

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOL ETKİSİ ALTINDA
CANDIDA ALBICANS VE CANDIDA
DUBLINIENSIS' IN YAĞ ASİDİ PROFİLLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Metin ÜSTÜN

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR- 2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-1988014328

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUKONAZOL ETKİSİ ALTINDA
CANDIDA ALBICANS VE CANDIDA
DUBLINIENSIS' IN YAĞ ASİDİ PROFİLLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Metin ÜSTÜN

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-1988014328

"Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi **Metin ÜSTÜN 'FLUKANAZOL ETKİSİ ALTINDA CANDIDA ALBICANS VE CANDIDA DUBLINIENSIS' IN YAĞ ASİTİ PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ'** konulu Yüksek Lisans tezini 8 Eylül 2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Hüseyin BASKIN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BAŞKAN



Prof. Dr. Serhan SAKARYA

Adnan Menderes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı

ÜYE



Prof. Dr. Tonay İNCEBOZ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Yrd.Doç.Dr. Barçın ÖZTÜRK

Adnan Menderes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Yavuz DOĞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO DİZİNİ.....	V
ŞEKİL DİZİNİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Candida Türlerinin Özellikleri	4
2.1.1. Candida Türlerinin Tanımlanması.....	6
2.1.1.A.Koloni morfolojisi	6
2.1.1.B. Tanımlamada kullanılan hızlı testler(≤ 24 saat).....	7
2.2. Tanı Testleri	7
2.2.1.Germ tüp Testi	7
2.2.2. Trehaloz testi.....	8
2.2.3. Hızlı Tanıda Diğer Sistemler	8
2.2.4.Tanımlamada kullanılan Diğer Morfolojik ve Fenotipik Testler(≥ 24 saat)	8
2.2.5.Morfolojik İnceleme.....	9
2.2.6. Asimilasyon ve fermantasyon testleri	11
2.2.7. Ticari Tanımlama Panelleri (≥ 24 Saat)	12
2.2.8. Moleküler Yöntemler	12
2.3. Antifungaller	13
2.3.1 Amfoterisin B ve Lipit formülasyonları.....	15

2.3.2. Azoller	16
2.3.2.1. Flukonazol	17
2.3.2.2. Ekinokandinler	18
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1.Araştırma tipi	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Araştırmanın Çalışma Grupları	19
3.3.1.Çalışmada Kullanılan Suşlar:.....	19
3.3.2. Gazla Ayrıştırma (GC) Kontrol Suşları.....	19
3.3.3. Kalibrasyon Materyali	19
3.4. Çalışma Materyali	19
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	19
3.6. Veri Toplama Araçları.....	20
3.6.1. Sarf Malzemeleri.....	20
3.6.2. Cihazların Listesi.....	21
3.6.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	22
3.6.3.1. Mikroorganizmaların Üretilmesi.....	22
3.6.3.2. Antifungal Agar Proporsiyon Uygulaması	22
3.6.3.3. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi.....	22
3.7. Araştırma Planı	26
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	26
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	27
3.10. Etik Kurul Onayı.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi	28
4.2. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi	32

5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR	37
EK-1-Etik Kurul İzni	44
EK-2-Kurum İzni.....	45
EK -3 ARBİS ÖZGEÇMİŞ	46



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kullanımda veya gelişim aşamasında olan sistemik etkili antifungaller	15
Tablo 2: Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asiti Profillerinin Analizinde Kullanılan Ayraçlar	23
Tablo 4: ATCC 10231 <i>Candida albicans</i> ve CD36 <i>Candida dubliniensis</i> YST28 kütüphanesindeki karşılaştırması.....	31
Tablo 5: ATCC 10231 <i>Candida albicans</i> ve CD36 <i>Candida dubliniensis</i> YSTCLIN6 kütüphanesindeki karşılaştırması.....	31



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: <i>Candida albicans</i>	10
Şekil 2. <i>Candida dubliniensis</i>	10
Şekil 3: Antifungal ilaçların etki bölgeleri.	14
Şekil 4: Flukonazolun kimyasal yapısı	17
Şekil 5: Gazla Ayırıştırma Yönteminin “MID-1300-AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries” sonucu.....	28
Şekil 6: Gazla Ayırıştırma Yönteminin pozitif kontrol <i>DSM 1117 Pseudomonas aeruginosa</i> ve negatif kontrol <i>Ayıraçlar</i> (“ <i>reagent blank</i> ”) kromatografik sonuçları.....	30



KISALTMALAR

ATCC: “American Type Culture Collection”

HIV: “Human Immunodeficiency Virus”

GC: “Gas Chromatography”

SDA: “Sabouraud %2 Dextrose Agar”



TEŞEKKÜR

Tez sürecimde ve mesleki gelişimimde akademik bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman her koşulda yardımcı olan, kariyerimde büyük destek veren danışman Hocam Sayın Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN'a ve Öğr. Gör. Dr. Vahide BAYRAKAL'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca beni gönülden destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim Özcan ÜSTÜN'e sonsuz teşekkür ederim.

METİN ÜSTÜN



FLUKANAZOL ETKİSİ ALTINDA CANDIDA ALBICANS VE CANDIDA DUBLINIENSIS' IN YAĞ ASİDİ PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Metin ÜSTÜN

metin.ustun@deu.edu.tr

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Candida dubliniensis, *C. albicans*'la yakın ilişkisi olan bir maya olarak belirlenmiştir. Her iki *Candida* türü de HIV-enfekte bireylerde görülen ağız kandidiyozunun etkeni olabilirler. *Candida dubliniensis* izolatları *Candida albicans*' a göre genelde poliyen ve azollere daha yüksek duyarlılık gösterirler. Ancak *Candida dubliniensis* flukonazole daha hızlı direnç geliştirir ve bu özellik de profilaktik ve tedaviyi gerektiren uygulamalarda önemlidir. Mantar enfeksiyonlarının sıklığının ve öneminin artması antifungallerin sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır. ATCC 10231 *Candida albicans* ve CD36 *Candida dubliniensis* suşlarının flukonazol etkisinde olası yağ asidi değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır

Anahtar Kelimeler: ATCC 10231 *Candida albicans* ve CD36 *Candida dubliniensis*, yağ asiti, flukonazol

EVALUATION OF FATTY ACID PROFILES OF CANDIDA ALBICANS AND CANDIDA DUBLINIENSIS UNDER FLUCONAZOLE EFFECT

Metin ÜSTÜN

metin.ustun@deu.edu.tr

Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences

Department of Microbiology and Clinical Microbiology

ABSTRACT

Candida dubliniensis was identified as a yeast closely related to *Candida albicans*. Both *Candida* species may also affect oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Candida dubliniensis* isolates are generally more susceptible to polyadenes and azoles than *C. albicans*. However, *C. dubliniensis* fluconazole develops faster resistance, which is also important for prophylactic and therapeutic applications. The increase in the frequency and prevalence of fungal infections causes the frequent use of antifungals. ATCC 10231 *Candida albicans* and CD36 *Candida dubliniensis* strains were aimed to determine possible fatty acid changes during fluconazole effect.

