/l for OCT-D, HOCL and Terbinafine, respectively. As a result of the tube dilution test, the approximate MIC values were found to be 62,5 mg/l, 64 mg/l and 0,032 mg/l for OCT-D, HOCL and Terbinafine, respectively. As a result of viability analyzes performed by flow cytometry, it was observed that the values found using the tube dilution test could be more consistent.

CONCLUSION: Since OCT-D and HOCl have MIC values much lower than commercially available concentrations and their lethality rates are high, it is thought that they can be a strong alternative for topical treatment with the tests to be performed.

Key words: Dermatophytes, Flow Cytometry, Hypochlorous Acid, MALDI-TOF MS, Octenidine Dihydrochloride, Onychomycosis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tırnakta distrofik görünüm oluşturan durumların yaklaşık %50'sinden onikomikoz sorumludur. Onikomikoz hastalığı genellikle immün yetmezlik, yaşlılık, genetik yatkınlık, ayak deformiteleri, nöropati, periferik dolaşım bozukluğu, tinea pedis enfeksiyonları, sigara, diyabet, dar ayakkabı ve tekrarlayan travma gibi faktörlerin bulunması durumunda daha kolay gelişmektedir (Piraccini and Alessandrini, 2015).

Her yaştan birey bu hastalıktan etkilenebilmekte ve dünya çapında yaygın olarak görülmektedir. Tırnak yapısının bozulmuş olması bazen ağrıya, tırnak batmasına ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlara sebep olup el ve ayakların kullanımını kısıtlayabilecek kadar ilerleyebilmektedir. Yaşamı tehdit eden bir klinik sorun olmasada ciddi ekonomik kayıplara ve kozmetik kaygılara sebep olabilen bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. (Aksu, 2009).

Dermatofitler tarafından oluşturulan yüzeysel mantar enfeksiyonlarının ve maya enfeksiyonlarının tedavisinde çeşitli oral antifungal ajanlar kullanılmaktadır. Onikomikozun tedavisinde, ilacın cildin en yüzeysel, ölü tabakasına (stratum corneum) etkili bir şekilde ulaşması gerekir. Fakat sistemik antifungaller bu konuda yetersiz kalmakta olduğu düşünülmektedir. Dermatofitozların mevcut oral antifungal ajanlarla tedavisi yetersiz doz miktarı, ilaç-ilaç etkileşimleri, hasta tedavi uyumsuzluğu ve maliyet gibi sorunlardan dolayı zordur (Khurana, Sardana and Chowdhary 2019).

Oral antifungallere ek olarak topikal ajanlar da tedavide kullanılmaktadır. İdeal bir topikal ajan için etkili olması, hasta için toksik olmaması, direncin gelişmesine yol açmaması ve uygun maliyetli olması gerektiği söylenmektedir. Topikal tedavinin zorlaşmasına neden olan faktör ise tırnağın keratin yapısından dolayı ilacın veya etken maddenin penetrasyonunun yavaş olmasının tedavi süresini uzatmasıdır (Yiğit, Akar ve Özbek 2020).

Topikal tedavinin avantajı olarak oral tedavilerdeki gibi ilaç-ilaç etkileşiminin ve sistemik yan etkilerinin olmaması söylenebilir. Bu nedenle, çok sayıda ilaç kullanan özellikle ileri yaştaki hastalarda ve kronik hastalığı olanlarda topikal tedavilerin oral tedaviden daha iyi olabileceği düşünülmektedir (Köse ve Güleç 2016). Hastaların tedavi sürecine uyum sağlayamaması (tedaviyi erken sonlandırma, yanlış dozlama, kaçırılan dozlar), hastalığın tırnağın %50'sinden fazlasını tutması, yeterli penatürasyonun olmaması, yaşlılarda tırnakların yavaş uzaması ve periferik dolaşımın azalması gibi durumlar tedaviyi olumsuz etkileyebilmektedir (Singal and Khanna 2011).

Onikomikozun tedavisinde oral ve topikal tedavi yöntemleri bulunsa da, mevcut ilaçların tam iyileşme oranları düşüktür. Araştırılan yeni topikal ajanların onikomikoz için sadece oral tedaviye uygun monoterapi alternatifleri sağlamakla kalmayıp, onikomikoz için etkili, iyi tolere edilen, kullanımı kolay bir tedavi yöntemi sunabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda yeni topikal antifungaller, oral antifungaller ile kombine tedavide veya ilk temizlemeden (debridman) sonra devam eden tedavide nüks veya yeniden enfeksiyonu azaltmak için kullanılabilir olabileceği düşünülmüştür (Del Rosso 2014).

Çalışmada Sakarya ilindeki hastalardan izole edilen ve mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan dermatofit etkenleri (*Trichophyton*, *Epidermophyton* ve *Candida* suşları) üzerine dezenfektan etkinliğinin Agar dilüsyon, sıvı dilüsyon metodu ve akış sitometrisi yöntemleri kullanılarak incelenmesi ve araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ONİKOMİKOZ NEDİR?

Onikomikoz, tüm tırnak bozukluklarının ~%50'sini ve tüm yüzeysel mikozların yaklaşık %30'unu oluşturan tırnakta görülen ve tırnağın tamamının kaybedilmesi ile sonuçlanabilen yaygın bir mantar enfeksiyonudur. Dermatofitler, enfekte ayak tırnaklarının %90'ında ve el tırnaklarının %50'sinde izole edilmektedir (Bodman and Krishnamurthy 2021, Gupta, Venkataraman and Talukder 2022).

Dünya çapında en yaygın enfeksiyonların arasında yer alabilecek olan, yüzeysel mikozlar her yaştan bireyde görülebilen bir hastalık olması sebebi ile önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Onikomikoz, yaşlılarda ve erişkinlerde diğer yaş gruplarındaki hastalardan daha yaygın olarak görülmektedir (Sharma and Nonzom 2021, Uemura et al 2022). Onikomikoz sebebi ile tırnaklarda görülen değişiklikler, kısıtlamaları olabilen diğer kozmetik problemlerle beraber günlük aktivitelerin bozulmasına sebep olan semptomlar ortaya çıkarabilmektedir. Bunun gibi durumların olumsuz psikolojik etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (Gupta et al 2022).

Yüzeysel mantar enfeksiyonlarından, üç cins dermatofit türünün (*Trichophyton*, *Epidermophyton* ve *Microsporum*) sorumlu olduğu ve bunların arasında *T. rubrum*'un tırnak enfeksiyonunun en belirgin nedeni olduğu belirtilmiştir (Ghannoum and Isham 2014). Bahsi geçen üç cins dışında diğer mikroorganizmalardan, dermatofit olmayan küfler (NDM'ler) ve mayaların bu enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir (Gupta et al 2022, Sharma and Nonzom 2021).

C. albicans'ın özellikle tırnaklarda meydana gelen onikomikozun %2'sini oluşturduğu bildirilmiştir. NDM onikomikozu öncelikle ayak tırnaklarından kültürlendiğinde üremektedir. Bu saprofitik küflerin örnekleri arasında *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Acremonium spp.*, *Scytalidium spp.* ve *Scopulariopsis brevicaulis* bulunmakta ve bu saprofitik küfler tırnak enfeksiyonlarının yaklaşık %8'ini oluşturmaktadır (Youssef et al 2018).

Bu enfeksiyonun, tanı güçlüklerine ek olarak sıklıkla hoş olmayan ve sosyo-profesyonel endişelere neden olduğu ve bundan dolayı; mikolojik incelemenin, şüphelenilen tanıyı doğrulamak ve neden olan ajanları belirlemek için çok önemli olduğu belirtilmektedir. Enfeksiyonun ciddiyetini ve klinik evresini belirlemek, tedaviyi yönlendirmeye yardımcı olmakta ve sonuçları iyileştirebilmektedir (Bodman and Krishnamurthy 2021).

2.1.1. İnvazyon Yerine Göre Klinik Onikomikoz Türleri

Onikomikozun tırnak tutulumunun şekline bağlı olarak farklı klinik onikomikoz çeşitleri olduğu bilinmektedir. Temel olarak klinik formlar Distal ve Lateral Subungual Onikomikoz (DLSO), Proksimal Subungual Onikomikoz (PSO), Beyaz Yüzeysel Onikomikoz (WSO), Endoniks Onikomikoz (EO), Total Distrofik Onikomikoz (TDO) ve *Candida* Onikomikozu olarak bilinir. (Aggarwal, Targhotra, Kumar, Sahoo and Chauhan 2020a, Grover and Khurana 2012).

Distal lateral subungual onikomikoz (DLSO): Orta sıklıkta görünen klinik formdur. Önce hiponikyumun keratini enfekte olmaktadır. Enfeksiyon daha sonra tırnak yatağını ve ardından tırnak plağını içerecek şekilde ilerlemektedir (Grover and Khurana 2012). Fiziksel olarak görünümünün, onikoliz (tırnak yatağının tırnak plağından ayrılması durumu) ve subungual alanın kalınlaşması olduğu söylenmektedir. Etiyolojik ajan olarak *T. rubrum* (en sık), *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *E. floccosum* sıralanmıştır (Aggarwal et al 2020a).

Proksimal Subungual Onikomikoz (PSO): Yaygın olmayan sıklıkta görünen klinik formdur. Klinik olarak, PSO lökonişi, proksimal onikoliz, subungual hiperkeratoz ve proksimal tırnak plağının harabiyeti şeklinde kendini göstermektedir. Enfeksiyon etkeninin önce proksimal tırnak kıvrımının stratum corneum'unu işgal ettiği ve daha sonra matrikse ve tırnak plağının alt yüzeyine nüfuz ettiği bildirilmiştir (Baran, Hay, Haneke, Tosti and piraccini 2006). PSO'un, özellikle HIV ile ilişkili immünosupresyon durumunda olan hastalarda, birkaç gün içinde birden çok tırnağını etkilenebilmektedir

(Moreno-Coutiño, Toussaint-Caire, and Arenas 2010). Etiyolojik ajan olarak *T. rubrum* (sık), *T. megnini* ve *T. schoenleinii* sıralanmıştır (Aggarwal et al 2020a).

Beyaz Yüzeysel Onikomikoz (WSO): Ayak tırnaklarında sıklıkta görülen (~%10'undan sorumlu olan) klinik form olarak karşımıza çıkmaktadır. WSO, mantarın birleşerek tüm tırnak plağını kaplayabilen küçük yüzeysel beyaz lekelere neden olmaktadır. WSO etkenlerinin tırnak plağına ilk tutunduğu yerin tırnağın dorsal kısmının olduğu bildirilmiştir (Piraccini and Alessandrini, 2015). Çoğunlukla ayak tırnaklarıyla sınırlıdır. Vakaların çoğunda, izole edilen organizma *T. mentagrophytes* olsa da *T. interdigitale*, *Aspergillus spp.*, *Acremonium spp.*, *Fusarium spp.* ve *Candida spp.* gibi organizmalar da izole edilebilen etken organizmalar olarak söylenebilmektedir (Aggarwal et al 2020a).

Endoniks Onikomikoz (EO): Diğer tutulumlara göre daha az sıklıkta görülen klinik form olduğu söylenebilmektedir. Tırnak plağı yüzeyi ve tırnak kalınlığı normal görünmektedir. Mantar elemanları tırnak yatağında ve hiponichiumda bulunmazken tırnak plağında çok sayıda mantar hifi görülebilmektedir (Tosti, Baran, Piraccini and Fanti 1999). EO tırnak yatağında hiperkeratoz veya onikoliz olmaksızın, etkilenen tırnağın süt beyazı renk değişikliği, çukurlar ve lamellar bölünmelerle düzensiz geniş dalgalar oluşturması şeklinde tırnağı etkilemektedir. Etiyolojik ajan olarak *T. soudanense* ve *T. violaceum* en çok izole edilen mantarlardır. (Elewski 1998, Aggarwal et al 2020a).

Total Distrofik Onikomikoz (TDO): Kronik mukokutanöz kandidiyazis vakalarında pirimer (birincil) veya önceki dört formdan herhangi birine ek olarak (sekonder) görülebileceği bildirilmiştir (Piraccini and Alessandrini 2015). Bu klinik tipin, plak, tırnak yatağı ve matrisin tüm kalınlığı dâhil olmak üzere tüm tırnağın tamamen yok edilmesi olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir. İlgili tırnağın kalınlaşıp opaklaşarak sarı-kahverengi şekilde bir görünüm kazandığı, ikincil tutulum söz konusu ise distrofik hal aldığı ve parçalanarak kaybolduğu belirtilmiştir (Aggarwal et al 2020a, Grover and Khurana 2012).

Candida Onikomikoz (CO): Tırnakta gözlemlenen onikomikozun yaklaşık yarısının *Candida* türlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir. CO klinik olarak, *Candida* paronişi, *Candida* granülomu ve *Candida* onikolizisi şeklinde görülebilmektedir. CO, normal ürogenital sistem florasında bulunan az miktardaki *Candida spp.* ile tırnakların kendi kendine aşılması nedeniyle kadınlarda daha sık rastlanmaktadır. Aynı zamanda kadınlarda ki rastlanma oranının fazla olmasının bir nedeni olarak sık sık su ve sabun kullanımının bu duruma ortam hazırlaması olarak bildirilmiştir (Jayatilake, Tilakaratne and Panagoda 2009, Köse ve Güleç 2016).

2.1.2. Onikomikozun Tanısı ve Tedavisi

2.1.2.1. Tanı

Karışık enfeksiyonlarda, tüm organizmalar tedaviye eşit yanıt vermemesinin klinik zorluk yaratmaktadır. İdeal tanının, optimal antifungal tedavinin seçilmesine olanak sağlamak için tüm aktif enfekte türlerin tanımlanması dâhil olmak üzere hızlı ve eksiksiz olması gerektiği belirtilmektedir (Gupta, Hall, Cooper ve Ghannoum 2022). Tablo 1’de verilen bilgiler tanılama yöntemlerinin bir özeti.

Tablo 1. Onikomikoz tanı yöntemlerinin özeti (Gupta, Hall et al 2022).

Tanı Yöntemi	Kullanıma Hazır mı?	Canlılık belirtir mi?	Tanımlayıcı Sonuç	Görelî Kullanım Detayları
Görsel Tanılama				
KOH Hazırlama	Evet	Hayır	Maya ve hif yoluyla mantar varlığı/yokluğu	Teknik maliyetler: Düşük, Performans: Laboratuvar teknisyeni/hekim; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat
PAS Boyama	Evet	Hayır	Maya ve hif yoluyla mantar varlığı/yokluğu	Teknik maliyetler: Orta-Yüksek, Performans: Laboratuvar teknolojisi; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat
Dermoskopi	Evet	Hayır	Tırnak enfeksiyonu ve diğer anormallikler	Teknik maliyetler: Düşük, Performans: Doktor; klinikte, Zaman gereksinimleri: <1 saat
U-FEI	Geliştirilmekte	Hayır	Mantar varlığı/yokluğu	Teknik maliyetler: Düşük, Performans: Doktor; klinikte, Zaman gereksinimleri: <1 saat
Konfokal Mikroskopi	Evet	Hayır	Maya ve hif yoluyla mantar varlığı/yokluğu	Teknik maliyetler: Yüksek, Performans: Laboratuvar teknolojisi; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat
Optik Koherens Tomografi	Evet	Hayır	Maya ve hif yoluyla mantar varlığı/yokluğu	Teknik maliyetler: Yüksek, Performans: Laboratuvar teknolojisi; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat

Tablo 1. Onikomikoz tanı yöntemlerinin özeti (devam)

Tanı Yöntemi	Kullanıma Hazır mı?	Canlılık Belirtir mi?	Tanımlayıcı Sonuç	Görelî Kullanım Ayrıntıları
Organizma Tanılama				
Mantar Kültürü	Evet	Evet	Dermatofitler/ NDM'ler/mayalar	Teknik maliyetler: Düşük, Performans: Laboratuvar teknisyeni/deneyimli mikolog; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: Haftalar
PCR	Evet	Hayır (yalnızca özel qPCR)	pirimer bağımlı: Dermatofitler/ NDM'ler/mayalar	Teknik maliyetler: Yüksek, Performans: Laboratuvar teknisyeni/uzmanı; laboratuvar Zaman gereksinimleri: Saat-gün (kullanılan yöntemlere bağılı olarak)
MALDI-TOF Kütle Spektroskopisi	Evet	Evet (test örneği olarak pozitif kültür)	Kütüphaneye bağılı: Dermatofitler/ NDM'ler/mayalar	Teknik maliyetler: Yüksek, Performans: Laboratuvar teknisyeni/uzmanı; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat test için (Kültür varsa haftalar)
Raman Spektroskopisi	Geliştirilmekte	Hayır	Kütüphaneye bağılı: Dermatofitler/ NDM'ler/mayalar	Teknik maliyetler: Yüksek, Performans: Laboratuvar teknisyeni/uzmanı; laboratuvar, Zaman gereksinimleri: <1 saat,-
Görsel Büyütme				
Yapay Zeka (AI)	Geliştirilmekte	Hayır	Tekniğe bağılı: Mantar varlığı/yokluğu veya Tırnak enfeksiyonu ve diğer anormallikler	Teknik maliyetler: Orta Performans: Özel yazılım; bilgisayar veya online Zaman gereksinimleri: Dakika-saat
Potasyum Hidroksit (KOH), Periyodik Asit-Schiff (PAS), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Gerçek Zamanlı/Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR), Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanı (MALDI-TOF), Ultraviyole Floresan Uyarma Görüntüleme (U-FEI).				

2.1.2.2. Tedavi yöntemleri

Onikomikoz tedavisi, enfekte olmuş tırnağın kimyasal veya cerrahi olarak çıkarılmasını (debridman), sistemik ilaçları, topikal ilaçları veya bunların bir kombinasyonunu içermektedir (Ghannoum and Isham 2014). Onikomikoz tedavisinde kullanılan oral antifungallerin karaciğer hasarı veya ilaç-ilaç etkileşimleri gibi özellikle yaşlı popülasyonda önemli olan yan etkileri olabilmektedir. El tırnaklarının enfeksiyonunun tedavî süreci, ayak tırnağı enfeksiyonlarına göre daha kısa sürmektedir (Elewski et al 2013).

2.1.2.2.1. Sistematik ilaçlar

Onikomikoz tedavisi için FDA onaylı oral antifungallerin; griseofulvin, itrakonazol ve terbinafin olduğu, flukonazol ve ketokonazolün reçete dışı tedavi edici ajan olarak kullanılmakta olduğu bildirilmiştir (Aggarwal, Targhotra, Sahoo and Chauhan 2020b). Oral tedavinin maliyetinin kısmen daha düşük oluşuyla kullanılan ajanların kolaylıkla temin edilebilmektedir. Oral antifungallerin kullanımı ile elde edilen klinik iyileşme sonuçları oldukça iyidir, ancak uzun tedavi süresi, zayıf biyoyararlanımı, ilaç etkileşimleri ve hepatotoksik etkileri tedavi tercihinde ve kullanımında dezavantaj oluşturmaktadır (Gupta, Paquet and Simpson 2013).