Key words: ATCC 10231 *Candida albicans* and CD36 *Candida dubliniensis*, fatty acid, fluconazol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar alemi (kingdom fungi) denilen kendilerine ait ayrı bir alem içinde yer almaktadırlar. Mantarlar ökaryotik mikroorganizmalardır. Ancak kitin ve glukandan oluşan sert bir hücre duvarına ve ana sterol içeriği olarak kolesterol yerine ergosterolün bulunduğu bir hücre zarına sahip olmaları ile diğer ökaryotlardan ayrılırlar (1). Mantarlar son yirmi yıllık sürede, özellikle immün yetmezlik veya altta ciddi bir hastalık nedeniyle hastanede yatan bireylerde, hastalıkların önemli etkenleri olarak kendilerini göstermektedirler (2).

1987'de Berlin' de 14. Ulusal Botanik kongresinde Dixon ve Fromling tarafından yapılan Fungus sınıflandırmasında Tıbbi önem gösteren fungusların bu sınıflandırmadaki yeri belirlenmiş olup Candidalar, Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) sınıfı içinde yer alan üç takımdan Cryptococcales takımı içinde yer almaktadır (3).

Mantarların tanımlanmış en az 100 000 türü vardır. Bu sayıya her yıl yaklaşık 1000-1500 türün katıldığı düşünülmektedir. Bu türler içinde yaklaşık 50 kadar mantarın normal bireylerde enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir (4).

Klasik mantar taksonomisi, ağırlıklı olarak morfolojiye ve spor oluşturma şekline dayanır. Bununla birlikte, ayrıntılı yapısal özelliklerin yanı sıra, biyokimyasal ve moleküler özellikler de sıklıkla tartışılmakta ve bunun sonucunda orijinal taksonomik isimlendirmede değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Mantarlar tek hücreli veya çok hücreli olabilirler. Morfolojiye dayalı olarak en basit maya yada küf olarak gruplandırılırlar. Maya, morfolojik olarak, tomurcuklanma veya bölünme ile çoğalan bir hücre olarak tanımlanabilir. Burada progenitör ya da ana hücre, kendinden bir çıkıntı yaparak progeni ya da yavru hücreyi oluşturur. Yavru hücreler ana hücreden kopmaksızın uzayabilir ve sosise benzer yapılar olan yalancı hifleri (Psödohif) oluştururlar. Mayalar genellikle tek hücrelidir ve agar üzerinde yuvarlak, hamurumsu ya da mukoid koloniler yaparlar. Diğer taraftan küfler ise, hif olarak adlandırılan tübüler yapılardan oluşan iplik benzeri çok hücreli organizmalardır. Hifler, apikal uzama olarak bilinen bir olayla uçlarından doğru uzarlar. Hifler ya septumsuz (koenositik, oluk şeklinde ve çok çekirdekli) ya da septumlu (ara bölmelerle veya çapraz duvarla bölünmüş) olabilir. Hifler bir araya gelerek miçelyum adı verilen karmaşık bir yığın oluştururlar. Küflerin oluşturduğu koloniler; genellikle filamentöz, tüylü ya da yünümsü olarak tanımlanır.

Tıbbi önemi olan bir çok mantar, hem maya hem de küf formunda bulunabildiği için dimorfik olarak adlandırılır.

Mantarların çoğu aerobik solunum yaparlar, ancak bazıları fakültatif anaerop (fermentatif), diğer bir kısmı da zorunlu anaerop olabilir. Metabolik olarak mantarlar heterotroftur; biyokimyasal olarak ise çok değişken özellikler gösterirler. Bakterilere kıyasla mantarlar yavaş ürerler ve mantar hücrelerinin bölünme zamanları(“doubling time”) dakikalardan çok saatlerle ifade edilir.(5)



2. GENEL BİLGİLER

Varlığı tahmin edilen birkaç yüz bin farklı mantardan yaklaşık 200 tanesinin insanlarda hastalık oluşturduğu bilinmekte ve bu sayı da giderek artmaktadır.

Son yıllarda giderek karmaşık hale gelen mantar taksonomisi, özellikle basitleştirilmiş ve insanlarda hastalığa neden olan *Mucormycetes*, *Basidiomycetes*, *Pneumocystidiomycetes*, *Hemiascomycetes* ve *Euscomycetes* gibi ana mantar sınıflarının vurgulanması amaçlanmıştır.

Mantarlar son yirmi yıllık sürede, özellikle immün yetmezlik veya altta yatan ciddi bir hastalık nedeniyle hastanede yatan bireylerde, hastalıkların önemli etkenleri olarak kendilerini göstermektedirler. Mantarlar, bu hasta grupları için fırsatçı patojenler olarak davranırlar ve önemli oranlarda morbidite ve mortaliteye neden olurlar. Mantar enfeksiyonlarındaki bu artış, immün yetmezliği olan hasta sayısının giderek artmasına bağlanabilir. Bunlar transplant hastaları, AIDS'li hastalar, kanserli ve kemoterapi alan hastalar ve altta yatan ciddi hastalık nedeniyle hastaneye yatırılarak çeşitli invazif uygulamaların yapıldığı hastalardır (5).