Meta-analizler, terbinafin için mikolojik tedavi oranının %76, itrakonazol için %63 ve flukonazol için %48'lik olarak etkili olduğunu, topikal tedavi mikolojik kür oranlarının efinafonazol için %55 ve tavaborole veya siklopiroks için %36 olduğunu göstermiştir (Bodman and Krishnamurthy 2021, Drago, Micali, Papini, Piraccini and Veraldi 2017, Wollina, Nenoff, Haroske and Haenssle 2016).

Terbinafin oral ve topikal olarak özellikle onikomikozda *Trichophyton* türleri için kullanılan bir antifungal ilaçtır. Bu ilaç, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek mantar öldürücü aktivite sergilemektedir. Fakat terbinafine dirençli enfeksiyon bildirimlerinin artmakta olduğu söylenmektedir. Hindistan'da, sekiz farklı lokasyonda yapılan çok merkezli bir çalışmaya göre terbinafine dirençli izolatların son prevalansının %16 (Güney Hindistan) ile %75-77 (Batı, Kuzey ve Doğu Hindistan) arasında değişmiş olduğu bildirmiştir (Ebert et al 2020).

Yapılan bazı çalışmalar dermatofitlerin duyarlılık testinin rutin bir uygulama olmadığını, bu nedenle terbinafin direncinin muhtemelen hafife alındığını göstermektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada en sık bildirilen tedaviye dirençli dermatofitlerin klinik olarak en çok tüysüz deriyi (tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei) etkileyerek enfeksiyon oluşturduklarını tespit etmişlerdir (Gupta, Renaud, Quinlan, Shear and Piguet 2021).

2.1.2.2.2. Topikal ilaçlar

Topikal ilaçların transungual olarak etki etmekte olduğu bildirilmiştir. Transungual ilaç dağıtımı, tırnakta meydana gelen çeşitli hastalıkları tedavi etmek ve ilacın gerekli olan dağıtımını gerçekleştirmek için ilacın tırnaklar yoluyla verilmesini içeren bir sistem olarak tanımlanmıştır (Aggarwal 2020a, 2020b, Elkeeb, Alikhan, Elkeeb, Hui and Maibach 2010).

Topikal antifungal tedavi sürecinde yaşanan yan etki ve ilaç-ilaç etkileşimleri riskinin, oral (sistemik) antifungal tedaviye göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Yüzeysel beyaz onikomikoz için topikal monoterapinin endike olduğu ve matriks tutulumu olmaksızın yüzey alanının %50'sinden daha azını etkileyen distal subungual onikomikoz olduğunda bile topikal monoterapinin dikkate alınması gerekmektedir (Gupta et al 2013).

Topikal tedavi, yüzeysel onikomikoz tedavisinde güçlü etki göstermekle beraber oral antifungallerle birlikte (sinerjik olarak) kullanıldığında umut verici sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte, topikal ilaçların tırnak plağı boyunca zayıf penetrasyonu, ilacın enfekte bölgeye ulaşmasındaki ana engel olarak görülmektedir (Aggarwal et al 2020b). Amorolfın, ciclopirox, efinaconazole ve tavaborole, onikomikoz gibi hastalıklarda tedavi için onaylanmış topikal ilaçlardır (Aggarwal et al 2020a). Reçete edilmemelerine rağmen çay ağacı yağı (*Melaleuca alternifolia*), topikal mentollü merhem, yılan kökü özü (*Ageratina pichinchensis*), Oktenidin Dihidroklörür (OCT-D) ve Hipokloröz Asit (HOCl) gibi maddeler antifungal tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadırlar (Gül ve Çiftci 2022).

Oktenidin Dihidroklörür (OCT-D; 1,1'-(Decane-1,10-diyl)bis(N-octylpyridin-4(1H)-imine)-hydrogen chloride), her molekülünde iki katyonik aktif merkez bulunduran ve geniş spektrumlu -hem gram pozitif hem de gram negatif bakterileri, mantarları ve birkaç viral türü kapsayan- antimikrobiyal etkiye sahiptir. Aktif merkezler aracılığı ile hücre duvarlarına ve zarlarına müdahale ederek bakterisidal/fungisidal etkiler göstermektedir (Chum et al 2019). OCT-D cilde nüfuz eden topikal olarak kullanılan %0,1'lik derişimde özellikle cilde müdahalelerden (örn. arteriyel veya venöz

kateterlerin yerleştirilmesi, ponksiyonlar, cerrahi prosedürler) önce cilt antisepsisi için kullanılan bir antiseptiktir. Oktenidin ile alifatik alkollerin sabit kombinasyonlarının kıyaslandığı bir çalışmada, %0,1 oktenidin ile %30 propan-1-ol ve %45 propan-2-ol kombinasyonu kullanılarak santral veya periferik venöz kateter yerleştirilmeden önce cilt antisepsisi uygulamalarının, %74 etanol kombinasyonu kullanılarak yapılan cilt antisepsisine göre önemli ölçüde daha etkili olduğu gösterilmiştir. (Dettenkofer et al 2002). Yapılan bir çalışmada 24 saat boyunca %10 propan-2-ol ile oktenidinin kombine olarak ciltte kullanımı esnasında ciltte hiçbir yan etki bildirilmemiştir. Alkol bazlı antiseptiklerin aksine OCT-D, 27. gebelik haftasından önce doğan prematüre bebeklerde cilt hasarına neden olmadığı söylenmektedir. Klorheksidin ve triklosanın aksine, oktenidinin cilt yoluyla emilmediği bildirilmiştir (Hübner, Siebert and Kramer 2010).

HOCl; su ve NaCl'nin elektrolizinin sonucunda elde edilmesinden dolayı ekonomik olduğu aynı zamanda da tüm memelilerde patojen mikroorganizmalara karşı etkili bir dezenfektan olarak kullanım alanının oldukça geniş olduğu bildirilmektedir. Nötrofiller, eozinofiller ve B lenfositler, enfeksiyonlara yanıt olarak mitokondriyal zara bağlı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ile HOCl üretmektedir. Elde edilen HOCl, pH=3-6 seviyelerinde ulaşmak suretiyle maksimum antimikrobiyal etki sergilemektedir. HOCl su içerisinde, H⁺ ve OCl⁻ olarak ayrışır ve proteinler üstünde denatürasyon ile etki eder. HOCl; kloraminler ve azotlu radikaller oluşturarak çift sarmallı DNA'ları parçalayarak virüsleri zararsız hale getirmektedir (Alhbou 2020, Ateş 2020).

2.2. ANTİFUNGAL DİRENÇ NEDİR?

Antifungal direnç, klinik ve mikrobiyolojik dirence bağlı olabileceği gibi ikisinin kombinasyonuna da bağlı olabilmektedir. Mikrobiyolojik direnç ya birincil/doğuştan gelen ya da ikincil/edinilmiş olarak ikiye ayrılabilir. Doğuştan veya birincil direnç, belirli bir ilacın aktivitesine direnmelerini sağlayan bir türün yapısal veya işlevsel doğal özelliklerini ifade etmektedir. Edinilmiş veya ikincil direnç, organizmaya daha önce duyarlı iken daha sonra direnç kazanarak adapte olduğu

anlamına gelmektedir. Optimum olmayan dozların sürekli kullanımının aynı zamanda edinilmiş antifungal direncin gelişimine sebep olduğu bildirilmektedir (Gupta et al 2021, Verma and Madhu 2017). Klinik direnç, uygun ajanlarla yapılan tedaviye rağmen enfeksiyonun devam etmesi olarak tanımlanabilmektedir. Klinik direnç tipik olarak yanlış tanı, yetersiz doz veya tedavi süresi, zayıf ilaç penetrasyonu, tedaviye uyumsuzluk ve yeniden enfeksiyondan kaynaklanabilmektedir. (Gupta et al 2021).

Antifungallerin fungistatik veya fungisidal etkilerine cevap olarak, mantarlar üç temel mekanizma kullanmaktadır. (Yeğenoğlu 2012):

1. Hücre içinde ilaç birikimini azaltarak, artmış efluks etkisi,
2. Hedef enzimde değişiklik yapmak (enzimin aşırı yapılması ile ilacın hedefine afinitesini azaltarak),
3. Metabolizmada değişiklik yapmak (ergosterol biyosentez yolunun değişimi, plazma membran sterol ve/veya fosfolipid bileşiminde değişikliğe yol açarak, geçirgenliği azaltarak, biofilm oluşturarak vb.)

2.2.1. Antifungal Duyarlılık Testleri

Şu anda mevcut olan referans yöntemler, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından maya (CLSI, M27Ed4) ve küfler (CLSI, M38Ed3) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, CLSI tarafından *Candida spp.* (flukonazol, vorikonazol) (M44Ed3) ve dermatofit olmayan filamentli mantarlar (M51AE) için geliştirilen disk difüzyon yöntemleridir (Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI 2018, 2017, 2015, 2010). European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar (EUCAST E.DEF 7.3.2), konidya formundaki küfler (EUCAST E.Def 9.4) ve dermatofitler (EUCAST E.Def 11.0) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemleri mevcut referans yöntemlerdir (Arendrup, Kahlmeter, Guinea and Meletiadis 2021, Arendrup et al 2020, Guinea et al 2022) .

2.2.1.1. Seyreltme (dilüsyon) yöntemleri

İki temel seyreltme türü mikro seyreltme ve makro seyreltme olup, sıvı (broth) ve agar en yaygın olarak kullanılan ortamlardır. Sıvı seyreltme dilüsyonlarında, antifungal ajanlar veya antibiyotikler sıvı besiyeri ile art arda iki kat seri dilüsyonları (1, 2, 4, 8

ve 12 µl) tüplerde veya 96 kuyucuklu plaklarda yapılmaktadır. Bakteriler (mantarlarda mikrokonidya süspansiyonu olarak hazırlanır) standart bulanıklığa ayarlanıp (0,5 McFarland) antibiyotikli besiyerlerinin üzerine eklenmekte ve bir gece 35-37 °C de inkübe edilmektedir (mantarlar için McFarland ayarı daha fazla ve bu süre daha uzundur). İnkübasyonun ardından kültür ortamının bulanıklığına bakılarak MİK değeri belirlenmektedir (Jorgensen and Turnidge 2015, Khan, Siddiqui ve Park 2019). Agar seyreltme yönteminde, sıvı seyreltmeden farklı olarak antifungal ajanlar veya antibiyotikler agar ortamına seyreltilerek, plaklara agarın dökülüp sertleşmesi ve agar plakasının yüzeyine bakteri hücrelerinin uygulanması şeklinde yapılmaktadır. Yorumlanması bakteri üremesine göre yapılmaktadır (Wheat 2001).

2.2.1.2. Disk difüzyon yöntemleri

Bu yöntemde, saf olarak izole edilmiş bakteri kolonisi (mantarlarda mikrokonidya süspansiyonu olarak hazırlanır) seçilmekte ve standart olan 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmaktadır. Standartlaştırılmış süspansiyon daha sonra katılaştırılmış agar plakasına aşılanmaktadır ve antifungal ajanla veya antibiyotikle muamele edilmiş kâğıt diskler aşılanmış plakaya hafifçe yerleştirilmektedir. 35 °C'de bir gece boyunca inkübasyondan sonra disklerin etrafında inhibisyon bölgeleri oluşmaktadır (Mantarlarda bu süre daha uzun olmaktadır) ve bu bölgelerin çapı antifungal ajan veya antibiyotik konsantrasyonuna karşılık gelmektedir (Khan et al 2019, Reller, weinstein, jorgensen and Ferraro 2009).

2.3. AKIŞ SİTOMETRİSİ (FLOW CYTOMETRY, FCM) NEDİR?

Akış sitometrisi, “tekli veya çoklu lazerlerden geçerken tamponlu tuz bazlı bir solüsyonda (kılıf solüsyonunda) asılı duran tek hücreleri veya parçacıkları hızla analiz eden bir teknolojidir” (McKinnon 2018). Her parçacık, bir veya birden fazla floresan parametresi için görünür ışık saçılımı ile analiz edilmektedir. Görünür ışık dağılımı, hücrelerin muhtemel boyutunu gösterebilen ileri yön (ileri saçılım, FSC) ve hücrelerin iç karmaşıklığını veya tanecikliğini gösteren 90° açılı dikey yönde (yan saçılım, SSC) olmak üzere iki farklı yönde ölçmektedir. Işık saçılımı floresan ölçümünden bağımsızdır (Sandhaus, Ciarlini, Kidric, Dillman and O'riordan 2010).

Floresan parametrelerinin ölçülmesi için örnekler, floresan proteinlerin transfeksiyonu ve ekspresyonu (Örn: yeşil floresan proteini), floresan boyalarla boyama (Örn: DNA gibi nükleik asitleri etiketleyen propidyum iyodür) veya floresan olarak konjuge antikorlarla immün boyama (Örn: floresan izothiyosiyanat, floresan izothiyosiyanat'a konjüge edilmiş CD3 antikoru) aracılığı ile hazırlanarak floresan ışık altında görünür hale getirilmektedirler. Araştırılacak hücreye bağlanan bu floresan parametreler ise renk algılayıcı dedektörler tarafından belirli dalga boylarındaki ışınları algılanarak ölçülebilir hale getirmektedir (Cho et al 2010, Vembadi, Menachery and Qasaimeh 2019).

Akış sitometrisi, immünoloji, viroloji, moleküler biyoloji gibi birçok disiplinde uygulamaları olan güçlü bir araçtır. Kanser biyolojisinin, bulaşıcı hastalıkların ve bağışıklık sisteminin incelenmesi için oldukça etkili olduğu bildirilmektedir. Lenf düğümleri, dalak, katı tümörler, mukozal dokular vb. gibi tek hücrelere ayrılabilen katı dokuların yanı sıra kemik iliğinden ve kandan karışık hücre popülasyonlarına kadar aynı anda farklı hücrelerin bir arada olduğu örneklerin karakterizasyonuna izin vermektedir (Jelinek et al 2017).

Akış sitometrisinin önemli bir özelliği de uygulama sonrası, daha sonraki akış aşağı analizler için hücreleri tek tip popülasyonlar halinde ayırabilmekte oluşudur. Akış sitometrisinde, boncuk analizi için 96 kuyucuklu sistemler, mikroskopi ve akış sitometrisini birleştiren sistemler ve kütle spektrometrisi ile akış sitometrisini birleştiren sistemler gibi belirli amaçlar için tasarlanmış cihazlar olduğu gibi çoklu lazer sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Vembadi et al 2019).

2.3.1. Avantajları

Hız: Diğer tekniklere nazaran hızlıdır, binlerce hücreyi saniyeler içerisinde analiz edebilecek potansiyele sahiptir.

Duyarlılık: FCM ile hücre ışına yapmasa bile floresan problarla işaretlenerek ölçülebilir. Ayarlanabilen her dalga boyunun veya her partikülün ayrı ayrı sayılması mümkündür.

Doğruluk: Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve fluoresan ölçümleri için varyasyon sabitinin (CV=standart sapma/ortalama) %1 veya daha az olduğu bildirilmiştir.

Gruplama: Herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonları aracılığı ile hücrelerin fiziksel olarak birbirlerinden ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücreleri elde etmek mümkün olur.

Maliyeti: Cihazların kurulumunun maliyeti oldukça yüksek olmasına rağmen, kullanım ve bakım maliyetleri nispeten düşüktür (Azkur and Aslan, 2012, Karaboz Kayar ve Akar 2008, Olson, Zettler and Anderson 1989).

2.3.2. Dezavantajları

Sınırlı çözümüleme: Tipik olarak bir hücrenin ayrıntılı yapısal detayları değil pik yapan veya entegre edilmiş sinyal proplarından yayılan sinyalleri ölçebilir. Bu sorun ölçüm yapılması istenen yapılara özel olarak bağlanan veya incelenmek istenen yapı dışında kalan yapılara bağlanan optik olarak aktif kimyasallar kullanılarak çözülebilir.

Küçük örnek boyutu: Birçok FCM çok küçük hacimleri (<0.5 mm) analiz edebilmektedir. En küçük hücreler yaklaşık olarak 10^3 /ml olarak bulunurlar. Bu nedenle her mikroorganizmanın veya farklı yapının araştırılması öncesinde FCM cihazına doğru ve uygun bir şekilde kalibrasyon ve modifikasyon ayarlanması gerekmektedir (Kanev ve Muranlı, 2015, Olson et al1989).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda T.C. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kültür koleksiyonunda saklanmış olan dermatofit suşları (9) ve onikomikozun ikincil etkeni olarak kabul edilen mikroorganizmalar (2) çözdürülerek kullanılmıştır. Buzdolabında saklanan bu suşlar canlandırıldıktan sonra antifungal duyarlılık testleri yapılmış, görsel ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Kullanılacak olan dezenfektanların (Hipokloröz Asit ve Oktenidin Dihidroklorür) etkinliğinin analizi için agar dilüsyon ile tüp dilüsyon testleri ve canlılık tayini için akış sitometrisi kullanılmıştır. Kontrol amaçlı antifungal olarak kullanılmakta olan Terbinafin de çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma için Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 18.02.2022 tarihli ve 37 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

3.1. SABOURAUD DEXTROSE BROTH VE SABOURAUD DEXTROSE AGAR BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

Sabouraud dextrose brothun (SDB) hazırlanması için toz SDB besiyeri (Beckton, Dickinson, A.B.D.) 30 g/l olacak şekilde hazırlanacak miktara göre tartılmış ve balon joje içine aktarılmıştır. Ardından hesaplamada kullanılacağı düşünülen kadar distile su toz besiyeri üstüne aktararak iyice çözdürülmüştür. Balon jojenin ağzı uygun şekilde kapatılmıştır ve 15 dk. 121 °C'de otaklav (Nüve, Türkiye) ile steril edilmiştir. Ardından 20cc'lik enjektör ile 15 ml'lik steril tüplere 8 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Sabouraud dextrose agarın (SDA) hazırlanması için toz SDA besiyeri (Becton Dickinson, A.B.D.) 65 g/l olacak şekilde hazırlanacak miktarda tartılmış ve balon joje içine aktarılmıştır. Ardından hesaplamada kullanılacağı düşünülen kadar distile su toz besiyeri üstüne aktararak iyice çözdürülmüştür. Balon jojenin ağzı uygun şekilde kapatılmıştır ve 15 dk. 121 °C'de otaklav ile sterile edilmiştir. Besiyeri 40-45 °C'ye gelince önceden hazırlanmış olan boş petri kaplarına 1/3'ini kaplayacak şekilde dökülmüştür. Besiyerleri hazırlandıktan sonra kullanılmayacaksa petri kapları ters çevrilerek, sıvı besiyerleri ise kullanıma hazır olarak 5ml olacak şekilde tüplere paylaştırılarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.2. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI

Sakarya Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan dermatofit suşları dolaptan çıkarılmış ve oda ısısına gelene kadar beklenmiştir. Bu suşların canlılığını koruyabilmesi için yılda bir alt kültüre alınarak buzdolabında (+4 °C veya -20 °C) saklanmıştır. Oda ısısına gelen 15 ml'lik eğik SDA bulunan tüplerdeki suşlar iğne öze yardımı ile alınmış 8 ml SDB bulunan steril tüplere pasajlanmıştır.

Ekimi yapılan tüpler her gün iyice çalkanmış ve kapakları yarım tur açık bırakılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu çalkalama işlemi yıldız şeklinde üremeler görülene kadar tekrarlanmıştır. Üremenin görülmesinin ardından iğne öze yardımı ile yıldız görünümündeki bir parça alınmış ve SDA'nın orta noktasına ve kenarına tek nokta ekim yapılarak pasajlanmıştır.

Bonucuklu saklama besiyeri içinde onikomikoz etkeni olarak saklanmakta olan 2 *Candida* türü de çözdürülerek SDA besiyerine ekimi yapılmıştır. Bonucuklu saklama besiyeri içinden ekim yapılırken besiyerine 4 boncuk aktarılmış ve besiyerinin her yerine temasının sağlamak için besiyerinin kapağı kapatılarak sallanmıştır. Bir gece üremesi için 37 °C'de etüvde inkübe edilmiş, üreme görüldükten sonra tekrardan pasaj alınmıştır. *Candida albicans* suşunun tespiti için çözdürülen ve üreyen koloniler germ tüp testine tabi tutulmuştur. Ardından doğrulama amacı ile MADİTOF-MS cihazı kullanılmıştır.

Her tüpten iki tane SDA besiyerine ekim yapılmış ve ekimi yapılan plakların biri 37 °C'de etüvde, biri oda sıcaklığında (24-28 °C) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında iki günde bir kontrol yapılmıştır. Yapılan gözlemlere göre plakların üstten ve alttan görünüşleri not edilmiştir. Dilüsyon testleri yapıldıkça ayda bir pasaj alınarak dermatofitler canlı tutulmuştur.

3.3. İDENTİFİKASYON

3.3.1. Mikroskopik İnceleme

Küf ve benzeri mantarların incelenmesinde sıklıkla kullanılan boya olan laktofenol pamuk mavisi (LPM) isimli boya kullanılarak 6-7 günlük olmuş 9 farklı koloniden alınan numuneler boyanmıştır. Boyamada şu yöntem izlenmiştir.

Her petri kabı için bir lam numaralandırılmıştır. LPM boyadan numaralandırılan lam üzerine bir damla boya damlatılmıştır. Daha sonra bir selefan bant parçası kesilmiş ve plağın kapağı açılıp yapışkan kısmı koloniye hafifçe bastırılmıştır. Ardından selefan bant boya damlatılmış lama yapıştırılmıştır. 5-10 dk sonra mikroskop altında türlere özgü makrokonidya, mikrokonidya ve hif yapıları aranmıştır.

Hif yapısı içermeyen iki suşun kolonilerinden lam üzerine öze yardımı ile sürülmüş olup, ateş ile sabitlenmiştir. Ardından hızlı boyama yapılarak 100X'lik objektifte maya hücreleri gözlemlenmiştir. Bu hücrelere germ tüp testi uygulanmıştır. Laktofenol pamuk mavisi ile inceleme yapılırken "Medically important fungi: A guide to identification" kaynağından faydalanılmıştır (Larone 1987).

3.3.2. Germ Tüp Testi

Onikomikoz etkeni olan ve *Candida spp.* olduğu bilinen iki suşun ayrımını yapmak için bu yöntem kullanılmıştır. İki tüpe sağlıklı olduğu bilinen taze insan kanından 0.5 ml insan serumu konmuştur ve tüpler numaralandırılmıştır. Kültürde üreyen maya kolonilerinden alınarak serumlu tüplere inoküle edilmiştir. Etüvde 35-37 °C'de 1.5 saat ve 3 saat bekletilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda, tüpler etüvden çıkarılmış, örneklerden birer damla lam üzerine konulmuş ve üzerine lamel kapatılarak mikroskop altında incelenmiştir. Germ tüp (çimlenme borusu) pozitif (+) olduğunu söyleyebilmek için çimlenme borusunun eni, çıktığı maya hücrelerinin yarısı kadar olması, çıktığı noktada daralma ve boğum olmaması, kenarlarının birbirine paralel uzanması ve tek parça yani septasız olması durumları göz önünde tutulmuştur. Test pozitif ise maya mantarı *Candida albicans* olarak isimlendirilmiştir.

3.3.3. Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Mikroskopik tanılamayı desteklemek ve doğrulamak için MALDI-TOF MS (BioMerieux, Fransa) kullanılarak isimlendirme yapılmıştır. Mikroskopik incelemenin ardından genç sayılabilecek (6-7 günlük) mantar kolonileri ve maya türleri MALDI-TOF MS cihazına verilmiştir. Cihazın okumadığı koloniler mikroskopik inceleme ile isimlendirilmiştir. Cihaza verilecek numunelerin hazırlanmasında firmanın önerdiği aşağıda anlatılan küf tanılama yöntemi izlenmiştir.

Eküvyon steril distile su ile ıslatıldıktan sonra besiyerinin üzerindeki spordan alınıp ependorf içinde bulunan 900 µl %70'lik alkol (etanol) içerisine (%99'luk alkolü %70'lik yapmak için 700 µl alkole 300 µl distile su eklenmiştir) daldırılmış ve eküvyon döndürülerek alınan numunenin sıvı içine dağılması sağlanmıştır. Sporları alırken besiyerine temastan kaçınılmıştır. Daha sonra ependorf tüpün ağzı kapatılmış 30 saniye vortekslenmiştir. Ardından 14000 rpm 2 dk. santifüj edilmiştir.

Süpernatant palete dokunulmadan uzaklaştırılmıştır. Alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak için tüpün ağzı kısa bir süre açık bırakılmıştır. Peletin içinde bulunduğu ependorf tüpün içine %70'lik 40 µl formik asit eklenmiştir (%99'luk formik asiti %70'lik yapmak için 700 µl formik asiti 300 µl distile su eklenmiştir). Eklendikten sonra pipet yardımı ile karıştırılmış ve 30 saniye vortekslenmiştir. Ardından üzerine 40 µL asetonnitril eklenmiş ve tekrar 30 saniye vortekslenmiştir. Bu işlemden sonra 2 dk. 14000 rpm hızda santifüj edilmiştir.

Santifüj sonrası süpernatantta 1 µl cihaza verilecek olan slaytın kuyucuğuna damlatılmıştır ve kuruması beklenmiştir. Maya türü mantarlar direkt slayta sürülmüştür ve 1 µl formik asit damlatılmıştır. Formik asit kuruduktan sonra slaytta bulunan tüm kuyucuklara 1 µl CHCA matriks sıvısı damlatılmıştır. Slayt kuruduktan sonra slaytın kaydı yapılmıştır ve cihaza verilerek analiz edilmiştir. Bu yöntem küf ve hifa içeren mantarlar için rutinde kullanılan protokoldür.

3.3.3.1. MALDI-TOF MS için alternatif matrikslerin denenmesi

CHCA matriksin modifiye edilmiş olan iki versiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler 3.3.3. nolu başlıkta anlatılan şekilde küf protokolü uygulanarak test edilmiştir. Bu yöntem alternatif olarak kullanılan formik asit, asetonitril, etanol konsantrasyonları değiştirilerek, cihazın kendi matriksine ek farklı formülasyonda olan iki farklı matriks ve slayta tek damla matriks damlatılarak denirken aynı zamanda slayta damlatılan matriks kuruduktan sonra ikinci kez damlatılarak 48 farklı yöntem ile beraber denenmiştir.

3.4. AGAR DİLÜSYON TESTİ

Kullanılacak dezenfektanların antifungal etkinliğinin araştırılmasında izlenilecek yöntemlerden biri de agar dilüsyon metodudur. Bu test için EUCAST'de önceden belirlenmiş standart bir yöntem bulunmamasından dolayı aşağıda belirtilen yöntem izlenmiştir. Bu yöntem iki kez tekrar edilmiştir. SDA besiyeri 300 ml'lik besiyeri hazırlanır gibi 250 ml içinde hazırlanıp steril edilmiştir. Bu işlem 8 adet balon joje için tekrarlanmıştır. Sterilizasyon sırasında stok çözeltiler (dezenfektan çözeltileri) hazırlanmıştır. Bu çözeltiler hazırlanırken aşağıdaki formüllerden faydalanılmıştır* (Arendrup et al 2021). Stok solüsyon hazırlanırken 50 ml içinde 300 ml'lik hazırlanır gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltinin çift kat seri dilüsyonları 8 steril kap kullanılarak yapılmıştır.

$$*\text{Ağırlık (mg)} = [\text{hacim (ml)} \times \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})] / \text{potens } (\mu\text{g/mg})$$

$$*\text{Hacim (l)} = [\text{ağırlık (g)} \times \text{potens } (\mu\text{g/mg})] / \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})$$

Stok çözelti hazırlanırken ticari konsantrasyonun iki katı olacak şekilde hazırlanmıştır. Dezenfektanlar için ticari konsantrasyonlar hedef miktarken, terbinafin için EUCAST'te QC tablolarında belirtilen konsantrasyon (0,016 mg/l) dermatofit etkenleri için referans alınmıştır. Dermatofit olmayan etkenler için terbinafinin literatürde belirtilen MİK değer aralıkları (32-2 mg/l) referans alınmıştır. (Mota et al 2009, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST 2022). HOCl'nin toz hali

bulunmadığından dolayı ticari konsantrasyonu direkt olarak stok çözelti olarak kullanılmıştır. Ticari derişim time killing testi ile araştırılmıştır.

Hazırlanan her dezenfektan derişimi 22 µm por çapına sahip şırınga filtre ile filtrelenerek sterilize edilmiştir. Balon jojelerde bulunan steril edilmiş olan besiyeri 40-50 °C ısıya geldiklerinde, hazırlanan dezenfektanların seri dilüsyonları sırayla balon jodede bulunan sıvı miktarı 300 ml'ye tamamlanacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra bakteriyel kontaminasyonun önüne geçmek için her balon jodaye derişimi 0.05 g/l olacak şekilde gentamisin eklenmiştir. Ardından dilüe edilmiş halde hazır olan besiyerleri, derişimlerinin yazılı olduğu boş steril petri kaplarına 1/3'ini kaplayacak şekilde (4 mm kalınlıkta) dökülmüş ve donması beklenmiştir. Her bir suş için sterilizasyon ve üreme kontrol amaçlı iki tane dezenfektansız besiyeri dökülmüştür.

Agarlar katılaşıırken saf kültürlerde elde edilen kolonilerden örnek alınarak %0.1 Tween-20 takviyeli steril distile su içerisinde çözdürülmüştür. Hif yapısı içeren mantar süspansiyonları steril filtre kağıdı yardımı ile süzdürülerek konidya süspansiyonu hazırlanmıştır. Konidya süspansiyonu için 1.5-2 Mcfarlanda *Candida spp.* Türleri için 0.5-1 Mcfarland ayarlanmıştır.

Hazırlanan solüsyondan standart öze yardımı ile bir damla alınmış (20 µl) sterilizasyon plağın dışındaki tüm plaklara ekim yapılmıştır. Daha sonra 37°C'de inkübe edilmiş ve kontrol plağında üreme görülene kadar günlük olarak kontrol edilmiş ve not edilmiştir. Üreme gözlenmeyen plaklardaki konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiştir.

3.5. TÜP DİLÜSYON

Kullanılacak dezenfektanların antifungal etkinliğinin araştırılmasında ikinci yöntem olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılacaktı fakat yapılan ön çalışmalarda mikrodilüsyon plaklarındaki etken dışı kontaminasyonun fazla olması, mantarların hifal yapılarının okumayı engellemesi durumlarının önüne geçilememesi ve dezenfektanların dilüsyonlarının SDB besiyerine eklenmesi ile bulanık görüntü

oluşması gibi sebeplerden dolayı bu yöntem tüp dilüsyon olarak 10 ml'lik steril kapaklı tüplerde yapılmıştır. Bu yöntem uygulanırken EUCAST tarafından yayınlanmış olan E.Def 11.0 yöntemi göz önünde tutulmuştur. (Arendrup et al 2021) Aynı zamanda bu çalışma standart yöntemde belirtilen RPMI 1640 besiyeri ile beraber SDB besiyeriyle de her dezenfektan için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Her 1 ml dilüe edilmiş besiyeri içine 1-2 McFarland aralığındaki inokulumdan 10 µl ilave edilmiştir.

3.5.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Hazırlanan SDB ve RPMI 1640 besiyerleri, uygun şekilde sterile edildikten sonra ayrı ayrı 10 ml'lik tüplere, 5 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Aynı zamanda her çalışma tekrarında her tür için 5 ml besiyeri eklenmiş iki tüpten biri üreme kontrol tüpü diğeri ise hiçbir işlem uygulamadan sterilizasyon kontrol tüpü olarak ayrılmıştır.

3.5.1.1. SDB besiyeri hazırlanması

SDB besiyeri kutuda yazan miktara göre 15 gram tartılmış ve balon joje içerisine aktarılmıştır. Üzerine 500 ml su eklenmiştir ve çalkalanarak çözdürülmüştür. Ardından balon jolenin ağzı uygun şekilde kapatılarak otoklav bantı ile bantlanmıştır. Daha sonra otoklavda 15 dk 121 °C'de sterilize edilmiştir.

3.5.1.2. RPMI 1640 besiyeri hazırlanması

Erlen içine 20,8 g RPMI-1640 + 36 g glikoz (%2 için) + 69.06 g MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) + 900 ml steril damıtılmış su eklenmiştir. Tozlar çözdürüldükten sonra çözelti steril damıtılmış su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 0.22 µm por çapı bulunan şırınga ucu filtre aracılığı ile sterilize edilmiştir. RPMI 1640 besiyerinin bileşenleri **EK-1**'de verilmiştir.

3.5.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Dezenfektanlar için test edilecek MİK aralıkları belirlenirken, onikomikoz etkenleri için klavuzlarda değer belirtilmemiştir. Dolayısı ile test edilecek olan aralıklar ayarlanırken ticari konsantrasyonları ile beraber literatürde daha önce yapılmış olan çalışmalarda bulunan MİK değerlerindeki içine alacak şekilde seyreltilmesine karar verilmiştir (Hübner, Siebert and Kramer, 2010).

Kalite kontrol amaçlı kullanılacak olan terbinafin antifungal için EUCAST’de bulunan QC tablolarında *T. rubrum* için geçici MİK (0.016mg/L) değerleri belirtilmiş olan Terbinafin antifungal QC tablosundaki MİK değerinin iki katı olarak hazırlanmıştır ve kontrol amaçlı çalışmaya dahil edilmiştir. Terbinafin antifungalinin, dermatofit olmayan türler üstündeki etkinliği hakkında QC tablolarında bir değer belirtilmediğinden literatürde yazan değerler değer aralıkları (32-2 mg/l) referans alınmıştır. (Mota et al 2009; EUCAST 2022).

Stok çözeltiler (dezenfektan çözeltileri) çalışmaya başlamadan önce hazırlanırken aşağıdaki formüllerden faydalanılmıştır* (Arendrup et al 2021). Stok çözeltiler incelenecek duyarlılığın iki katı olarak tartılmıştır ve steril distile su içinde çözdürülmüştür. Stok çözeltiler çalışma yapılacağı zaman hazırlanmıştır ve 0,22 µm por çapına sahip şırınga ucu filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. HOCl’in toz hali bulunmadığından dolayı ticari konsantrasyonu farklı bir yolla araştırılmıştır.

$$*\text{Ağırlık(mg)} = [\text{hacim(ml)} \times \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})] / \text{potens } (\mu\text{g/mg})$$

$$*\text{Hacim(l)} = [\text{ağırlık(g)} \times \text{potens } (\mu\text{g/mg})] / \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})$$

3.5.3. İnokuluma Katılacak Olan Antibiyotiklerin Hazırlanması

Tabloda, yatay formatta antifungal içeren mikropate için 8 ml’lik ve 12 ml’lik nihai inokulum örnekleri hazırlanırken kullanılan antibiyotiklerin miktarları verilmiştir. Tüp dilüsyon için kullanılacak olan miktarlarda, verilen bu formüllere göre hesaplanmıştır. Kloramfenikol ve sikloheksimidin toplam hacmi, inokulumun toplam hacminin %0,8’ine karşılık gelmesinden dolayı görmezden gelinbilir olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (Arendrup et al 2021). *Candida spp.* ile yapılan çalışmada sikloheksimitin mayalara etki etmesinden dolayı sadece kloramfenikol kullanılmıştır. Hazırlanan nihai inokulum hacmine bağlı olarak inokulum içine ilave edilecek kloramfenikol ve sikloheksimid için gerekli hacmin hesaplanmasına ilişkin talimatlar **Tablo 2**’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Nihai inokulum hacmine bağı olarak katılacak olan kloramfenikol ve sikloheksimid için gerekli hacmin hesaplanması. (Arendrup et al 2021)

İnokulum hacmi	Kloramfenikol için gereken stok solüsyon hacmi (50 000 mg/l)	Sikloheksimid için gereken stok solüsyon hacmi (100 000 mg/l)	İnokulum eklenen toplam hacim
5 ml*	$\frac{100 \text{ mg/l} \times 5\,000 \mu\text{l}}{50\,000 \text{ mg/l}} = 10 \mu\text{l}$	$\frac{600 \text{ mg/l} \times 5\,000 \mu\text{l}}{100\,000 \text{ mg/l}} = 30 \mu\text{l}$	40 μl
8 ml	$\frac{100 \text{ mg/l} \times 8\,000 \mu\text{l}}{50\,000 \text{ mg/L}} = 16 \mu\text{l}$	$\frac{600 \text{ mg/l} \times 8\,000 \mu\text{l}}{100\,000 \text{ mg/l}} = 48 \mu\text{l}$	64 μl
12 ml	$\frac{100 \text{ mg/l} \times 12\,000 \mu\text{l}}{50\,000 \text{ mg/l}} = 24 \mu\text{l}$	$\frac{600 \text{ mg/l} \times 12\,000 \mu\text{l}}{100\,000 \text{ mg/l}} = 72 \mu\text{l}$	96 μl

* Tüp dilüsyon testinde 1 tüpe eklenecek olan antibiyotik miktarı

3.5.4. Mikroorganizmaların Ayarlanması

Her bir suş için 3 agar plakası hazırlanmıştır. 3 agar plakasının 4-7 günlük kültürlerinin üzerine %0,1 Tween-20 ile takviye edilmiş yaklaşık 5 ml steril distile su damlatılmıştır. Tek kullanımlık steril eküvyon yardımı ile koloniler ovulmuştur. Daha sonra pipet yardımı ile steril bir tüpün içine alınmıştır. Tüpe alınan numune 15 saniye vortekslenmiştir. Tüpte bulunan numunedan hiflerin uzaklaştırılması için numune, steril bir filtre kağıdı ile süzölmüş ve süzölen numune inokulum olarak steril bir tüpte toplanmıştır. İnokulumun mikrokoniya yoğunluğu 1 McFarland ($2-5 \times 10^7$) olacak şekilde ayarlanmıştır. Nihai inokulumu elde edebilmek için ($2-5 \times 10^6$) süzölen inokulum 1:10 oranında seyreltilmiştir.