Genel olarak, immün sistemi sağlıklı bireyler çevrelerindeki (ekzojen) veya normal kommensal floralarının parçası olan (endojen) çeşitli mantarların enfeksiyöz şekillerine devamlı olarak maruz kalmalarına karşın, mantar enfeksiyonlarına karşı yüksek doğal direnç gösterirler. *Candida* türleri, *C. neoformans* ve *Aspergillus* türleri gibi fırsatçı patojen mantarlar genellikle sadece deri ve mukozaların koruyucu bariyerinde bozulmalar olduğunda veya konağa girmelerine, kolonize olmalarına veya çoğalmalarına olanak verecek şekilde konak savunma sisteminde eksiklikler olması durumunda enfeksiyona neden olabilirler. Bu fırsatçılar için bile konaktan ziyade organizmanın kendisiyle ilişkili olan ve mantarın hastalık yapabilmesine katkıda bulunan faktörler vardır (6).

Candida türleri, *C. neoformans* ve *Aspergillus* türleri gibi fırsatçı mantarların patojenitelerini belirleyen primer faktör, konağın immün durumudur. Çoğu zaman bu organizmalar zararsız kolonizasyon oluştururlar ya da saprofitik olarak çevrede bulunur ve sadece konak savunması çöktüğünde ciddi enfeksiyonlara neden olurlar (7).

Candida türleri fırsatçı patojen mantarlar içerisinde en çok görülenidir. Candida türlerinin gastrointestinal mukozada kolonize olduğu ve kan dolaşımına gastrointestinal sistemden translokasyonla veya kontamine vasküler kateterler aracılığıyla ulaştığı, konak savunması ile etkileştiği ve karaciğer, dalak, böbrekler, kalp ve beyin gibi hedef organların derin dokularını istila etmek üzere damar dışına çıktığı günümüzde iyi bir şekilde ortaya konmuştur (8).

Candida türleri sosyoekonomik düzeyi yüksek ülkelerde hastanede yatan hastalarda en sık görülen invaziv mantar enfeksiyonlarından sorumlu mikroorganizmalardır.(9)

2.1. Candida Türlerinin Özellikleri

Heterojen bir cins olan Candida, askomiçetler içinde yer alan Candidaceae ailesinde yer almaktadır. Yaklaşık 200 kadar türü olduğu bilinmektedir. Yeni teknolojik gelişmeler taksonomiye de sürekli etkileyip elimizdeki türlerin yeniden adlandırılmasına ve yeni türlerin bulunmasına yol açacaktır (10).

Candida türleri yaygın görülen mayalar olup, birçok bitki üzerinde, memelilerin sindirim kanalı, insanın mukoza ve derisinde bulunur. Normal florada bulunan Candida türleri, hastalık veya sağaltım girişimleri nedeniyle bağışıklık savunması bozulmuş hastalarda, dokulara yayılarak yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilir. *Candida albicans*(*C. albicans*) çoğu kandidoz formlarından en sık izole edilen tür olup, bunun nedeni normal florada yüksek prevalans göstermesidir (11).

Candida türleri 3-6 mikrom büyüklüğünde, tek hücreli, kapsülsüz maya mantarlarıdır. Eşeysiz üremeleri multilateral tomurcuklanma yolu ile olmaktadır. Morfolojik olarak ana kök hücrenin bir bölümünün uzaması ile oluşan yuvarlak, oval veya uzamış şeklindeki yapılar blastokonidya olarak adlandırılır. Tomurcuklanma esnasında hücre duvarının bir noktası lizise uğrar ve bu noktadan dışarıya doğru balonlaşan kısım şişerek genişler. Tomurcukların ana hücreden ayrılmayıp uzaması sonucu yalancı hifler meydana gelir. Bazı türler (*C. albicans*, *C. dubliniensis* (*C. dubliniensis*)) gerçek hifler de oluşturabilir. Eşeyli üreme sonucu gelişen ve 4-8 hücreden oluşan tipik askosporlar, gerçek taksonominin anlaşılmasını sağlar (11,12,13).

Aerobik veya fakültatif anaerobik olabilen Candida türleri çok çeşitli besiyerlerinde 24-72 saat arasında üreyebilmektedir. Genellikle beyaz-krem renginde, düzgün ve tereyağı kıvamında koloniler oluşturur. Koloniler eskidikçe düzgünlüklerini kaybetmeye başlar.

Bazı türler başlangıçtan itibaren buruşuk koloniler oluşturabilir. *C. albicans* bazen kanlı agarda, ayaklı çıkıntıları ("colonies with feet") olan koloniler yapar (11,12).

Candida türleri klinik örneklerde blastokonidya, yalancı hif veya hif formunda bulunabilir. Yalancı hif; blastokonidyaların ana hücreden kopmadan uzayarak oluşturdukları bir hücre zinciridir. Duvarları birbirine paralel olmayıp hücreler arasında daralmalar nedeniyle boğumlu olarak görülürler. Gerçek hif ise boğumlanma göstermez; duvarları birbirine paraleldir ve septa oluşturur. Yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidyaların bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli özelliklerdir (14,15).

Doğada çok sayıda *Candida* türü bulunmasına karşın, özellikle bazı türler insanda sık izole edilen fırsatçı patojenler olmaları bakımından önemlidir. Bunlar; *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* ve *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* gibi son yıllarda güncellenen türler olarak sıralanabilir (16).

C. albicans hemen hemen tüm Candidoz formlarından en sık izole edilen türdür. (17) Hastalık etkeni olarak sık görülme nedeni, normal florada yüksek prevalans göstermesidir. *C. albicans*'ın A ve B olarak adlandırılan iki serotipi vardır ve bunlar bağışıklığı sağlam bireylerde yaklaşık olarak eşit dağılım gösterirler. Ancak bağışıklığı bozulmuş hastalarda serotip B'nin prevalansı daha yüksektir (18). Serotip B kökenleri, daha fazla karyotip çeşitliliği göstermeleri ve 5-florositozine karşı direnç geliştirmeye daha eğilimli olmaları ile serotip A kökenlerinden fizyolojik olarak farklılık sergilerler (19,20). Bu iki serotipin, *C. albicans*'ın son zamanlarda tanımlanan ve coğrafik dağılım gösteren genetik soyları içinde nasıl bir dağılım gösterdiği henüz bilinmemektedir (21).