Candida türleri için eküvyon yardımı ile mayalar %0,1 Tween-20 ile takviye edilmiş yaklaşık 5 ml steril distile su içerisine alınmıştır. Süzme olmaksızın 0,5-1 McFarland olarak yapılmıştır. İnokulum 1:10 oranında seyreltilerek nihai inokulum hazırlanmıştır. Nihai inokulum, hazırlanan sikloheksimid ve kloramfenikol filtrelenerek eklenmiştir. Tüplerdeki, canlı mikrokoniya ve maya konsantrasyonunu korumak için inokulum süspansiyonunun hazırlanmasından sonraki 30 dakika içinde aşılmalıdır.

3.5.5. Dilüsyon Tüplerine İnokulumların Aşılması

Tüm dilüsyon tüplerine 5 ml'lik besiyeri eklenmiştir. Kullanılacak dezenfektanın çift kat seri dilüsyonlarını hazırlamak için ilk tüpe 5 ml stok çözeltiden eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 5 ml çekilip yandaki tüpe aktarılmış ve pipetaj yapılmıştır. Son iki tüpe kadar geldiğinde pipetajdan sonra 5 ml alınıp atılmıştır. Son iki tüpe stok çözelti eklenmemiştir. Hazırlanan sikloheksimit ve kloramfenikol takviyeli aşı süspansiyonu vortekslenmiş ve derişim yapılan tüplerin hepsine ve antifungal katılmamış tüplerin birisine inokulum süspansiyonundan ml başına 10 µl olacak şekilde 50 µl alınarak aşılanmıştır. Sadece besiyeri bulunan son tüp sterilite kontrol tüpü olacağından aşılanmamıştır. Hazırlanan tüpler, ortam ısında (25-28°C'de) ve etüvde (35-38°C'de) çalkalanmadan inkübe edilmiştir. Tüpler üreme kontrol tüpünde üreme görülene kadar her gün incelenmiştir ve MİK değerleri belirlenmiştir. İnkübasyonun beşinci günde üreme tüpünde her hangi bir büyüme olmaması durumunda test tekrar edilmiştir. MİK değeri belirlenirken oda ısısında ve etüvde inkübe edilen tüplerden en yüksek değere sahip olan derişim MİK değerleri olarak kabul edilmiştir.

3.5.6. Canlılık Kontrolü

Tüplere ekimi yapılan mikrokonidya süspansiyonunun canlılığından emin olmak için 10 µl inokulum süspansiyonu, %0,1 Tween-20 ile takviye edilmiş 2 ml steril distile su içinde seyreltilerek süspansiyon vorteks karıştırıcı ile vortekslenmiştir. Daha sonra bu süspansiyonun 100 µl'si uygun bir SDA agar yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra koloniler sayılana kadar 25°C–28°C'de inkübe edilerek canlılığı kontrol edilmiştir.

3.6. HİPOKLORÖZ ASİTİN TİCARİ KONSANTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

HOCl'nin mantarlar üzerindeki etkinliği için iddia edilen değer %0,02'dir. Toz olarak üretilmeyen HOCl'nin ticari derişimin iki katı olarak konsantrasyon ayarı yapılamamıştır. Bundan dolayı ticari olarak satılan konsantrasyonunun "Time Kill" yöntemi kullanılarak HOCl'nin etkinlik kapasitesi test edilmiştir.

3.6.1. Time-Kill yöntemi

Ticari olarak satılmakta olan HOCl 5 ml'lik olarak 11 suş için ayrı ayrı tüplere hazırlanmıştır. Hazırlanan tüplere tüp dilüsyon yönteminde bahsedildiği gibi hazırlanmış olan inokule edilecek mikroorganizmalardan 50 µl alınıp, 5 ml'lik ticari konsantrasyona pipetaj yapılarak eklenmiştir. Ardından 0, 5, 10, 15, 30 dakika kadar 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bahsi geçen sürelerin her birinde ekimi yapılan tüplerden 20 µl pipet yardımı ile alınarak, SDA besiyerine ekilerek 24-48 saat 37 °C'de en fazla 5 gün inkübe edildikten sonra üreme olup olmadığı kontrol edilerek time-kill yöntemi ile HOCl'nin ticari konsantrasyonunun etkinliği belirlenmiştir.

3.7. MİNİMUM FUNGİSİDAL KONSANTRASYON (MFK)

Antifungal içermeyen SDA plakları ekim için önceden hazırlanmış ve ekilecek derişim plağın üzerinde yazılmıştır. Tüp dilüsyon yönteminin sonucunda MİK değeri olarak belirlendiği tüplerden ve üreme görülmeyen tüp de dahil olmak üzere diğer üreme olmayan tüplerden 10 µl numune alınmıştır. Alınan numuneler daha önceden hazırlanan dezenfektan içermeyen SDA plaklarına konsantrasyonun değeri yazan bölgeye aşılanmıştır ve öze yardımı ile yayılmıştır. Değerlendirme için en fazla 5 günlük hem oda ısısında hem de etüvde inkübasyona bırakılmıştır ve günlük olarak üreme durumu kontrol edilmiştir. Üreme olmayan aşı derişimi MFK olarak belirlenmiştir.

3.8. AKIŞ SİTOMETRİSİ

Akış sitometrisinde test edilecek organizmalar olarak dermatofitlerin hifal yapılarının filtrelenmesine rağmen yeterince uzaklaştırılmamasından ve yanlış sonuç vereceği düşünüldüğünden dolayı onikomikoz etkeni olan fakat hif yapısı içermeyen *Candida* türleri bu metot ile analiz için seçilmiştir. Bu türler üzerinde dezenfektan ve antifungal etkinliği akış sitometrisi ile test edilmiştir. Akış sitometrisi ile yapılacak olan çalışmada onikomikoz etkenlerinin antifungal ve dezenfektanlarla muamelesi sonrasında 0. Saat ve 24. Saatteki öldürme oranı analiz edilmiştir.

3.8.1. Optimizasyon Çalışmaları

Yapılan literatür taramalarının neticesinde çalışmalarımızda kullanılmak için hem canlı hem de ölü mikroorganizmaları boyayan SYTO 9 (Thermo Fisher, A.B.D.) ve sadece ölü mikroorganizmaları boyayan propidyum iyodür (PI) (Thermo Fisher, A.B.D.) boyası seçilmiştir (Vanhauteghem et al 2017). İlk boyama denemesinde SDB içinde antifungal ile öldürülmüş, etanol ile öldürülmüş ve sadece canlı mayalar kullanılmıştır. Besiyeri içinde süspansiyon olan ve boyasız canlı mayalar okutulmuş boyasız mayaların otofloresan düzeyleri saptanmaya çalışılmıştır. Bu ön çalışmalardan sonra bakterilerin 1 ve 2 McFarland ayarı yapıldı ve belli oranlarda dilüe edildi. Cansız mayaların süspansiyonunu hazırlamak için 15-30dk %99.9luk soğuk etanol ile muamele edilmiştir. Daha sonra 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve etanol uzaklaştırılmıştır. Yeniden besiyeri ile süspansiyon edilerek optimum maya yoğunluğunu sağlamak için ölü mayaların bulanıklığı 1 ve 2 McFarland olarak ayarlanarak deneme yapılmıştır.

Başlangıçta bir ölü PI ile boyalı, bir canlı SYTO 9 ile boyalı bir de canlı boyasız olmak üzere 1ml'lik maya süspansiyonu içeren 3 tüp hazırlanarak daha önceki çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlara alikotlanmış boyalardan SYTO 9 (3 mg/ml) ile canlı mayalar ve PI (50 mg/ml) ile ölü mayalar boyanmıştır. PI'nın boyaması katılan oranlar boyaması yeterli bulunurken SYTO 9 boyasının boyaması yetersiz bulunmuştur. SYTO 9'un optimasyonu için 1, 2, 4, 6 ve 10 µl boyalar katılarak boyama serileri yapılmıştır. Bu denemenin neticesinde boyama olmasına rağmen yeterli ışımaya olmadığı görülmüştür. Bunun kullanılan sıvı besiyerinin boyayı maskeleyen ihtimaline dayanarak PBS ile yıkanmış canlı ve ölü maya süspansiyonları hazırlanmıştır.

Aynı zamanda önceden hazırlanmış alikotun ışımaya gücünü kaybettiği optimizasyon çalışmaları sırasında gözlenmiş olup kullanılacak SYTO 9 boyasının konsantrasyonu en baştan ayarlanmıştır. Boyanın satışının yapıldığı sitede bulunan kullanım kılavuzunda (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34854> Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2023) belirtilene göre ökaryotlar için kullanılacak aralıkta olacak şekilde stok konsantrasyon DMSO ile seyreltilmiştir ve 30 dk karanlık ortamda inkübasyonu sağlanmıştır.

SYTO 9 hazırlanırken stoktan (5 mM/ 100 µl) 1 µl alınmış 200 µl DMSO içerisinde çözdürülmüştür. PI hazırlanırken başka çalışmalar için seyreltilmiş stoktan (100 mg/5 ml) 1 µl alınıp 1000 µl distile su içerisinde iyice çözdürülmüştür

SYTO 9 boyasının besiyerinin içinde bulunan bileşenlerden etkilenip etkilenmediğini görmek için PBS ve SDB ortamlarından alınan canlı maya süspansiyonlarından 200 µl her bir ortam için 2 şer tane olacak şekilde ayrı ayrı alındı. PBS'li tüplere ayrı ayrı 2 ve 4 µl olacak şekilde SYTO 9 damlatıldı ve yarım saat inkübasyonun ardından 200 µl PBS eklenerek okutuldu. Aynı yöntem SDB'li tüpler içinde uygulandı. Bu okutmalardan PBS ile yıkanarak 2 µl SYTO 9 kullanılmasının optimum okuma sağladığı görülmüştür.

SYTO 9 da olduğu gibi PI boyasının optimizasyonu için PBS ve SDB cansız maya süspansiyonlarından 200 µl her bir ortam için 2 şer tane olacak şekilde ayrı ayrı alındı. PBS'li tüplere ayrı ayrı 2 ve 4 µl olacak şekilde PI damlatıldı ve yarım saat inkübasyonun ardından 200 µl PBS eklenerek okutuldu. Aynı yöntem SDB'li tüpler içinde uygulandı. Bu okutmalardan PBS'ile yıkanarak 2 µl PI kullanılmasının optimum okuma sağladığı görülmüştür.

Son olarak hem canlı hem cansız mayaların tüp içerisinde karışık halde bulunduğu bir çalışma denenmiştir. Bu çalışma için besiyerinin uzaklaştırıldığı ve PBS ile yıkanmış olarak ayarlanan süspansiyonlar denenmiştir. 200 µl'lik 2 adet canlı, 2 adet ölü, toplam 4 adet canlı ve cansız maya süspansiyonu içeren tüpler hazırlanmıştır. Canlı süspansiyonların içerisine 2 µl SYTO 9, cansız süspansiyonların içerisine 2 µl PI, karışık süspansiyonlardan 2 tüpe hem PI hem de SYTO 9 boyalarından 2 µl katılmıştır ve 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. 2 tüp boyanmamış karışık süspansiyon ölçüm anına kadar beklemiştir. İnkübasyon sonrası her bir tüpe 200 µl PBS eklenmiştir. Ölçümleri yapılmış sırası ile önce canlı, sonra cansız, daha sonra karışık ve en son karışık fakat boyasız mayalar okutulmuş, her bir adımda gerekli kapılama işlemleri ile beraber kompanzasyon ayarı yapılmıştır. Bunun sonucunda optimum ölçümün bu şekilde yapılmasına karar verilmiştir.

Flow sitometri’de kullanıma hazır olarak gerekli oranda sulandırılan boyaların ışıktan koruyarak +4-8 °C’ de saklansa bile 14 günün sonunda floresan özelliklerinin kaybolduğu görülmüştür. Bu nedenle her çalışmadan önce -20°C’de alikotlanmış kullanıma hazır boyalar çözündürülüp sulandırılarak çalışılmasına karar verilmiştir.

3.8.2. *Candida albicans* Ve *Candida parapsilosis* Türleri Üzerindeki Antifungal Etkinliğin Akış Sitometrisi Yöntemi İle Gösterilmesi

Yapacağımız flow sitometrik çalışma FACS Calibur flow sitometri cihazı (Becton Dickinson, A.B.D.) ile yapılmıştır. OCT-D (1000 mg/l) ve HOCl (200 mg/l) için ticari konsantrasyonda Terbinafin için yapılan çalışmalarda türe özgü MFK olduğu düşünülen (64 mg/l ve 32 mg/l) konsantrasyonlarda birer tüp hazırlanmıştır (Yücel ve Kantarcıoğlu 2003, Sakarya, Günay, Öztürk ve Ertuğrul 2013, <https://www.ataman-chemicals.com/urunler/oktenidin-dihidroklorur-519.html> Erişim tarihi: 4 Mart 2023) Bu tüpler 3 ml besiyeri ve araştırılan antifungal konsantrasyonunu içermektedirler. Aynı zamanda her bir antifungal için bir üreme kontrol bir sterilizasyon kontrol tüpü hazırlanmıştır.

Her 1 ml’lik besiyeri için 1-1,5 McFarland mikroorganizma süspansiyonu ayarlanıp 10 µL alımp tüplere ekimi yapılmıştır. Ekimin yapılmasının ardından 0. saatteki ölçümler için süspansiyonlardan 1 ml alınmış ve önceden hazırlanan okuma tüplerine aktarılmıştır. Kalan süspansiyon 5 ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Alınan 1 ml’lik hücre süspansiyonu 4000 rpm’de 20 dk santifüjün ardından 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan tüplere 2 µl SYTO 9 boyası, 2 µl PI boyası eklenmiştir. Karanlık ortamda 15-30 dk inkübasyonda bekletilerek mayaların boyanması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra flow sitometri ile okuma aşamasına geçilmiştir. İşlemler 5. ve 24. saatte tekrarlanmıştır.

Floresan boyalar için kullanılan uyarma/emisyon maksimum SYTO 9 için 480/520 nm ve propidyum iyodür için 500/640 nm olarak ayarlanmıştır. SSC-A/FITC-A kanallarında maya süspansiyonları okutulmuştur. İlk önce hazırlanmış olan üreme

kontrol tüpü okutulmuştur. Bu tp pozitif kontrol olarak kullanılmış olup, kapılama işlemi bu okumadan çıkan dot blot görüntüsüne göre yapılmıştır. Kapılama yapılan alanda kontrol tüpü ile antibiyotik içeren tüpler FITC-A grafiğinde üst üste getirilerek karşılaştırılmıştır. Bu veriler FACS comb programı ile analiz edilmiştir. Kullanılacak SYTO 9 ile boyanmış görünen kısım tüm bakterilerin sayısını göstermekte iken PI boyası ise sadece l bakterilerin sayısını göstermektedir. Antifungal ile muamele edilen mayaların, muamele edildikleri antifungale göre zamana bağlı ölümünün kıyaslaması PI boyanın tutulumuna bağlı olarak analiz edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu çalışmada, T.C. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi kültür koleksiyonunda bulunan 11 adet onikomikoz etkeni kullanılarak dezenfektanlara karşı oluşturdukları MİK değerleri ve dezenfektanların canlılık üzerine etkisi incelenmiştir.

SDA besiyerine ekimi yapılan dermatofitlerin ve onikomikoz etkenlerinin makroskobik incelenmesinde koloninin üreme hızı, yüzey görünümü, yüzey rengi ve taban rengi gibi özellikler değerlendirilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra 24 ± 2 ve 37 ± 1 °C olmak üzere iki ortamda inkübasyon eş zamanlı yapılmış olup oda ısısı ortamında bulunan etkenlerin daha hızlı büyüdüğü gözlemlenmiştir. Ekimi yapılan numunelerin kaçınıcı günde üredikleri ve görüntüleri hakkındaki bilgiler **Tablo 3**'de belirtilmiştir.

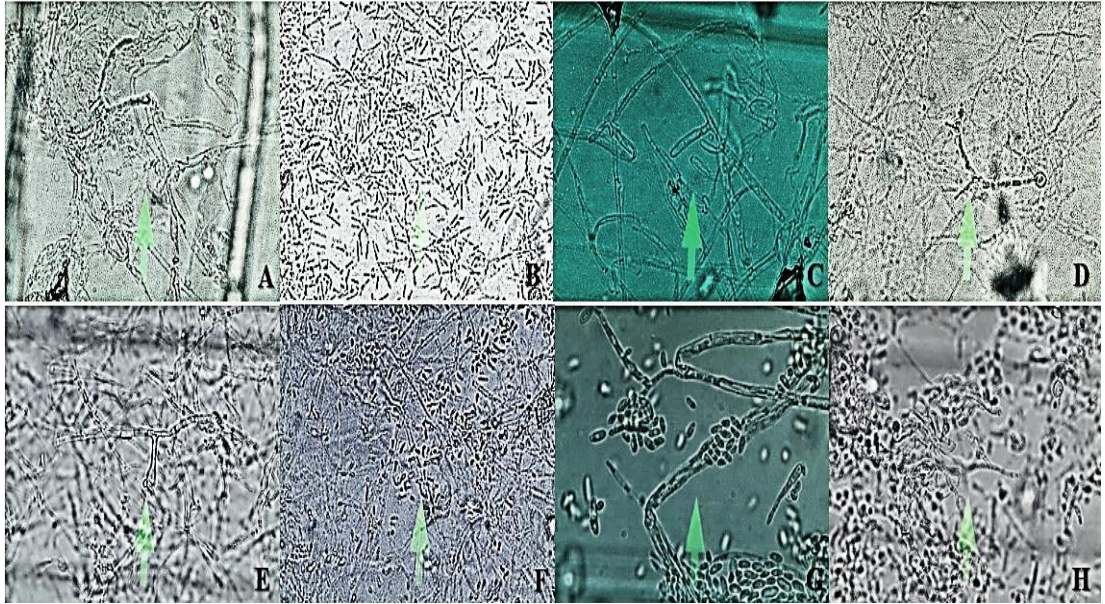
Tablo 3. Suşların SDA besiyerinde üreme bilgileri ve görünümleri

Suş Numarası	Üreme Zamanı	Plağın Alttan Görünümü*	Plağın Üstten Görünümü*
1	2. gün	Sarı genişleyen görünüm	Beyaz pamuksu kabarık ortası çökük koloni.
2	2. gün	Sarı genişleyen görünüm	Beyaz pamuksu kabarık olmayan ortası çökük koloni.
3	2. gün	Sarıdan turuncuya dönen görünüm	Beyaz pamuksu kabarık koloni
4	3. gün	Turuncu renk görünüm	Yumurta görünümünde ortası turuncu çevresi beyaz pamuksu koloni
5	2. gün	Sarıdan kahverengiye dönen görünüm	Beyaz kabarık olmayan pamuksu koloni
6	3. gün	Sarı genişleyen kırışık görünüm	Beyaz koloni devetüyü görünüm
7	3. gün	Sarı genişleyen görünüm	Beyaz devetüyü görünümlü besiyerini kaldıran koloni
8	1. gün	Kahverengi/turuncu görünüm pembe-turuncu pigment	Kabarık olmayan kıvrımlı hifli besiyerini kaldıran koloni
9	1 gün	Kırışık yeşil-beyaz dalgalı görünüm	Siyah renkte kabarık bol sporlu görünüm
10	1. gün	Krem rengi görünüm	Buruşuk kıvrımlı koloniler
11	1. gün	Krem rengi görünüm	Beyaz, kremi, parlak ve düz koloniler