Candida türlerinin blastokonidyum yapıları yuvarlak, oval veya uzamış şekildedir. Ender olarak bazı kökenler, özellikle antimikrobiyal ilaç kullanan hastalardan izole edilenler, ilk izolasyonlarında ileri derecede pleomorfik olabilirler. Eşeysiz üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur ve gerçek miçel de bulunabilir. Eğer eşeyli üreme olursa, mayalar teleomorfik durumlarına göre sınıflandırılır. Yalancı hiflerin görünümü ve bunlara blastokonidyum bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli özelliklerdir (22).

C. dubliniensis, *C. albicans* ile fenotipik olarak yakından ilişkilidir. *C. dubliniensis* fenotipik benzerliği nedeniyle *C. albicans*'tan oldukça güç ayırt edilmektedir (23).

Sağlıklı ve HIV enfeksiyonlu kişilerden izole edilmesi nedeniyle normal ağız flora üyesi olması ile özellikle bağışıklık bozukluğu olanlarda ağız lezyonlarına yol açtığı düşünülmektedir. Koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü *C. albicans* ile aynıdır, ancak *C. dubliniensis* 45°C’de üreyemez ve klamidosporları daha çok sayıdadır. *C. dubliniensis*’in ksiloz kullanımı ve glukosidaz aktivitesi yoktur. *C. albicans* ile ayrımlarında moleküler çalışmaların yararlı olacağı bildirilmektedir. *C. dubliniensis* SDA’da üç günde beyazdan kreme değişen renklerde parlak, düz koloniler oluşturur. Mısır unlu Tween 80 agarda *C. dubliniensis* klamidosporlarının diğer türlerden farklı olması önemli bir fenotipik özelliktir. *C. albicans* genellikle gerçek ve pseudohiflerin ucunda tek tek klamidosporlar üretir. Buna karşın *C. dubliniensis* türünde çok daha bol ve ekseri çiftler halinde veya üçlü hatta bazen pseudohifin ucundaki aynı bir taşıyıcı hücreye yapışmış kalın duvarlı birkaç klamidospordan oluşan kümeler veya salkımlar oluşturarak olağandışı düzen gösterirler (24,25).

C. dubliniensis’e bağlı enfeksiyonlarda flukanazol tedavisi sonrası ortaya çıkan direnç, tedavide güçlükler neden olmaktadır (26).

2.1.1. Candida Türlerinin Tanımlanması

Candida türlerinin tanımlanmasında genotipik yöntemler esas alınmakla birlikte morfoloji ve biyokimyasal analize dayanan fenotipik yöntemler, rutin laboratuvarlarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Tanımlamada kullanılan klasik karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testlerizaman alıcı ve aşırı yük getirici olduğundan ticari tanımlama testleri ön plana çıkmaktadır (27).

Farklı antifungal direnç profillerine sahip olabilmeleri nedeniyle etkenlerin tür düzeyinde tanımlanması önemlidir (28).

2.1.1.A.Koloni morfolojisi

Candida türleri rutin mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Üreme genellikle 48-72 saatte olurken, pasajları yapılmış ve laboratuvara adapte olmuş kökenler daha hızlı üreyebilirler. Candida türleri ile en çok kanlı agar ile SDA besiyerinde karşılaşılır. Her iki besiyerinden de koloni morfolojisi ile tanımlama yapmak mümkün değildir. Ancak bazı özellikler vurgulanabilir. *C. albicans* ve *C. tropicalis* 24 saatte koloni oluşturabilen türlerdir. Koloni görünümleri düzgün, beyaz-krem ve tereyağ kıvamında olup birbirlerinden farklı bir özellik göstermemektedirler (29).

Candida türlerine özgü kromojenik besiyerleri, pimer izolasyon besiyeri olarak kullanıldığı zaman, kolonilerin rengine göre erken tanımlama yapmak mümkündür. Ayrıca bu besiyerleri, karışık üremeleri göstermesi açısından da avantajlıdır (30). Koloni özelliklerine dayanarak bir veya iki maya türünün ön identifikasyonu kromojenik agar besiyerleri ile yapılabilir. CHROMagar Candida (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD), Candida ID 2 (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France), Oxoid Chromojenic Candida agar (OCCA, Basingstoke, UK) ticari olarak temin edilebilen Candida türlerinin izolasyon ve tanımlanmasına yönelik kromojenik besiyerleridir. Bu besiyerlerinin içinde değişik kromojenik substratlar vardır. Bu besiyerlerinin çoğu *C.albicans* tanımlamasında başarılıdır. Kromojenik substratın özelliğine göre *C.albicans* yeşil veya mavi koloniler oluşturur. *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*'nin oluşturduğu kolonilerinin renklerine göre tanımlamada yararlıdır (31,32). Diğer türler ise çoğunlukla pembe-beyaz koloniler oluşturarak, bu besiyerlerinde tanımlanamazlar.

2.1.1.B. Tanımlamada kullanılan hızlı testler(≤24 saat)

İster genel amaçlı, ister kromojenik besiyeri olsun Candida türlerinin ayrımında koloni morfolojisi yeterli değildir ve farklı testlere ihtiyaç vardır. Bunlardan bir kısmı koloni oluşumu ile aynı gün içinde sonuçlanabilen hızlı testlerdir. Bu testlerden çimlenme borusu (germ tüp) hariç diğerleri, mantarların oluşturdukları eksoenzimler aracılığı ile tanımlama yapan reaksiyonlardır. Testler çabuk sonuçlanmakla beraber enzimatik reaksiyonlarda her zaman hata mümkün olduğundan, tanımlama güvenilir testlerle doğrulanmalıdır (33).