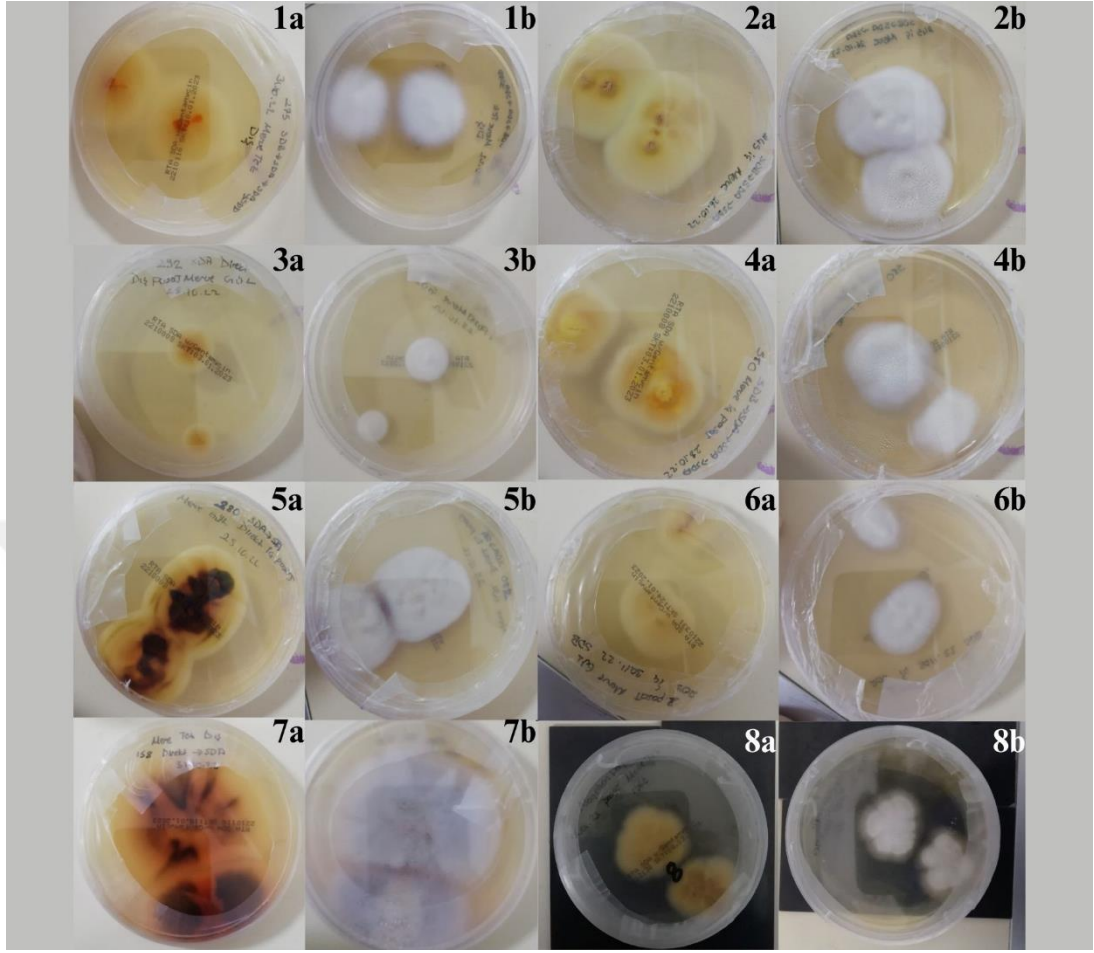
* Üremeden 5-7 gün sonra olgun kolonilerin değerlendirilmesi

Dermatofit etkenleri ortalama 2. günde net bir koloni oluşturmakta oldukları gözlenmiştir. Hif yapısı oluşturan etkenlerin üstten beyaz pamuksu kadifemsi bir görünüm sergiledikleri alttan görünümünde ise genellikle kahverengi turuncu renkler sergilediği görülmüştür.

Çalışmada kullanılacak suşların doğruluğundan emin olmak için 6 günlük kolonilerden örnek alınarak LPM boya ile boyanarak, makro ve mikrokonyumları varlığı saptanmıştır. Bu sayede mikroskobik olarak isimlendirilmiştir. **Resim 1**'de bazı dermatofit etkenlerinin olgun kolonilerinden alınan mikroskobik görüntüleri verilmiştir. **Resim 2**'de dermatofit etkenlerinin olgun kolonilerinin görünümü verilmiştir.



Resim 1. Onikomikozun birincil etkenlerinin LPM boya ile hif, makrokonyumları ve mikrokonyumları. **Resim 1 (A)** *Trichphyton tonsurans*; **Resim 1 (B)** *Trichphyton erinaceii*; **Resim 1 (C)** *Microsporum gypseum*; **Resim 1 (D)** *Microsporum nanum*; **Resim 1 (E)** *Trichphyton rubrum*; **Resim 1 (F)** *Microsporum canis* **Resim 1 (G)** *Fusarium Soloni* kompleksi, **Resim 1 (H)** *Trichphyton violaceum*



Resim 2. Onikomikozun birincil etkenlerinin SDA besiyerindeki olgun kolonilerinin besiyerinin üstünden ve altından (zemininden) görünüşleri. **Resim 2 (1a)** *Trichphyton tonsurans* 'ın alttan görünümü; **Resim 2 (1b)** *Trichphyton tonsurans* 'ın üstten görünümü; **Resim 2 (2a)** *Trichphyton erinaceii* 'nin alttan görünümü; **Resim 2 (2b)** *Trichphyton erinaceii* 'nin üstten görünümü; **Resim 2 (3a)** *Microsporium gypseum* 'un alttan görünümü; **Resim 2 (3b)** *Microsporium gypseum* 'un üstten görünümü; **Resim 2 (4a)** *Microsporium nanum* 'un alttan görünümü; **Resim 2 (4b)** *Microsporium nanum* 'un üstten görünümü; **Resim 2 (5a)** *Trichphyton rubrum* 'un alttan görünümü; **Resim 2 (5b)** *Trichphyton rubrum* 'un üstten görünümü; **Resim 2 (6a)** *Microsporium canis* 'in alttan görünümü; **Resim 2 (6b)** *Microsporium canis* 'in üstten görünümü; **Resim 2 (7a)** *Fusarium Soloni kompleks* 'in alttan görünümü; **Resim 2 (7b)** *Fusarium Soloni kompleks* 'in üstten görünümü, **Resim 2 (8a)** *Trichphyton violaceum* 'un alttan görünümü, **Resim 2 (8b)** *Trichphyton violaceum* 'un üstten görünümü.

Mikroskopik isimlendirme yapılırken “Medically Important Fungi: A Guide to Identification” kaynağından faydalanılmıştır (Larone 1987). Ardından MALDI-TOF MS ile kesin isimlendirmeleri yapılmıştır. Mikroskopik olarak ayırım yaparken *Fusarium* türü yanlış isimlendirilmiş olup otomatize sistem ile doğru isimlendirilmiştir. Bu durum otomatize sistemle doğrulamanın önemini göstermektedir. Bu iki yöntemin karşılaştırılabilir sonuçları ve tür bazında sınıflandırmalar **Tablo 4**’de belirtilmiştir.

Tablo 4. Suşların tanınmasında kullanılan yöntemlerin kıyaslanması

İzolat Numarası	Laktofenol Pamuk Mavisi ile mikroskopik tanılama	MALDI-TOF MS ile tanılama
1	<i>Trichphyton spp</i>	Tanılama yapılamamıştır
2	<i>Trichphyton spp</i>	<i>T. erinaceii</i>
3	<i>Microsporum spp</i>	<i>M. gypseum</i>
4	<i>Microsporum spp</i>	Tanılama yapılamamıştır
5	<i>Trichphyton spp</i>	<i>T. rubrum</i>
6	<i>Microsporum canis</i>	<i>M. canis</i>
7	<i>Trichphyton spp</i>	<i>T. violaceum</i>
8	<i>Trichphyton spp</i>	<i>Fusarium solani complex</i>
9	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
10	<i>Candida albicans*</i>	<i>C. albicans</i>
11	<i>Candida spp.**</i>	<i>C. parapsilosis</i>

*germ tüp testi (+); **germ tüp testi (-)

MALDI-TOF MS ile tanılama için cihazın kendi matriksinin yetersiz okuma sergilemesinden dolayı alternatif matriksler ve proteinlerin açığa çıkması için kullanılan kimyasallar farklı konsantrasyonda kullanılarak 48 farklı yöntem denenmiştir. MALDI-TOF MS ile tanılama için farklı iki matriks denenirken cihazın okuyamadığı dördüncü izolat *M.nanum* olarak bulunmuş olup tüm identifikasyon denemelerine rağmen, cihazın okuyamadığı birinci izolat mikroskopik görüntüsüne göre *T.tonsurans* olarak isimlendirilmiştir. Denenen matrikslerin 11 organizma için elde edilen sonuçları **Tablo 5**’de belirtilmiştir.

Tablo 5. MALDI-TOF MS ile tanımlama için yapılan alternatif matrisler ve cihaz matrisinin kıyaslanması

<i>Kimyasallar</i>							
<i>Yöntem</i>	Etanol	Formik asit	Asetonitril	Cihaz Matrisi	Matris 1	Matris 2	Okuma durumu
1. yöntem	%70'lik 900µl	%70'lik 40µl	40 µl	1 µl	-	-	5/11
2. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	1 µl	-	-	5/11
3. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	1 µl	-	-	8/11
4. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	1 µl	-	-	7/11
5. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	1 µl	-	-	8/11
6. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	1 µl	-	-	8/11
7. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	1 µl	-	-	8/11
8. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	1 µl	-	-	8/11
9. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	2 µl	-	-	6/11
10. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	2 µl	-	-	7/11
11. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	2 µl	-	-	7/11
12. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	2 µl	-	-	8/11
13. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	2 µl	-	-	8/11
14. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	2 µl	-	-	8/11
15. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	2 µl	-	-	8/11
16. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	2 µl	-	-	8/11
17. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	1 µl	-	4/10
18. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	1 µl	-	3/11
19. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	1 µl	-	2/11
20. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	1 µl	-	7/11
21. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	1 µl	-	5/11
22. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	1 µl	-	7/11
23. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	1 µl	-	6/11
24. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	1 µl	-	5/11
25. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	2 µl	-	1/11
26. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	2 µl	-	6/11
27. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	2 µl	-	5/11
28. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	2 µl	-	8/11
29. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	2 µl	-	6/11
30. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	2 µl	-	7/11

Tablo 5. MALDI-TOF MS ile tanımlama için yapılan alternatif matrisler ve cihaz matrisinin kıyaslanması (devamı)

31. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	2 µl	-	1/11
32. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	2 µl	-	8/11
33. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	-	1 µl	6/10
34. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	-	1 µl	6/11
35. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	-	1 µl	7/11
36. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	-	1 µl	9/11
37. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	-	1 µl	7/11
38. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	-	1 µl	7/11
39. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	-	1 µl	8/11
40. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	-	1 µl	9/11
41. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	-	2 µl	7/11
42. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	-	2 µl	8/11
43. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	40 µl	-	-	2 µl	8/11
44. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	40 µl	-	-	2 µl	9/11
45. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	-	2 µl	9/11
46. yöntem	%70'lik 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	-	2 µl	9/11
47. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 60µl	60 µl	-	-	2 µl	9/11
48. yöntem	%99,9'luk 900 µl	%70'lik 40µl	60 µl	-	-	2 µl	9/11

Cihazın asıl matrisi, matris 1 ve matris 2 denendiğinde en optimal okuma için protokole belirtilenin 2 katı matris bulunduğu daha iyi sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir. En iyi okumaların ise matris 2 ile denenen yöntemler sonucunda alındığı görülmüştür. MALDI-TOF MS ile 11 suşun okutulmasına dayalı yapılan çalışmanın sonucunda cihaz matrisi yaklaşık %72'lik okuma sağlarken hazırlanan matris 1 %10-36 arası okuma göstermiştir ve hazırlanan matris 2'nin okuma oranı yaklaşık %81,8 olarak bulunmuştur.

EUCAST standartlarında mantarlar için kullanılan standart agar dilüsyon metodu bulunmamasından dolayı bir standarda bağlı kalmamıştır. Değerlendirmeler kontrol plağında üreme görüldüğünde (2. gün) ve beşinci günde yapılmıştır. Onikomikoz etkenleri kullanılarak farklı dilüsyonlarda ki dezenfektanlar ve antifungal ile yapılan çalışmada bulunan MİK değerleri **Tablo 6**, **Tablo 7** ve **Tablo 8**'de belirtilmiştir.

Tablo 6. Onikomikoz etkenlerinin OCT-D dezenfektanı için agar dilüsyon ile MİK değerleri

İzolatların İsimleri	MİK Dağılımları (mg/l)					
	1000	500	250	125	62,5	31,25
1. <i>T. tonsurans</i>	-	-	-	-	-	-
2. <i>T. erinaceii</i>	-	-	-	-	-	-
3. <i>M. gypseum</i>	-	-	-	-	+	+
4. <i>M. nanum*</i>	-	-	-	-	-	-
5. <i>T. rubrum</i>	-	-	-	-	-	-
6. <i>M. canis</i>	-	-	-	-	-	-
7. <i>T. violaceum</i>	-	-	-	-	-	-
8. <i>Fusarium solani complex</i>	-	-	+	+	+	+
9. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+	+	+
10. <i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
11. <i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	+	+

(+): üreme mevcut; (-): Üreme yok

*Üreme süresi geç olduğundan 5 günden fazla bekletildi.

Tablo 7. Onikomikoz etkenlerinin HOCl dezenfektanı için agar dilüsyon ile MİK değerleri

Suşların İsimleri	MİK Dağılımları (mg/l)					
	128	64	32	16	8	4
1. <i>T. tonsurans</i>	-	-	-	-	+	+
2. <i>T. erinaceii</i>	-	-	-	+	+	+
3. <i>M. gypseum</i>	-	-	+	+	+	+
4. <i>M. nanum*</i>	-	-	-	-	-	+
5. <i>T. rubrum</i>	-	-	-	+	+	+
6. <i>M. canis</i>	-	-	+	+	+	+
7. <i>T. violaceum</i>	-	-	-	+	+	+
8. <i>Fusarium solani complex</i>	+	+	+	+	+	+
9. <i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+
10. <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+
11. <i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+

(+): üreme mevcut; (-): Üreme yok

*Üreme süresi geç olduğundan 5 günden fazla bekletildi.

Tablo 8. Onikomikoz etkenlerinin Terbinafin için agar dilüsyon ile MİK değerleri

Suşların İsimleri	MİK Dağılımları (mg/l)				
	0,064	0,032	0,016	0,008	0,004
1. <i>T. tonsurans</i>	-	-	+	+	+
2. <i>T. erinaceii</i>	-	-	-	+	+
3. <i>M. gypseum</i>	-	-	+	+	+
4. <i>M. nanum*</i>	-	+	+	+	+
5. <i>T. rubrum</i>	-	-	+	+	+
6. <i>M. canis</i>	-	-	+	+	+
7. <i>T. violaceum</i>	-	-	-	+	+
	32	16	8	4	2
8. <i>Fusarium solani complex</i>	+	+	+	+	+
9. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	+	+	+
10. <i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
11. <i>C. Parapsilosis</i>	-	+	+	+	+

(+): üreme mevcut; (-): Üreme yok
*Üreme süresi geç olduğundan 5 günden fazla bekletildi.

Agar dilüsyon testlerinin sonucunda OCT-D'nin ticari konsantrasyonun çok altında bir derişimde bile öldürücü etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. HOCl'nin ticari konsantrasyonun (200 ppm) seyreltilmesi ile yapılan agar dilüsyon testinde birincil etkenlerin daha az konsantrasyonda ölüyorken ikincil etkenlerin (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* ve *Candida spp.*) bu konsantrasyonlarda gelişebildiği görülmüştür. Terbinafinde yapılan teste kılavuzda verilen değer aksine 2 ve 8. suşların dışındaki tüm suşlar için MİK 0,016 mg/l'den fazla bulunmuştur.

Tüp dilüsyon değerlendirmeleri EUCAST E.Def 11.0 de belirtilen şekilde üreme kontrol tüplerinde üreme başladığında yapılmış olup, üreme olmaması durumunda en geç beşinci güne kadar beklenmiştir. Kontrolde hala üreme olmaması durumunda test tekrar edilmiştir (Arendrup et al 2021). OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungalı ile yapılan tüp dilüsyon testlerinin SDB ve RPMI 1640 besiyerindeki tüm suşlar için MİK değer aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri sırasıyla **Tablo 9** ve **Tablo 10**'da gösterilmiştir.

Tablo 9. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungalı için SDB’de yapılan tüp dilüsyon testlerinin tüm suşlar üzerindeki MİK değer aralıkları

TÜR	MİK	OCT-D (mg/l)	HOCl (mg/l)***	Terbinafin (mg/l)**
1. <i>T. tonsurans</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,016
	MİK 90	< 31.25	128	0,032
2. <i>T. erinaceii</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,008
	MİK 90	< 31.25	64	0,016
3. <i>M. gypseum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,016
	MİK 90	< 31.25	64	0,032
4. <i>M. nanum*</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,032
	MİK 90	< 31.25	64	0,064
5. <i>T. rubrum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,016
	MİK 90	< 31.25	128	0,032
6. <i>M. canis</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,008
	MİK 90	< 31.25	128	0,016
7. <i>T. violaceum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,008
	MİK 90	< 31.25	64	0,016
8. <i>Fusarium solani complex</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	>32
9. <i>Aspergillus niger</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	4
	MİK 90	< 31.25	>128	8
10. <i>C. albicans</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	>32
11. <i>C. parapsilosis</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	16

“-“ Üreme gözlemlenmedi. Test edilen değerden daha düşük.

**M. nanum* sıvı besiyerinde geç ürediği için 5. güne kadar üremesi beklenmiştir.

** Literatürde MİK değeri belirtilenler suşların MİK aralığı belirtilene göre ayarlanıp test edilmiştir.

*** Ticari derişimin, MIC >128 olan suşlar üzerindeki etkisinin belirlenmesi için time-kill testi yapılmıştır.

Tablo 10. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungalı için RPMI 1640’da yapılan tüp dilüsyon testlerinin tüm suşlar üzerindeki MİK değer aralıkları

TÜR	MİK	OCT-D (mg/l)	HOCl (mg/l)***	Terbinafin (mg/l)**
1. <i>T. tonsurans</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,016
	MİK 90	< 31.25	128	0,032
2. <i>T. erinaceii</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,008
	MİK 90	< 31.25	64	0,016
3. <i>M. gypseum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,016
	MİK 90	< 31.25	64	0,032
4. <i>M. nanum*</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,032
	MİK 90	< 31.25	64	0,064
5. <i>T. rubrum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,016
	MİK 90	< 31.25	128	0,032
6. <i>M. canis</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	64	0,008
	MİK 90	< 31.25	128	0,016
7. <i>T. violaceum</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,004
	MİK 50	-	32	0,008
	MİK 90	< 31.25	64	0,016
8. <i>Fusarium solani complex</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	>32
9. <i>Aspergillus niger</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	4
	MİK 90	< 31.25	>128	8
10. <i>C. albicans</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	>32
11. <i>C. parapsilosis</i>	MİK aralığı	1000 – 31.25	128-4	32-2
	MİK 50	-	-	-
	MİK 90	< 31.25	>128	16

“-“ Üreme gözlemlenmedi. Test edilen değerden daha düşük.

**M. nanum* sıvı besiyerinde geç ürediği için 5. güne kadar üremesi beklenmiştir.

** Literatürde MİK değeri belirtilenler suşların MİK aralığı belirtilene göre ayarlanıp test edilmiştir.

*** Ticari derişimin, MİK >128 olan suşlar üzerindeki etkisinin belirlenmesi için time-kill testi yapılmıştır.

Yapılan tüp dilüsyon testlerinde OCT-D’nin dermatofitler için de onikomikozun ikincil etkenleri için de 31,25 mg/l’nin daha altında bir konsantrasyon olarak gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bu değer ticari konsantrasyonun (%0,1) çok altında bir değer olarak bulunmuştur. HOCl ile yapılan tüm tüp dilüsyon testinin sonucunda birincil dermatofit etkenleri için üç suşun 128 mg/l’lik MİK değerine sahipken dört suşun 64 mg/l’lik MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. HOCl’nin dermatofit dışı

etkenler için MİK değerinin 128 mg/l'den daha fazla olduğu görülmüştür. Terbinafin için yapılan MİK değerlendirmesi sonucunda birincil dermatofit etkenleri için bir suşun 0.064 mg/l, üç suşun 0,032 mg/l ve 3 suşun 0.016 mg/l değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Dermatofit dışı etkenler için iki suşun 32 mg/l'den fazla diğer suşların 16 mg/l ve 8 mg/l MİK değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Değerlendirmede SDB veya RPMI 1640 Broth besiyerlerinden alındığı fark etmeksizin en yüksek derişimdeki MFK değeri not alınmıştır. Bu değerlendirme sonucunda üreme durumuna bağlı olarak elde edilen MFK değer aralıkları ve MFK değerleri **Tablo 11**'de belirtilmiştir.

Tablo 11. OCT-D, HOCl dezenfektanları ve Terbinafin antifungalı için yapılan MFK ve time kill testlerinin sonuçları.

TÜR	MFK	OCT-D (mg/l)	HOCl (mg/l veya dk)	Terbinafin (mg/l)
1. <i>T. tonsurans</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,032
	MFK 90	-	128	0,032
2. <i>T. erinaceii</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,016
	MFK 90	-	64	0,016
3. <i>M. gypseum</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,032
	MFK 90	-	64	0,032
4. <i>M. nanum</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,032
	MİK 90	-	64	0,064
5. <i>T. rubrum</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,032
	MİK 90	-	>128*	0,032
6. <i>M. canis</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,016
	MFK 90	-	>128*	0,016
7. <i>T. violaceum</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	128-4	0,064-0,016
	MFK 90	-	64	0,016
8. <i>Fusarium solani complex</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	200	32-16
	MFK 90	62,5	5.dk	>32
9. <i>Aspergillus niger</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	200	32-8
	MFK 90	-	10.dk	16
10. <i>C. albicans</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	200	32-16
	MFK 90	-	5.dk	>32
11. <i>C. parapsilosis</i>	MFK aralık	1000 – 31.25	200	32-16
	MFK 90	-	5.dk	16

“-“ Üreme gözlemlenmedi. Test edilen değerden daha düşük.

* time kill testinde 10.dk'lık muamele sonucunda tamamen öldüğü kaydedilmiştir.

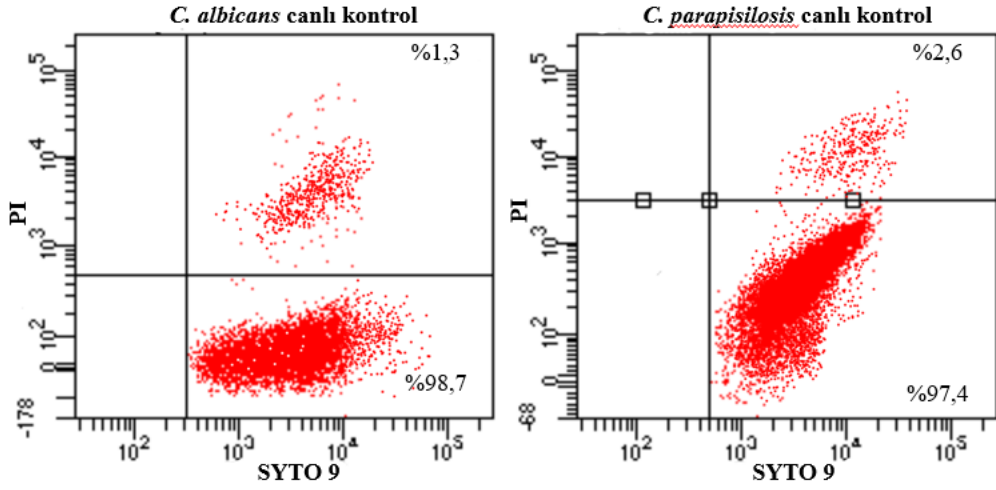
OCT-D için yapılan MFK testinde hiçbir konsantrasyonda üreme görülmezken HOCl için yapılan MFK testlerinde çoğu suş için MİK değerlerinin aynı zamanda MFK değeri oldukları görülmüştür. Bu suşlardan 5. ve 6. suşların ise MİK değerinin daha üst konsantrasyonun MFK olduğu görülmüştür. Time-kill tekniği kullanılarak yapılan değerlendirmede 10. dk'dan sonra hiçbir üreme görülmemiştir. Terbinafin için MFK değerlerinin MİK değerleri ile aynı olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada kullanılan akış sitometri yöntemi, *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* suşlarının dezenfektanların ticari konsantrasyonlarının ve terbinafin antifungal için literatürde belirtilen MİK değeri ile muamelesinin ardından canlılık tayini için 0. saat ve 5. saatteki sonuçları aşağıda belirtilmiştir. 24. saate yapılan ölçümlerin 5. saate yapılan ölçümler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Akış sitometrisi ile yapılan analizden elde edilen canlı ve ölü hücre oranları **Tablo 12**'de verilmiştir. Üreme kontrol tüplerinin analizinden oluşan grafikler **Şekil 1**'de verilmiştir.

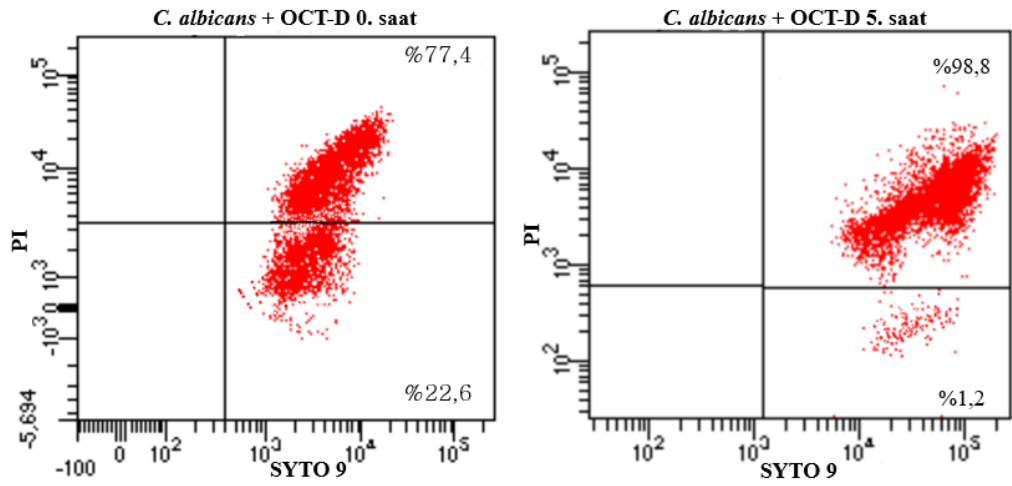
Tablo12. Akış sitometrisi ile yapılan analizinden elde edilen canlı ve ölü hücre oranları

Test Edilen Dezenfektan ve Antifungal	Saat Tür	Canlılık Kontrol		0.Saat		24. Saat	
		%Canlı	%Ölü	%Canlı	%Ölü	%Canlı	%Ölü
OCT-D	<i>Candida albicans</i>	98.7	1.3	22.6	77.4	1.2	98.8
HOCl				20.3	79.7	1.6	98.4
Terbinafin				86	5	24.6	75.4
OCT-D	<i>Candida parapsilosis</i>	97.4	2.6	14.8	85.2	1.1	98.9
HOCl				12.7	87.3	1.7	98.3
Terbinafin				75.5	24.5	27.6	72.4

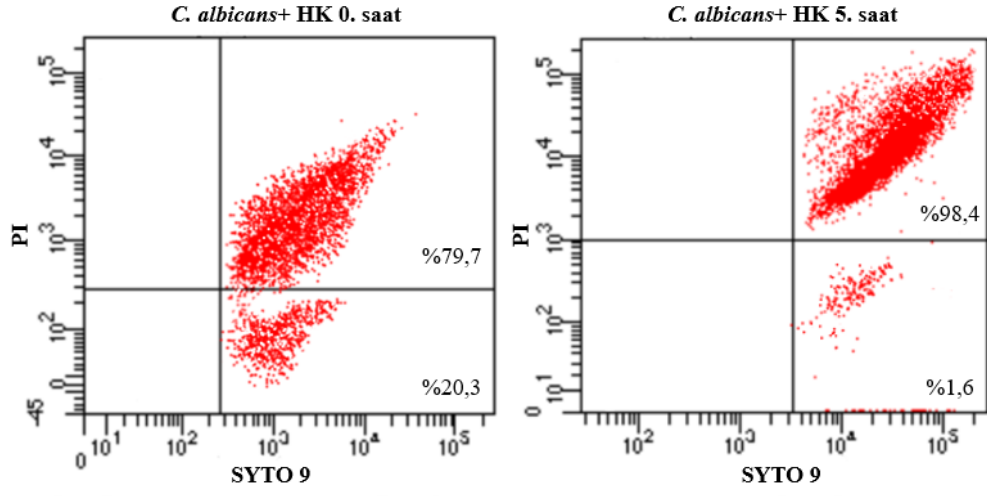


Şekil 1. *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* suşlarının üreme kontrol tüplerinin canlılık analizi

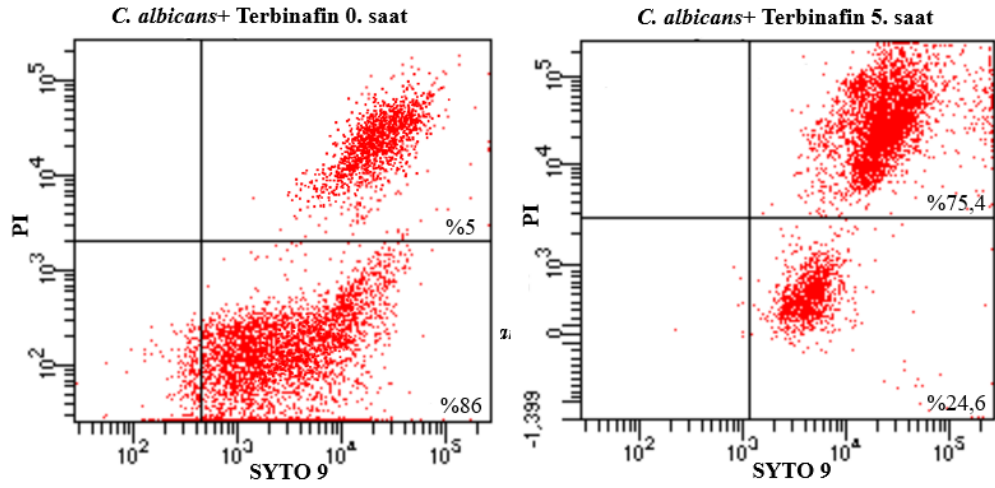
Candida albicans suşunun dezenfektanlar ve terbinafin ile muamelesinin ardından FCM analizi sonucunda oluşan grafikler **Şekil 2**, **Şekil 3** ve **Şekil 4**'te gösterilmektedir.



Şekil 2. *Candida albicans* suşunun OCT-D (1000 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

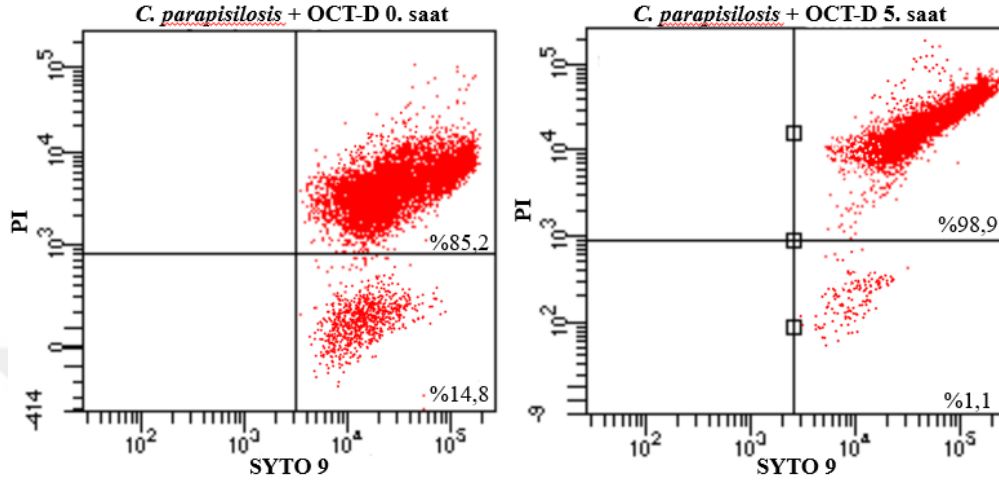


Şekil 3. *Candida albicans* suşunun HOCl (200 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

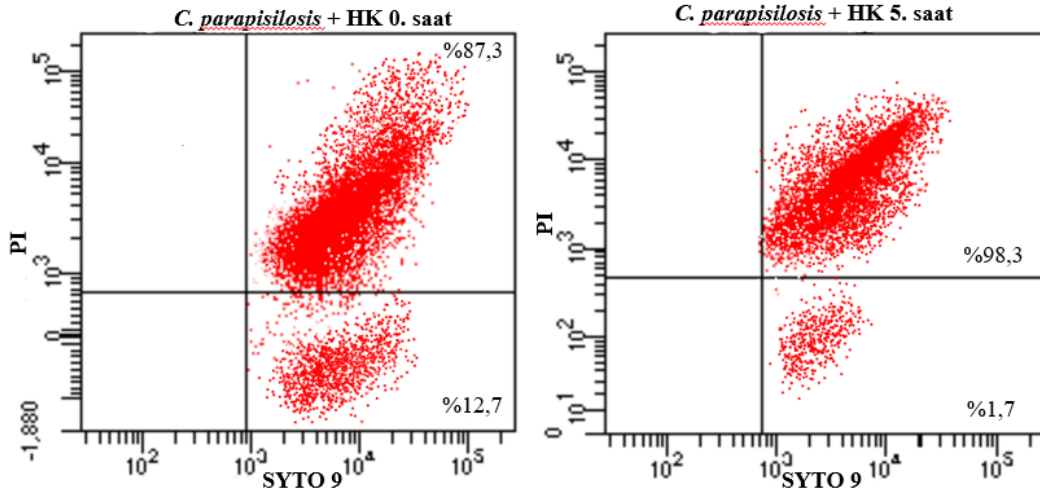


Şekil 4. *Candida albicans* suşunun Terbinafin (64 mg/l) antifungalı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

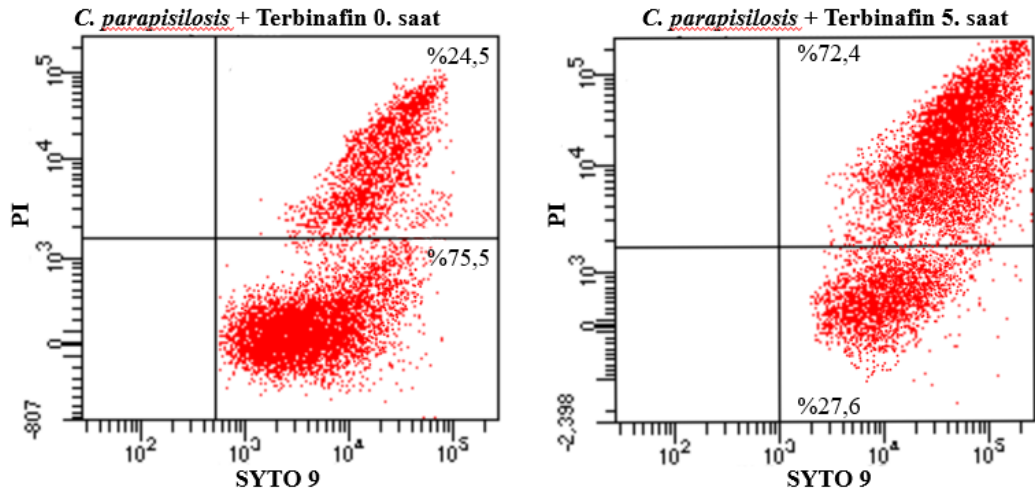
Candida parapsilosis suşunun dezenfektanlar ve terbinafin ile muamelesinin ardından FCM analizi sonucunda oluşan grafikler Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7’de gösterilmektedir.



Şekil 5. *Candida parapsilosis* suşunun OCT-D (1000 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi



Şekil 6. *Candida parapsilosis* suşunun HOC1 (200 mg/l) dezenfektanı ile muamelesi sonrası canlılık analizi



Şekil 7. *Candida parapsilosis* suşunun Terbinafin (16 mg/l) antifungalı ile muamelesi sonrası canlılık analizi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mantarların üreme sürecinin çok meşakkatli olması ve yapılan çalışmalarda bu üreme süresinin uzun olmasından dolayı antifungal etkinliklerinin araştırılması da uzun sürmektedir. Mantarların oluşturduğu hastalıkların epidemiyolojik durumu ve antifungallere karşı geliştirdiği direnç miktarı bölgesel olarak değişmektedir (Dogan 2020, Gül and Çiftci 2022). Tedavi sürecinin uzun olması, hastaların tedaviye uyum sağlayamaması, ilaç ilaç etkileşimleri gibi sebeplerden dolayı alternatif olarak hızlı, düşük maliyetli ve kısa süreli antifungal tedavi yöntemleri aranmaktadır (Singal and Khanna 2011, Gül and Çiftci 2022). Yaptığımız çalışmada araştırdığımız dezenfektanlar bu durum için aday olan maddeler olmasından dolayı seçilmiştir.