2.2. Tanı Testleri

2.2.1.Germ tüp Testi

C.albicans'ın hızlı ön identifikasyonu için kullanılan en değerli ve basit testlerden biri germ tüp testidir. Test ön identifikasyonu sağlar, çünkü tüm Candida kökenleri germ tüp pozitif değildirler. *C. dubliniensis* izolatlarının çoğunun ticari sentetik germinasyon besiyerinde germ tüp oluşturmamalarına rağmen *C.dalbicans* germ tüp pozitifdir (33). Testin sonuçlanması 3-4 saatlik bir süre gerektirir. Şüpheli koloni steril serum (koyun, sığır veya insan) içinde süspanse edilerek 37°C'de üç saat tutulur ve gerçek hif başlangıcı olan çimlenme borusu mikroskop altında görüldüğünde, izolatın *C. albicans* ya da *C.dubliniensis* olduğuna karar verilir. Testin özgüllük ve duyarlılığı oldukça yüksektir ve *C.albicans* suşlarının %95-97'si çimlenme borusu oluşturur. Bilinen bir *C. albicans* kültürünün pozitif olarak kullanılmasının yanı sıra, *C.tropicalis* ve *C. glabrata*'nın kullanıldığı negatif kontroller de testte yer almalıdır. *C. tropicalis* germ tüpe benzer yapılar oluşturduğu zaman, hücrelerin

ancak %15'inden azı bunu yapar ve bazen yanlış değerlendirmeye neden olabilir. Ancak çimlenme borusuna benzeyen bu yalancı hiflerin, maya hücresinden çıktığı yerde bir daralma görülür. Oysa bu daralma *C. albicans*'ın çimlenme borusunda görülmemektedir.

2.2.2. Trehaloz testi

Hızlı trehaloz testi ile *C. glabrata*'nın ön identifikasyonu 3 saat içinde yapılabilir. *C. glabrata*'nın hızlı tanımlanması, flukonazol ve diğer azollere dirençli olabilmesi açısından önemlidir. Trehaloz, diğer Candida türleri ve farklı mayalar tarafından da hidrolize edilebilen bir şeker olmakla beraber, *C. glabrata* tarafından hızlı bir şekilde yıkılır. Trehalozun hızlı yıkımı için geliştirilen çeşitli ticari kitler(*Glabrata* TTT=fumouze/France, *Glabrata*Quick=Hardy Lab/USA)bulunmaktadır. Oda ısısında 20 dakika bekledikten sonra trehaloz kuyucuğunda turuncu bir rengin olması durumunda izolatin *C. glabrata* olduğu anlaşılır (34).

2.2.3. Hızlı Tanıma Diğer Sistemler

Bu sistemler sadece *C. albicans* ya da *C. glabrata*'ya özgü olmayıp daha fazla türü kapsamaktadır. Bunlar daha çok enzimatik testler olduğu için ve de tür sayısı arttıkça özgüllük ve duyarlılığında sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu sistemlerde mantarların salgıladığı aminopeptidaz, lipaz, fosfataz, esteraz, üreaz, beta- fukosidaz, alfa-galaktosidaz gibi enzimlerin etkilediği substratlar kullanılmaktadır. Özellikle flukonazol tedavisi alan hastada *C. albicans*'ın *C. dubliniensis*'ten ayırt edilmesi önemlidir. Çünkü azol baskısı altında olan *C. dubliniensis*'te azol direnci indüklenabilir. Bu iki türü birbirinden ayırmak için, tek başına uygulanabilecekbirkaç test önerilmiştir. Bunlar arasında 45°C'de *C. albicans* üremesi; 2,3,5-trifeniltetrazolium klorürün indirgenmesi (*C. dubliniensis*'te pozitif), β galaktosidaz oluşturma (*C. albicans*), CHROMagarda koyu yeşil renk oluşturma (*C. dubliniensis*), ve "Staib" agarda çok sayıda klamidokonidyum oluşturma (*C. dubliniensis*) gibi testler yer alır (35,39).

2.2.4. Tanımlamada kullanılan Diğer Morfolojik ve Fenotipik Testler(≥ 24 saat)

Bu testler tanımlamada daha geç sonuç vermekle beraber, güvenilirlikleri fazla olup birçok hızlı testin bu testlerle doğrulanması gerekmektedir. Morfolojik inceleme bütün fenotipik tanı testleri ile her zaman birlikte yapılması gereken testlerdir. Kişisel deneyim gerektirmekle beraber, fenotipik testlere ek bilgi oluşturmaları açısından çok yararlıdır. Fenotipik testlerin bir kısmında karbonhidrat ve nitrat asimilasyonuna dayanan testler kullanılırken, bir kısmında bunlara ek olarak enzimatik reaksiyonlar da kullanılmaktadır (27,30,40).

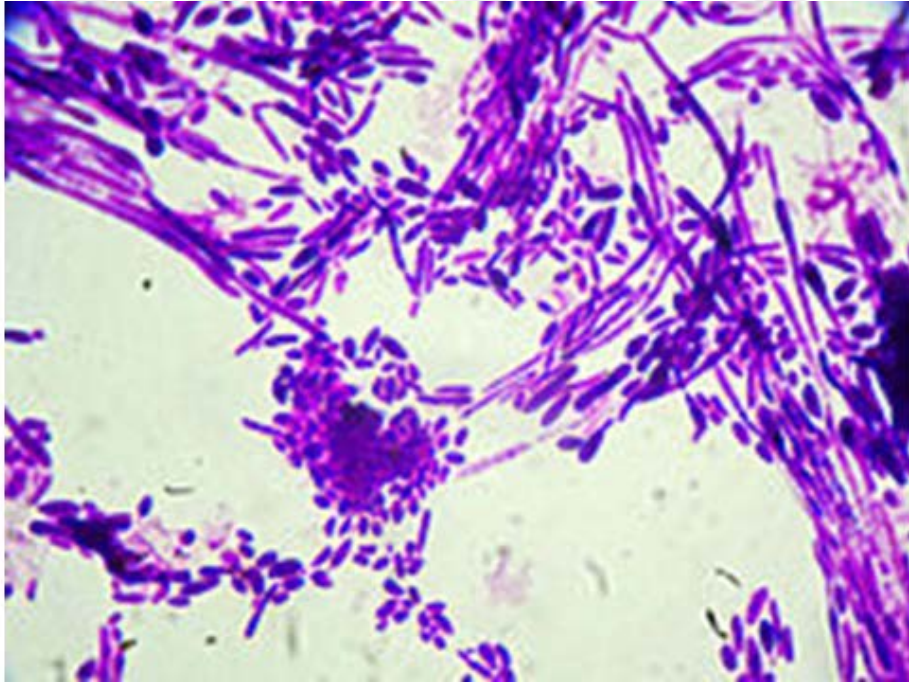
2.2.5.Morfolojik İnceleme

Candida türleri oksijen saturasyonu az olan ortamlarda yalancı hif üretimi arttırmakta ve bazı özel sporlar oluşturmaktadır. Bu yapıların incelenmesi tür tanımlanmasında oldukça önemli olup, bu amaçla tanımlanacak olan izolat, pirinç izolat,/tween-80 agar veya mısırunu/tween-80 agar gibi besiyerlerine “Dalmau tekniği” ile ekilir.Bu teknikte, bir öze dolusu maya kolonisinden besiyerinin ortasına çizgi şeklinde ekim yapılır.Daha sonra ilk çizgiye paralel ikinci ve üçüncü çizgiler çekilerek koloninin seyreltilmesi sağlanır ve ekim çizgileri üzerine steril bir lamel kapatılır. Plaklar 30°C’de 48 saat inkübe edilir ve mikroskop altında 100/400 büyütme ile ekim çizgileri incelenir. Kapatılan lamel ortamın oksijeninin azalmasını, tween-80 ise yüzey geriliminin düşmesini sağlamaktadır.

Bu şekilde yapılan inceleme ile *Candida* türleri ve diğer bazı mayaların tanımlanması için mikroskobik bulgular elde edilmektedir. Ancak en önemli yararı *C.albicans*ve *C. dubliniensis* tarafından oluşturulan klamidospor yapısının saptanmasıdır. Bu sporlar büyük (8-12µm), yuvarlak ve sitoplazması yoğun sporlardır. Polisakkaritten yapılmış kalın bir dış duvarı; protein ve çok miktarda lipid taşıyan bir iç tabakası vardır. Hiflerin içinde (ara klamidospor), kenarında (yan klamidospor), veya uçlarında (uç klamidospor) gelişebilir. 1995 yılında *C.dubliniensis*’in tanımlanmasından önce sadece *C. albicans*’a özgü kabul edilen bu yapı, aynen çimlenme borusu gibi son derece özgüdür. Bu iki türün oluşturduğu klamidospor görünümünde bazı küçük farklılıklar bulunmakta ve özellikle tekrarlayan orofaringeal lezyonlardan elde edilen izolatlarda bu küçük ayrıntılara dikkat etmek gerekmektedir. *C. albicans* genellikle gerçek veya psödohiflerin ucunda tek tek klamidosporlar üretir (Şekil 1). Buna karşın *C. dubliniensis*’in sporları çok daha bol ve çoğunlukla çiftler halinde veya üçlü, hatta bazen kümeler veya salkımlar oluşturarak farklı bir düzen gösterir (Şekil 2). Ancak buradan kesin ayrıma gitmek mümkün olmayıp, ileri testlere ihtiyaç duyulur (27,29,30,40).



Şekil 1: *Candida albicans*



Şekil 2. *Candida dubliniensis*

Klamidospor dışında diğer *Candida* türlerinin tanımlanmasını sağlayan çok tipik mikroskopik bir bulgu yoktur. Klamidospor saptanmadığı zaman diğer testlerle ileri tanı testlerine

gereksinim duyulur. Ancak bazı özellikler tanımlamada yardımcı olur. *C. glabrata* hif oluşturmeyen bir türdür. “Dalmau yöntemi” ile yapılmış ekimde, ekim çizgileri boyunca mikroskopik olarak hif yapısının olmaması *C. glabrata* lehine güçlü bir bulgudur. Ancak *Cryptococcus neoformans* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi diğer bazı maya morfolojisindeki mantarlar da hif oluşturmaz. Bununla beraber *C. glabrata* blastosporları tüm maya morfolojisindeki mantarlar arasında en küçük olanıdır. Sık rastlanan türlerden *C. tropicalis*’in tipik bir görüntüsü yoktur. *C. parapsilosis* ise mikroskopik olarak (10X) büyütmede, örümcek ağına benzeyen görüntüler oluşturabilir. Tanımlama da çok yardımcı olmakla beraber kesin değildir. Ayrıca *C. parapsilosis*’in dev hücreler (“giant cell”) denen iri blastospor ve hiflerini de görmek mümkün olabilir (29,30,40). *C. krusei* uzun blastosporlarla karakterize bir tür olup, görünümü ağaç dalına benzetilmiştir.

2.2.6. Asimilasyon ve fermantasyon testleri

Mayaların tür düzeyine kadarki identifikasyonunda esas dayanak noktası, karbonhidrat asimilasyon testidir. Bu test, bir mayanın oksijen varlığında belirli bir karbonhidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer. Karbon ve nitrojen kaynağının kullanılması sonunda besiyerlerinde ya bulanıklılık oluşur ya da indikatör varlığında değişen pH’ a bağlı besiyerinin rengi değişir. Oksijensiz olarak karbon hidratların kullanılması ise fermantasyon olup, gaz çıkışı karbonhidrat fermentasyonunun tek göstergesidir. *Candida* türleri tarafından fermente edilen bütün karbonhidratlar asimile edildiğinden, besiyerindeki indikatörün renk değiştirmesi fermantasyonu göstermez. Tersine geçerli olmayıp, asimile edilen karbonhidratların tümü fermente edilemediğinden asimilasyon testleri tanımlamada daha yararlıdır (12,27,29,30,40).

Günümüzde, rutin klinik izolatlar için klasik “Wickerman-Burton” yöntemi uygulanmaktadır. Yaklaşık 60 yıl önce ilk kez denenilen bu yöntemde, esas olarak sıvı besiyerleri kullanılmakla beraber, petri kutularında oksanografik modifikasyonu da uygulanabilir (27). Karbonhidrat asimilasyonu için “Yeast Nitrojen Base” besiyerine değişik karbonhidratlar konularak hazırlanan tüplere, tanımlanacak olan izolat eklenir. Uygun inkübasyondan (7-14 gün 30-37°C) sonra kontrol tüpüne göre değişik karbonhidratların bulunduğu tüplerdeki bulanıklık incelenerek izolatın karbonhidrat asimilasyon göstergesi olarak değerlendirilir. Nitrat asimilasyon testi ise karbonhidrat asimilasyon testine benzer. Bu test, bir mayanın nitratı tek

azot kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer. Nitrat asimilasyonunda “Yeast Carbon Base” besiyerine KNO_3 konularak hazırlanan tüpler kullanılır. “Wickerman-Burton” yöntemi Adams ve Coopertarafından modifiye edilmiştir (41). Prensip aynı olmakla beraber, ortama indikatör olarak bromkresol moru eklenerek asimilasyon sonrası mor rengin sarıya dönmesi sağlanır. Böylece karbonhidratın kullanıldığı bulanıklılığa göre daha rahat anlaşılır.