Kültürler genellikle 20-25 °C'de inkübe edilebildiği gibi *Trichophyton verrucosum* gibi bazı türler için daha yüksek inkübasyon sıcaklıkları (35–37 °C) kullanılabilir. Optimal büyüme için gerekli olan süre, türe göre değişebilmektedir. Birçok dermatofit ikinci günde üremeye başlamış olsada test edilebilir veya incelenebilir boyutlara gelmesi 4 haftayı bulabilmektedir (Morris, Byrne, Madden and Reller 1996). Rezusta ve ark. (Rezusta et al 2016), 17 günlük bir inkübasyon süresinin izolatların %98,8'ini okuyabilmek veya çalışabilmek için yeterli olduğunu ve tekniği daha etkili hale getirebileceğini söylemektedir. Yaptığımız çalışmada tanılama için farklı ortam ısılarında yeterli olgunluğa ulaşmış olan ortalama 8-9 günlük koloniler kullanılmıştır. 8-9 günlük kolonilerin de tanılama yaparken yeterli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda onikomikoz etkenlerinin 36- 37 °C'lik etüvde de üreyebileceği görülmüştür.

Geleneksel mikroskopik yöntemle dermatofit tanımlamasının, selofan bant ile alınan numune miktarı, kullanılan boya miktarı ve morfolojik ayrımın genellikle karmaşık ve zahmetli olmasından dolayı inceleme yapabilecek olan tecrübeli personel ihtiyacı gibi durumlardan ötürü zor olduğu bildirilmiştir (Shamly, Kali, Srirangaraj and Umadevi 2014). Çalışmamızda kültür ortamında büyüyen hifli mantarlar LPM boyama ile isimlendirilerek önce cins düzeyinde tanılama yapılmıştır. Daha sonra MALDI-TOF-MS kullanılarak tür düzeyinde isim verilmiştir.

Güncel araştırma yöntemi olan MALDI-TOF MS mikroorganizma tanımlamanın doğruluğu, hızı, nispeten düşük maliyeti ve rutin laboratuvarlara basit entegrasyonundan kaynaklı kullanılmaktadır ve tür düzeyinde tanılama yapabilmektedir (Fissel, Serrell, Memon and Zhang 2022, L'Ollivier and Ranque 2017). Yapılan bir çalışmada MALDI-TOF MS'in dermatofitleri tanımlama performansı hakkındaki çalışmalarına bağlı olarak okuma performansının %13,5 ile %100 arasında değişmekte olduğu söylenmiştir (L'Ollivier and Ranque 2017). Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere MALDI-TOF MS hızlıda olsa tür düzeyinde tanılama yaparken kullandığı kütüphanenin yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Bundan dolayı mikroskobik olarak cins düzeyinde isimlendirmeden vazgeçilmemesini önermişlerdir (Fissel et al 2022). Mikroskobik inceleme tecrübeli personel gerektirmesi ve ayrımların görsel olarak yapılmasının zor olmasından kaynaklı yanlış sonuçlar verilebilmektedir. Bunun yanı sıra mikroskopi ile yaptığımız isimlendirmede oluşabilecek hataları MALDI-TOF MS gibi otomatize sistemler aracılığı ile kontrol ederek doğru sonuç verilmesi sağlanabilir. Bunun için otomotize sistemleri daha güvenilir ve doğru sonuç veren sistemler haline getirecek yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Azrad, Freidus, Kassem ve Peretz (2019) farklı protokoller ile yaptıkları çalışmanın sonucunda klasik protokolle yaptıkları çalışmalara nazaran %100 okuma artışı olduğunu bulmuşlardır. Luethy ve Zelazyn (2018) yaptıkları çalışmada, Lau ve arkadaşlarının bahsettiği rutin yöntem (Lau, Drake, Calhoun, Henderson and Zalazny 2013), hızlı yöntem A solüsyonu (%50 asetonitril, %35 formik asit (%70), %15su) ve hızlı yöntem B solüsyonu (%50 asetonitril, %50 formik asit (%70)) yöntemlerini kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada küf mantarlarının MALDI-TOF MS ile identifikasyonunu denemişlerdir. Bu çalışmada klinik izolatların 57'si (%53,7) rutin yöntem kullanılarak raporlama düzeyinde ($\geq 2,00$) skor elde ettiğini, hızlı yöntemin kullanılması, A solüsyonu ile 61 (%57,5) izolat ve B solüsyonu ile 68 (%64,1) izolat için raporlama düzeyi puanları ürettiğini bildirmişlerdir. Farklı formülasyonların denendiği çalışmamızda tıpkı literatürde belirtilenler gibi rutin olarak kullanılan metottan farklı formülasyonların kullanıldığı metotların daha iyi sonuçlar verebileceği görülmüştür. Bu sonuçlar **Tablo 5**'de verilmiştir. Yeni metotların denenerek

standartlaştırılması durumunda mantar kültürüne ekilen numunede üreyen mantarların olgun koloni oluşturması beklenmeden tanılamaya olanak sağlayacak bir yöntem geliştirilebilir. Bu yöntemlerin geliştirilmesi için mantarların identifikasyonu hakkında daha fazla çalışma yapılmalıdır.

OCT-D klinik kullanım için olan konsantrasyonun %0,05-0,1 (w/w) olduğu bildirilmektedir. (Koburger, Hübner, Braun, Siebert and Kramer 2010). Bunun yanı sıra *Fusarium spp*, *Candida spp*, ve *Aspergillus niger* gibi dermatofit dışı etkenler için %0,05'lik konsantrasyon gerektiği görülmüştür. (<https://www.ataman-chemicals.com/urunler/oktenidin-dihidroklorur-519.html> Erişim tarihi 4 mart 2023). Yapılan literatür taramalarında OCT-D ve HOCl'nin dermatofitler üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı agar dilüsyon testleri ile ilgili yeterli veri bulunamamıştır. Bunun sebebi olarak yöntemin fazla zaman alıcı olması söylenebilir. Agar dilüsyon testini yaptığımız bu çalışmamızda OCT-D'nin dermatofit etkenleri için %0,000625 konsantrasyonda bile etkili olduğu görülmüştür. Onikomikoz etkeni olan organizmalar ile yapılan OCT-D ve HOCl agar dilüsyon testi sonuçları **Tablo 6** ve **Tablo 7**'de verilmiştir.

EUCAST kılavuzlarında dermatofitlerde uygulanabilecek agar dilüsyon için verilmiş olan net bir değer bulunmamaktadır. Bir çalışmada Altmış dermatofit izolatu ve terbinafinin de içinde bulunduğu azol gurubu ilaçlar ile yapılan agar dilüsyon çalışmasının sonucunda elde edilen MİK değerlerinin, aynı suşların mikrodilüsyon yöntemi sonucunda bulunan MİK değerleri ile kıyaslanması yapılmıştır. Agar dilüsyon metodunda terbinafin için MİK değeri tüm izolatlar için 0,2 mg/l bulunurken mikrodilüsyon yönteminde bu değer ortalama 0,01 mg/l olarak bulunmuştur. Bu durumun sonucunda insanda kullanımı hesap edilirken mikrodilüsyon testi ile bulunan MİK değerlerinin daha makul görüldüğünü belirtmişlerdir (Niewerth, Splenemann, Korting, Ring and Abeck 1998). Yaptığımız çalışmada elde edilen değerlerdeki farklılıkların sebebi bu şekilde açıklanabilmektedir. Aynı zamanda agar dilüsyon testlerinin kullanımının daha az yaygın olmasına bir neden olarak bu durum da gösterilebilir.

Mota ve ark (2009) terbinafin için yaptıkları agar dilüsyon çalışmasında onikomikozun birincil etkeni olan dermatofitlerin MİK değerini 0,03-0,125 mg/l olarak diğer türler için 0,125 mg/l veya daha üstü olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada *Fusarium* spp. ile yapılan ve aralık olarak 0,03-128 mg/l aralığındaki terbinafin antifungal agar dilüsyon ile test etmişlerdir. *F. moniliforme* ve *F. oxysporum* suşlarında oldukça etkili (0,25-1 mg/l aralığında) olduğunu ancak *F. solani* suşlarına karşı daha az aktif olduğunu bildirmişlerdir (Speeleveld, Gordts, Landuyt, Vroey and Wuytack 1996). Yaptığımız çalışmada görüldüğü üzere *Fusarium* spp. gibi onikomikozun ikincil etkenlerinin terbinafin gibi antifungallere karşı direnç gösterdiği görülmüştür. Onikomikoz etkeni olan organizmalar ile yapılan Terbinafin agar dilüsyon testi sonuçları **Tablo 8**'de verilmiştir.

OCT-D'nin ve araştırılan diğer dezenfektanların %80'lik derişimini kullanılarak yapılan in vitro çalışmada, povidon-iyodin ve oktenidin dihidroklorürün, klinik izolat olan *T. rubrum* ve *T. interdigitale* suşlarının yanı sıra *C. parapsilosis* ve *C. albicans*'a karşı fungisidal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *Aspergillus* spp. karşı fungisidal aktivitenin ise daha zayıf olduğunu vurgulamışlardır (Silva-Neves et al 2021). Ponnachan ve ark. na göre (2019) OCT derişimleri ile muamele sonrası UV-C light düşük basınçlı cıva buharlaması kullanılarak antifungal aktiviteyi değerlendirdikleri çalışmada klinik olarak önerilen konsantrasyonun (%0,05-0,1) daha altında konsantrasyonlarda (%0,0004-0,00005) bile *Candida* gibi onikomikoz etkenlerine karşı etkili olduğunu söylemişlerdir. Hübner ve arkadaşlarının (2010) hazırladığı derlemede OCT-D'nin *Candida* suşları için MİK değeri 1,5-3,0 mg/l olarak belirtilmektedir. Yaptığımız çalışmada tüp dilüsyon testinde OCT-D için bulunan MİK değerleri **Tablo 9** ve **Tablo 10**'da verilmiştir. OCT-D'nin MİK değerleri literatür taraması aracılığı ile seçilen aralıklarının ve ticari olarak satılan konsantrasyonun çok altında çıkmıştır. MİK değerinin az olması topikal antifungal tedavide OCT-D nin bir alternatif olabileceğini göstermek ile beraber bu dezenfektanın dermatofit etkenleri ile enfekte olan tırnakların yüzeyinden tırnak altına uygun dozda geçiş problemini düşündürmektedir.

Sakarya ve ark. (2013) *Trichophyton verrucosum* ve *Epidermophyton floccosum* üstünde time kill araştırmıştır. *E. floccosum* artan zamanla üreme azalarak 8 saat sonunda 1/64'lük dilüsyonda üreme olmadığını bildirmişler. *T. verrucosum* suşunda ise 15.dk dan sonra tüm dilüsyonlarda üreme olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* ve *Candida spp.* gibi türler için yapılan mikrodilüsyon testlerinde %0,01 (w/w)'lik konsantrasyonda 1 dakika bekletilmesi ile %90'lık bir öldürme oranına sahip bir sonuç elde edildiği bildirilmiştir (Odorcic, Hass, Gilmore, Dohlman 2015). Yaptığımız çalışmada HOCl'nin %0,01'lik derişimin (128 mg/l) üzerindeki derişime ihtiyaç duyan organizmalar onikomikozun ikincil etkeni olarak sayılabilecek olan (*Fusarium*, *Aspergillus spp.* ve *Candida spp.*) suşlar olarak bulunmuştur. Dermatofitlerin MİK değeri ise 64-128 mg/l olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada tüp dilüsyon testinde HOCl dezenfektanı için bulunan MİK değerleri **Tablo 9** ve **Tablo10**'da verilmiştir. Çalışmada ticari konsantrasyonun üstünde bir derişim elimizde bulunmadığından MİK değeri 128 mg/l üstünde çıkan suşlar ticari konsantrasyonda Time Kill metodu ile test edilmiştir ve HOCl için bulunan Time kill değerleri **Tablo 11**'de verilmiştir.

Terbinafin için yapılan mikrodilüsyon çalışmasında, EUCAST tarafından kalite kontrol suşu olan *T. rubrum* için verilmiş olan 0,016 mg/l değer için test edilmiştir (EUCAST 2022). Terbinafin ve Itranazol ile dermatofitlerin üzerinde yapılan mikrodilüsyon çalışmasında *Trichophyton spp.*, *Microsporum canis* ve *Candida spp.* etkenleri test edilmiştir. *Trichophyton* türlerinde terbinafin için MİK değeri 0,0313 mg/l iken iki *Microsporum* türü için 0,5 ve 0,2 mg/l olduğu *Candida* türlerinde ise MİK değeri 1 mg/l olduğu gösterilmiştir (Hazen 1998). Ryder, Wagner ve Leitner'in (1998) *Candida spp.* üzerinde yaptığı tüp dilüsyon çalışmasına göre terbinafin için 0,03→128 mg/l'lik değer aralığı test edildiğini bildirmişlerdir. *C. albicans* suşu için MİK değeri 4 mg/l, *C. parapsilosis* için MİK değerini 0.125 mg/l olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Schmitt ve arkadaşları (1998) *Aspergillus* suşları ile yaptıkları mikrodilüsyon çalışmasında 0,025-0,4 mg/l'lik terbinafinin MİK aralığını test etmiş, MİK değerini 0,4 mg/l olarak bulunduğunu bildirmiştir. *T. rubrum*'un terbinafinin dilüsyonları ile muamelesini denediğimiz çalışmamızda bulunan MİK değeri 0,032 mg/l olarak bulunuş olup EUCAST'in QC tablolarında belirtilen değer iki katı olarak

bulunmuştur. Bu durum tüp dilüsyon çalışması olarak test etmemizden kaynaklı olabileceği gibi suşların direnç kazandığını da düşündürmektedir. Diğer suşların MİK değerleri **Tablo 9** ve **Tablo 10**' da verilmiştir.

Yapılan bir çalışmada OCT-D'nin *C. albicans* için MİK değerinin 1 mg/l olduğu belirtilmiştir. Triklosan, PVP-iyot, oktenidin dihidroklorür, poliheksanit ve klorheksidin diglukonatin antiseptik etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre *Candida* türlerindeki OCT-D'nin MİK değeri ile MFK değerinin aynı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmaya göre MFK değeri de 0,001 mg/ml olarak belirlemişlerdir (Koburger et al 2010). Krasowski ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada Minimal Fungisidal Konsantrasyon test etmişlerdir. Yapılan çalışmada Polihexanide, OCT-D, NaClO/HOCl antiseptikleri test edilmiştir. *Candida albicans* suşu için MFK (%v/v) Polihexanide için %0.36 (± 0.18), OCT-D için %0.09, NaClO/HOCl için >%25 olduğunu bildirmişlerdir. *Aspergillus* suşları ile yapılan başka bir terbinafin mikrodilüsyon çalışmasında MFK değerlerinin MİK değerleri ile aynı (0.4 mg/l) olduğu bildirilmiştir (Schmitt et al 1988). Terbinafin ve Itranazol ile dermatofitlerin üzerinde yapılan mikrodilüsyon çalışmasında *Trichophyton spp.*, *Microsporum canis* ve *Candida spp.* etkenlerini test edilmiştir. Bu suşların MFK'sine bakıldığında dermatofit etkenlerinin çoğu aşırı duyarlı bulunurken *Candida* türlerinde 1-2 mg/l olduğu gösterilmiştir (Hazen 1998). Çalışmamızda dezenfektanların ve antifungalın denendiği MFK testlerinin sonuçları **Tablo11**' de verilmiş olup, literatürde bahsedilene benzer şekilde MİK değerlerine yakın oldukları görülmüştür. OCT-D ve HOCl'nin MİK ve MFK değerleri dikkate alındığında fungistatik ve fungisidal aktiviteler gösterilmektedirler. İki dezenfektanda test edilen dermatofitlere karşı fungisidal etki göstermiş, MFK değerlerinin MİK değerlerinden yüksek olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada metal işleme sıvılarının *Fusarium* mantarlarının üzerindeki öldürücü etkileri LIVE/DEAD BacLight kit kullanarak araştırılmıştır. Canlı hücreler SYTO 9 boyası ile boyandıkları için yeşil görünürlerken PI boyası sayesinde ölü hücreler kırmızı olarak kaydedilmiştir. 0. saate az miktarda ölü hücre görünürken 24. saatte tüm mantarların öldüğünü bildirmişlerdir (Vanhauteghem et al 2017). *Candida*

spp. için benzer şekilde yaptığımız akış sitometrisi analizinden çıkan sonuçlar **tablo 12'**de verilmiştir. Dezenfektanların 0. saate bile güçlü etki göstermesi MİK testlerini destekler nitelikte olduğunu düşündürmektedir. Yapılan akış sitometrisi ile canlılık tayininin neticesinde sadece hücresel yapılar veya bakteriler üzerinde değil mayalar gibi farklı organizma üzerinde de bu analizin yapılabileceğini gösterilmiştir. Aynı zamanda yaptığımız çalışma sonucunda hif içeren mantarlar için kullanılan prosedürün hifleri uzaklaştırmak açısından farklılaştırılarak geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak;

Mantarların antifungal direncinin araştırılması ve analizlerinin yapılması, yoğun emek gerektiren ve zaman alıcı işlemler olmasından dolayı halen pek çok laboratuvarında göz ardı edilmiş durumdadır. Unutulmamalıdır ki enfeksiyon etkeni tüm mantarlar da tıpkı bakteriler gibi antifungal ajanlara direnç kazanabilmektedirler. Bu yüzden yapılacak çalışmalarla tanımlama ve duyarlılık testleri için standardize yöntemlere ihtiyaç vardır. Özellikle MALDI-TOF-MS gibi otomatize sistemlerde mantarlar için yöntem standardizasyonu, mikroorganizma kütüphanelerinin genişletilmesi ve hif oluşturan mantarlar için yeni ve hızlı prosedürler geliştirilerek etkili bir tanımlama sağlanmalıdır.