Klasik olarak maya fermentasyonunda kullanılan besiyeri “Yeast Ekstrakt”, pepton, indikatör olarak brom timol mavisi ve incelenecek karbonhidratları içerir. Ortama ters olarak “Durham” tüpü konur ve tüpün içinin besiyeri ile tamamen dolması sağlanır. Tanımlanacak suş eklendikten sonra 10-14 günlük inkübasyondan sonra “Durham” tüpünün içindeki gaz oluşumunun olup olmadığına bakılır. Söz edildiğigibi besiyerinin renginin değişmesi sadece karbonhidratın asimile edildiğini ve asit oluşturduğunu gösterir. Gaz oluşumu fermentasyonun bir göstergesidir (29).

2.2.7. Ticari Tanımlama Panelleri (≥ 24 Saat)

Klasik asimilasyon ve fermentasyon testleri, bahsedildiği gibi zaman alan ve laboratuvarlara aşırı iş yükü getiren testler olduğundan, çeşitli ticari tanımlama panelleri rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunların hiçbirinin, klasik asimilasyon-fermantasyon testleriyle veya birbiriyle tamamen uyumlu olması beklenemez. Bunların bir kısmı (API20C ve API ID 32C= BioMerieux/France) aynen klasik yöntem gibi asimilasyon temeline dayanır; bir kısmı ise (VITEKL 2 YST=bioMerieux/France, Phoenix yeast ID=Dickonson /USA) değişik karbonhidratların asimilasyonu yanı sıra bazı enzimatik reaksiyonları da içerir. Sadece asimilasyona dayanan sistemlerde sonuçlar genellikle en erken 48 saat sonra alınırken, enzimatik reaksiyonları destek alan sistemlerde 24 saat içinde sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle bu sistemlere ilgi giderek artmakta olup, rutin laboratuvarlarda daha çok kullanılması hedeflenmektedir.

2.2.8. Moleküler Yöntemler

Mayalar için geniş kapsamlı bir genetik identifikasyon sisteminin geliştirilebilmesi için kıyaslamada kullanılabilecek en tekrarlanabilir, özgül ve duyarlı sekansın belirlenmesi gerekmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmaların çoğu rRNA gen bölgeleri üzerine yoğunlaşmıştır.

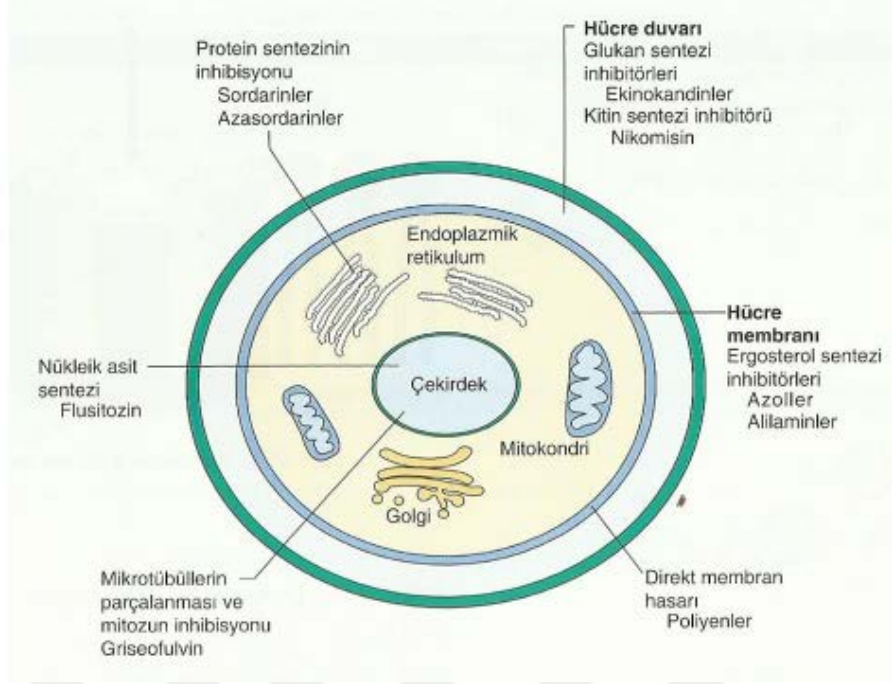
Birçok laboratuvarında bu teknolojileri mikoloji için geliştirecek sekanslama ekipmanı veya olanakları yoktur; ancak identifikasyona yardımcı olabilecek başka DNA tabanlı yöntemler bulunmaktadır.

2.3. Antifungaller

Sistemik antifungallerin uygulama alanına girmesi 1950'li yıllarda başlamış, ancak sayıca artışları antibakteriyel maddelerin gerisinde kalmıştır. Bakteriler, prokaryotik yapıda olduğundan insan hücresinden farklı yapıda metabolik hedefleri vardır. Mantarlar, ökaryotik canlılar olduğundan dolayı mantara toksik olan insan hücresine de toksik olabilir(42,43).

Antifungal tedavi son yıllarda büyük bir değişim göstermektedir. Mantar hastalıklarının tedavisinde, önceleri sadece, toksik etkileri fazla ve kullanımları zor olan amfoterisin B ve 5-fluorositozin (flusitozin, 5-FC) kullanılmıştır. Günümüzde, daha az toksik ve daha geniş spektrumu olan yeni antifungal ilaçlara gereksinim duyulmuştur. 1990'ların başında yeni triazol türevlerinin kullanılmaya başlanması ile yeni tedavi seçenekleri ortaya çıkmıştır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç gelişiminin gözlenmesi araştırmacıları mevcut ilaçlarda yeniliklere ve farklı mekanizmaları kullanan yeni antifungal ajanların keşfine yöneltmiştir. Tedavi seçeneklerinin bu denli genişlemiş olmasına karşın antifungal ajanların yaygın kullanımı ile, bir veya birkaç ajana dirençli fungal patojenler ortaya çıkmıştır (44,45).