Yaptığımız çalışmada onikomikoz etkenlerine OCT-D ve HOCl'nin en az hali hazırda kullanılmakta olan antifungaller kadar etkili olduğu ortaya konmuştur. Öyle ki ticari olarak satılan konsantrasyonun çok altındaki konsantrasyonlarda bile fungusit ettikleri görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında onikomikozun topikal tedavisinde OCT-D ve HOCl'nin bir alternatif olabileceği söylenebilir. Ancak OCT-D ve HOCl'nin kimyasal yapılarının bozulmadan enfekte tırnağın alt tabakasına yerleşmiş olan onikomikoz etkenlerine ulaşması için penetre edici maddelerle kombine olarak uygulanması tedaviye katkı sağlayacaktır. Aynı zamanda insanlarda rahatlıkla kullanılabilmesi için OCT-D ve HOCl'nin penetre edici kimyasallar ile hazırlanacak olan kombinasyonların sitotoksik etkilerinin de ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızla elde edilen veriler ışığında daha geniş ve kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, Sahoo PK, Chauhan MK. (2020). Onychomycosis: Novel strategies for treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 4–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101774>.
- Aggarwal R, Targhotra M, Sahoo PK, Chauhan MK. (2020). Treatment and management strategies of onychomycosis. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(2), 100–949. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100949>.
- Aksu, O. (2009). Onikomikozda Klinik ve Mikolojik Araştırmalar. S.B.Ü. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Danışman: Doç. Dr. E Derviş).
- Alhbou, Y. (2020). Ratlarda Açık Yara Tedavisinde Etakridin Laktat Ve Hipokloröz Asit'in Etkinliğinin Karşılaştırılması. K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale, (Danışman: Dr. Öğr. Üyesi B Karşlı)
- Arendrup MC, Kahlmeter, G, Guinea J, Meletiadis J. (2021). How to: Perform antifungal susceptibility testing of microconidia forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.08.042>.
- Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea, J. (2020). 'Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *EUCAST Definitive Document E.DEF 7.3.2*', *EUCAST antifungal MIC method for yeasts*, 12(3), 1–21.
- Ateş MF. (2020). Su, tuz, hipokloröz asit ve enfeksiyonlardan korunma. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 154–160. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1433665>
- Azkur AK, Aslan ME. (2012). Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 7(1), 59–66. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/33954>
- Azrad M, Freidus V, Kassem R, Peretz A. (2019). Identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS technology in the clinical laboratory. *International Journal of Mass Spectrometry*, 440, 32–36. Doi: [10.1016/j.ijms.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.03.005).
- Baran R, Hay R, Haneke E, Tosti A, Piraccini BM. (2006). Onychomycosis: The Current Approach to Diagnosis and Therapy 'Part 5: Mycological examination', in *Onychomycosis: The Current Approach to Diagnosis and Therapy*-Google Kitaplar. London: Martin Dunitz Ltd, p. 28–32.

- Bodman MA, Krishnamurthy K. (2021). Onychomycosis, StatPearls [Internet]. Florida. StatPearls, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441853/> Erişim tarihi: 22 nisan 2022.
- Cho SH, Godin JM, Chen CH, Qiao W, Lee H, Lo YH.(2010). Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Journal of Biomicrofluidics*, 4(4), p. 043001. <https://doi.org/10.1063/1.3511706>.
- Chum JD, Lim DJZ, Sheriff SO, Pulikkotil SJ, Suresh A, Davamani F. (2019). In vitro evaluation of octenidine as an antimicrobial agent against *Staphylococcus epidermidis* in disinfecting the root canal system. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 44(1). <https://doi.org/10.5395/RDE.2019.44.E8>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2010). M51-A Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline A guideline for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. Archived Doc. 1st edn, Clinical and Laboratory Standards Institute. 1st edn. Philadelphia, USA. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m51/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2015) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd edn, Clinical and Laboratory Standards Institute. 3rd edn. Philadelphia, USA. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m38/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2017) M27Ed4 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th edn, Clinical and Laboratory Standards Institute. 4th edn. Philadelphia, USA. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2018) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd edn, Clinical and Laboratory Standards Institute. 3rd edn. Philadelphia, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m44/>
- Del Rosso JQ. (2014). The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 7(7), 10–8.
- Dettenkofer M, Jonas, D, Wiechmann C, Rossner R, Frank U, Zentner J, Daschner FD. (2002). Effect of skin disinfection with octenidine dihydrochloride on insertion site colonization of intravascular catheters. *Journal of Infection*, 30(5), 282–285. <https://doi.org/10.1007/s15010-002-2182-2>.
- Dogan, O. (2020). İnvazif fungal infeksiyonların tanısı: Kültür ve antifungal duyarlılık testleri. *Klinik Dergisi*, 32(Supp2), 128–130. <https://doi.org/10.5152/kd.2019.55>.

- Drago L, Micali G, Papini M, Piraccini BM, Veraldi S. (2017). Management of mycoses in daily practice. *Italian Journal of Dermatology and Venereology*, 152(6), 642–650. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.17.05683-8>.
- Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlaß S, Wiegand C, Hipler UC, Krüger C, Koch D, Wittig F, Verma SB, Singal, A, Gupta S, Vasani R, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura MM, Kumar A, Poojary S, Schirm S, Gräser Y, Paasch U, Nenoff P. (2020). Alarming India- wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses*, 63(7), 717–728. <https://doi.org/10.1111/myc.13091>.
- Elewski BE, Aly R, Baldwin SL, González Soto RF, Rich P, Weisfeld M, Wiltz H, Zane LT, Pollak R. (2013). Efficacy, safety and tolerability of topical terbinafine nail solution in patients with mild-to-moderate toenail onychomycosis: results from three randomized studies using double-blind vehicle-controlled and open-label active-controlled designs. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 27(3), 287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04373.x>.
- Elewski BE. (1998) Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(3), 415–429. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.415>.
- Elkeeb R, AliKhan A, Elkeeb L, Hui X, Maibach HI. (2010). Transungual drug delivery: Current status. *International Journal of Pharmaceutics*, 384(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.002>.
- Fissel JA, Holdren-Serrell CK, Memon W, Zhang SX. (2022). Performance of a Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry testing algorithm for the rapid identification of clinical filamentous molds. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, p. 915049. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.915049/BIBTEX>.
- Ghannoum M, Isham N, Goldman WE. (Eds), (2014) Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? *PLoS Pathogens*. 10(6), p. e1004105. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004105>.
- Grover C, Khurana A. (2012) Onychomycosis: Newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 78(3), 263–269. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.95440>.
- Guinea J, Meletiadis J, Arikan AS, Muehlethaler K, Kahlmeter G, Arendrup MC, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022) Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. EUCAST Definitive Document E.DEF 9.4. EUCAST antifungal microdilution method for moulds, 2, pp. 1–25. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02086.x

- Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. (2013). Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clinics in Dermatology*, 31(5), 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.011>.
- Gupta AK, Renaud HJ, Quinlan EM, Shear NH, Piguet V. (2021). The growing problem of antifungal resistance in onychomycosis and other superficial mycoses. *American Journal of Clinical Dermatology*, 22(2), 149–157. <https://doi.org/10.1007/S40257-020-00580-6/TABLES/2>.
- Gupta AK, Hall DC, Cooper EA, Ghannoum MA. (2022) Diagnosing onychomycosis: What's new?. *Journal of Fungi*, 8(5), 464. <https://doi.org/10.3390/jof8050464>.
- Gupta AK, Venkataraman M, Talukder M. (2022). Onychomycosis in Older Adults: Prevalence, Diagnosis, and Management. *Drugs & Aging*, 39(3), 191–198. <https://doi.org/10.1007/s40266-021-00917-8>.
- Gül M, Çiftçi İ. (2022). Onikomikoz ve tedavi yaklaşımları *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 7(3), 587–612. <https://doi.org/10.25279/SAK.1053918>.
- Hazen KC. (1998). Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 38(5), 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(98\)70482-7](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70482-7).
- Hübner NO, Siebert J, Kramer A. (2010). Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin pharmacology and physiology*, 23(5), 244–258. <https://doi.org/10.1159/000314699>.
- Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. (2009). Candidal onychomycosis: A Mini-Review. *Mycopathologia*, 168(4), 165–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11046-009-9212-x>.
- Jelinek T, Bezdekova R, Zatopkova M, Burgos L, Simicek M, Sevcikova T, Paiva B, Hajek R. (2017). Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders. *Blood cancer journal*, 7(10), e617. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.90>.
- Jorgensen JH Turnidge JD, Jorgensen JH(eds), Carroll KC(eds), Funke G(eds), Pfaller MA(eds), Landry ML(eds) Richter SS(eds), Warnock DW(eds). (2015). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods', in *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC, USA, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1253–1273. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.CH71>.
- Kanev MO. Muranlı FDG. (2015). Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33–38. Doi: [10.16984/saufenbilder.45424](https://doi.org/10.16984/saufenbilder.45424).
- Karaboz İ, Kayar E, Akar S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 06(2), 1–18. <http://www.mikrobiyoloji.org/pdfler/702080201.pdf>

- Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*, 9(2), 49. Doi: [10.3390/DIAGNOSTICS9020049](https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS9020049).
- Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. (2019). Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genetics and Biology*, 132, p. 103255. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103255>.
- Koburger T, Hubner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. (2010) Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1712–1719. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq212>.
- Köse ÖK, Güleç AT. (2016). Onikomikoz Tanı ve Tedavisi. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji - Özel Konular*, 9(3), 13–19.
- Krasowski G, Junka A, Paleczny J, Czajkowska J, Szaroszyk EM, Chodaczek G, Majkowski M, Migdał P, Fijałkowski K, Krochmal BK, Bartoszewicz M. (2021) In vitro evaluation of polyhexanide, octenidine and NaClO/HClO-based antiseptics against biofilm formed by wound pathogens. *Membranes*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES11010062>.
- L'Ollivier C, Ranque S. (2017). MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia*, 182(1–2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/S11046-016-0080-X/FIGURES/2>.
- Larone DH. (1987). Medically Important Fungi: A Guide to Identification – second Edition. 2nd edn, Laboratory Medicine. 2nd edn. January, Elsevier.
- Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. (2013). Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 828–834. <https://doi.org/10.1128/JCM.02852-12>.
- Luethy PM, Zelazny AM. (2018). Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(2), 130–135. Doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.015](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.015).
- McKinnon, KM. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1), 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- Moreno-Coutiño G, Toussaint-Caire S, Arenas, R. (2010). Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis. *Mycoses*, 53(2), 144–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01683.x>.

- Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Barth RL. (1996) Duration of incubation of fungal cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), p. 1583. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.6.1583-1585.1996>.
- Mota CRA, Miranda KC, Lemos JDA, Costa CR, Souza LKHE, Passos XS, Silva HME, Silva MDRR. (2009). Comparison of in vitro activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(3), 250–254. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000300003>.
- Niewerth M, Splanemann V, Korting HC, Ring J, Abeck D. (1998). Antimicrobial susceptibility testing of dermatophytes - Comparison of the agar macrodilution and broth microdilution tests. *Chemotherapy*, 44(1), 31–35. <https://doi.org/10.1159/000007087>.
- Odorcic S, Haas W, Gilmore MS, Dohlman CH. (2015). Fungal Infections After Boston Type 1 Keratoprosthesis Implantation. *Cornea*, 34(12), 1599–1605. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000639>.
- Olson RJ, Zettler ER, Anderson OK. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10(5), 636–643. <https://doi.org/10.1002/CYTO.990100520>.
- Piraccini B, Alessandrini A. (2015). Onychomycosis: A Review. *Journal of Fungi*, 1(1), 30–43. <https://doi.org/10.3390/jof1010030>.
- Ponnachan P, Vinod, Pullanhi U, Varma P, Singh S, Biswas R, Kumar A.(2019) Antifungal activity of octenidine dihydrochloride and ultraviolet-C light against multidrug-resistant *Candida auris*. *Journal of Hospital Infection*, 102(1), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.09.008>.
- Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Rezusta A, de la Fuente S, Gilaberte Y, Vidal-García M, Alcalá L, López-Calleja A, Ruiz MA, Revillo MJ. (2016). Evaluation of incubation time for dermatophytes cultures. *Mycoses*, 59(7), 416–8. Doi: 10.1111/myc.12484.
- Ryder NS, Wagner S, Leitner I. (1998). In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5), 1057–1061. Doi: 10.1128/AAC.42.5.1057
- Sakarya S, Günay N, Öztürk ŞB, Ertuğrul B. (2013). Dermatofitozların tedavisinde yeni bir güçlü ajan: Hipokloröz asit (Crystalin®). *XVI KLİMİK KONGRESİ*.

http://www.nhp.com.tr/referanslar/referans_14.pdf (Erişim tarihi: 21 Mayıs 2023).

- Sandhaus LM, Ciarlini P, Kidric D, Dillman C, O'Riordan M. (2010). Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts Using the Sysmex XE-5000Is It Time for New Reference Ranges?. *American Journal of Clinical Pathology*, 134(5), 734–738. <https://doi.org/10.1309/AJCPABGQXSIA4SMT>.
- Schmitt HJ, Bernard EM, Andrade J, Edwards F, Schmitt B, Armstrong D. (1988). MIC and fungicidal activity of terbinafine against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(5), 780–781. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.5.780>.
- Shamly V, Kali A, Srirangaraj S, Umadevi S. (2014). Comparison of microscopic morphology of fungi using lactophenol cotton blue, iodine glycerol and Congo red formaldehyde staining. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(7). <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8521.4535>.
- Sharma B, Nonzom S. (2021). Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario- an updated analysis. *Mycoses*, 64(8), 890–908. <https://doi.org/10.1111/myc.13264>.
- Silva-Neves V, Hugo V, Alves P, Amado JC, Pais-Vieira C, Sousa F, Cerqueira F, Pinto E, Pais-Vieira M. (2021) Quality of life and therapeutic regimen management in onychomycosis patients and in vitro study of antiseptic solutions. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92111-4>.
- Singal A, Khanna D. (2011). Onychomycosis: Diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 77(6), 659–670. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.86475>.
- Speeleveld E, Gordts B, Van Landuyt HW, De Vroey C, Raes-Wuytack C. (1996). Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses*, 39(1–2), 37–40. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00081.x>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2022). Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST. Version 6.0 (2022) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://www.ccug.se/>
- Tosti A, Baran R, Piraccini BM, Fanti PA. (1999). “Endonyx” Onychomycosis: A New Modality of Nail Invasion by Dermatophytes. *Acta Dermato-Venereologica*, 79(1), 52–53. <https://doi.org/10.1080/000155599750011714>.
- Uemura EVG, Barbosa MDS, Simionatto S, Al-Harrasi A, Al-Hatmi AMS, Rossato L. (2022). Onychomycosis Caused by *Fusarium* Species. *Journal of Fungi* 8(4), 360. <https://doi.org/10.3390/JOF8040360>.

- Vanhauteghem D, Demeyere K, Callaert N, Boelaert A, Haesaert G, Audenaert K, Meyer E. (2017). Flow Cytometry Is a Powerful Tool for Assessment of the Viability of Fungal Conidia in Metalworking Fluids. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(16). <https://doi.org/10.1128/AEM.00938-17>.
- Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. (2019) Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 147. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>.
- Verma S, Madhu R. (2017). The Great Indian Epidemic of Superficial Dermatophytosis: An Appraisal. *Indian journal of dermatology*, 62(3), 227–236. https://doi.org/10.4103/IJD.IJD_206_17
- Wheat, PF. (2001). History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 1–4. https://doi.org/10.1093/JAC/48.SUPPL_1.1.
- Wollina U, Nenoff P, Haroske G, Haenssle HA. (2016). The Diagnosis and Treatment of Nail Disorders. *Deutsches Ärzteblatt international*, 113(29–30), 509–517. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0509>.
- Yeğenoğlu Y. (2012). Antifungal direnci gösteren mantarlar. *ANKEM Derg*, 26(2), 254–260.
- Yiğit Ş, Akar MS, Özbek E. (2020). Ortopedik Enfeksiyonların Tedavisinde Sodyum Hipoklorit'in Yeri Var mıdır?. *Dicle Tıp Dergisi*, 469–475. <https://doi.org/10.5798/DICLETIP.755778>.
- Youssef AB, Kallel A, Azaiz Z, Jemel S, Bada N, Chouchen A, Belhadj-Salah N, Fakhfakh N, Belhadj S, Kallel K. (2018). Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Mycology of the Rabta Hospital of Tunis. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(4), 651–654. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.07.005>.
- Yücel A, Kantarcıoğlu AS. (2003). Terbinafin ile flukonazol kombinasyonunun *Candida albicans* kökenlerine karşı in vitro etkisi. *İnfeksiyon Dergisi*, 17(1), 71–75. <http://search/yayin/detay/21084>

EKLER
Ek 1.
RPMI 1640 İeriği

Bileşenler	Konsantrasyon (g/l)
L-arginine (free base)	0,200
L-asparagine (anhydrous)	0,050
L-aspartic acid	0,020
L-cystine • 2HCl	0,065 2
L-glutamic acid	0,020
L-glutamine	0,300
Glycine	0,010
L-histidine (free base)	0,015
L-hydroxyproline	0,020
L-isoleucine	0,050
L-leucine	0,050
L-lysine • HCl	0,040
L-methionine	0,015
L-phenylalanine	0,015
L-proline	0,020
L-serine	0,030
L-threonine	0,020
L-tryptophan	0,005
L-tyrosine • 2Na	0,028 83
L-valine	0,020
Biotin	0,000 2
D-pantothenic	0,000 25
Choline chloride	0,003
Folic acid	0,001
Myoinositol	0,035
Niacinamide	0,001
PABA (para-aminobenzoic acid)	0,001
Pyridoxine HCl	0,001
Riboflavin	0,000 2
Thiamine HCl	0,001
Vitamin B12	0,000 005
Calcium nitrate × H2O	0,100
Potassium chloride	0,400
Magnesium sulfate (anhydrous)	0,048 84
Sodium chloride	6,000
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	0,800
Glucose	2,0
Glutathione, reduced	0,001
Phenol red, Na	0,005/ 3

Ek 2.
Etik İzin Belgesi



Ek 3. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Merve GÜL

Doğum yeri ve tarihi: xxxxx / xxxxxxxx

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: xxxxxx

Askerlik durumu: Muaf

İletişim adresi ve telefonu: xxxxxxxxxxxx/ xxxxxxxxxxxx

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Yüksek Lisans: Sakara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Tezli Yüksek Lisans Programı

Önlisans: Anadolu Üniversitesi, Türkiye Açıköğretim Fakültesi, Tıbbi Dökümantasyon Ve Sekreterlik Programı.

Lisans: Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Lise: Mustafa Çizmecioğlu Anadolu Lisesi

İlköğretim: 50. Yıl İlköğretim Okulu

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2020- Biyomühendis

2024- Master of Science (Msc) Medical Mikrobiology

IV- Mesleki Deneyimi

1. Dr. Nafiz Körez Sincan Devlet Hastanesi Ankara - 2018- Staj
2. Ant Medikal Flow sitometri laboratuvar personeli- 2023- hala devam ediyor

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Yok

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Makaleler:

- 1. Gül M. & Çiftci, İ. H. (2022). Onikomikoz ve Tedavi Yaklaşımları, Sağlık Akademisi Kastamonu 7(3), 587-612. DOI: 10.25279/sak.1053918**

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- 1. 321S435, Sporcularda Atriyal Fibrilasyon Gelişiminde Yeni Bir Risk Faktörü Olarak Bağırsak Mikrobiyotası, Burslu, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.05.2023 - 01.09.2024, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2022 - 01.09.2024.**

VIII- Diğer Bilgiler

Sertifikalar

2019- Kemirgen Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu. Sertifika No: KKHADYK/6692.

2020- Biyomedikal Kalibrasyon Sertifika Programı. Barkod No: UN_041265139967809244.

2020- ISO 17025 Laboratuvar Akreditasyonu Eğitimi Sertifika Programı. Barkod No: UN_0412651399678092451.

2021- KOSGEB Girişimcilik Eğitimi Katılım Belgesi. Doğrulama Kodu: KSB012021U149G9949E