Vorikonazol, posakonazol gibi yeni azol türevlerinin geliştirilmesi ve mantar hücre duvarına etkili olan ekinokandin grubu antifungallerin keşfi ile yeni antifungaller elde edilmiştir. Halen mevcut olan antifungal sayısı yeterli olmayıp kısıtlı sayıda antifungal vardır (46,48).



Şekil 3: Antifungal ilaçların etki bölgeleri.(48)

Yeni jenerasyon antifungal ajanların geliştirilmesinde iki hedef vardır. Bir bu infeksiyonun patogenezi daha iyi anlayabilmek için potansiyel hedefleri belirlemek, diğeri ise insan hücrelerine zarar vermeden maya hücrelerini selektif olarak inhibe edebilen, intrinsik insan savunma mekanizmalarından (rekombinant antikor) yararlanmaktır (44-49).

Sistemik fungal infeksiyonlar için kullanımda veya geliştirilmekte olan ilaçlar ve etki mekanizmaları tablo I 'de özetlenmiştir (48).

Tablo 1: Kullanımda veya gelişim aşamasında olan sistemik etkili antifungaller

Antifungal Ajan	Etki mekanizması
Polijenler (amfoterisin B ve lipidli formülasyonları, lipozomal nistatin)	Mantar hücre membran ergosterolüne bağlanarak direkt oksidatif membran hasarı oluşturur
Antimetabolitler (5-florositozin)	DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu
Azoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol, isavukonazol)	Sitokrom P450 bağımlı 14 alfa lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini durdururlar
Ekinokandinler (kaspofungin, mikafangin, anidulafungin, aminokandin)	1,3- β -D-glukan sentezini inhibe ederek hücre duvar yapımını bozarlar

2.3.1 Amfoterisin B ve Lipit formülasyonları

Polyen grubu antifungalolan amfoterisin B Gold ve arkadaşları tarafından 1955’de *Streptomyces nodosus*’dan üretilmiş ve 1960’da uygulama alanına girmiştir (46,50). AMB, hidrolik bir polihidroksil zinciri ile lipofilik bir poliyen hidroksikarbon zinciri içeren amfoterik bir bileşiktir (51). Amfoterisin B, fizyolojik pH’da ve suda iyi çözünmez. Ayrıca oral ve intramusküler emilimi iyi değildir (48).

Amfoterisin B, mantarın hücre yapısında bulunan ergesterole yüksek afinite ile bağlanması sonucunda mantarın hücre membranında iyon kanalları ya da porlar oluşturur. Bu yapılardan mantarın hücre içeriğinin dışarı sızması sonucunda hücrenin ölümü gerçekleşir (42,48,52).

Amfoterisin B sistemik ve lokal kandidiaziste kullanılır. Sistemik kandidiazis ile aspergillozis, mukormikozis, kriptokokkozis, dissemine histoplazmozisde en sık tercih edilen ilaç olup fungusid etkilidir. Mantarların hücre membralarındaki ergesterol sentezini azaltarak,

Amfoteresin B'yedirençli hale geldikleri düşünülmektedir.Oral kullanımda emilimi iyi değildir, metabolize olmaz ve lipid den zengin dokularda birikir (44,53).

Geniş spektrumlu ve fungusidal olmasından dolayı amfoterecin B yaşamı tehdit eden ciddi mikozların tedavisinde kullanılan bir antifungaldir.Amfoterecin B Candida türleri, *C. neoformans*, *Aspergillus* türleri, zigomiçetler, endemik dimorfik mantarların birçoğuna etkilidir.

2.3.2. Azoller

İlk kez 1944'de Wooleyn tarafından sentez edilmiş olup, 1981'de bir imidazololan ketokonazol; 1990'da flukonazol, 1992'de itrakonazol, 2002'de vorikonazol ve 2006'da posakonazol triazol bileşikleri olarak FDA'dan onay alarak uygulanım alanına girmişlerdir (50). Bu grup içerisinde imidazol(azol halkasına 2 nitrojen) ve triazol(azol halkasına 3 nitrojen)olmak üzere iki grup vardır.İmidazoller arasında sadece ketokonazolün sistemik etkinliği varken triazol(flukonazol,itrakonazol,vorikonazol,posakonazol) grubunda bulunan tüm antifungallerin sistemik etkinliği vardır (48,51).

Azollerin etki mekanizması lanosterolün ergasterole dönüşümünden sorumlu olan sitokrom P450'ye bağımlı olan C14 α -demetilazı inhibe etmek yoluyla olur.Bu süreç fungal organizmalar için gerekli ergasterolü azaltır.Sterol birikmesine fungal hücre metabolizması dayanamaz(fungustatik). Ayrıca endojen respirasyonun inhibisyonu, membran fosfolipidleri ile toksik etkileşim, mayaların miçel forma dönüşümünün inhibisyonu diğer etki mekanizmalarını oluşturur. İnsan hücrelerindeki sitokrom P450 enzimi ile etkileşime girerek bazı metabolik olaylarda bozulmaya yol açarlar. Adrenal ve gonad steroid hormonlarının sentezini bozarlar(44,57).

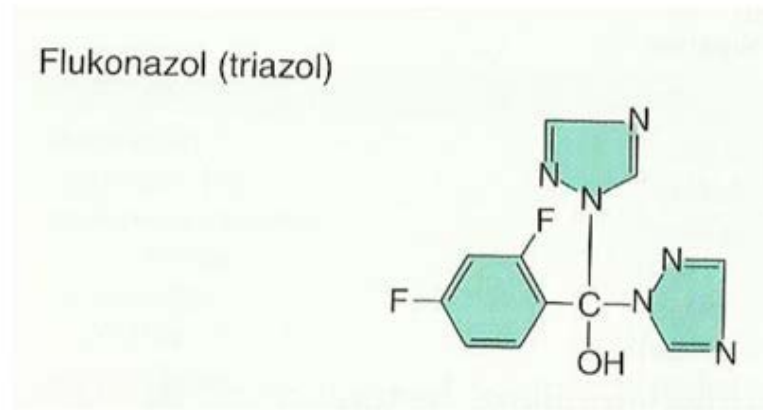
Mantar enfeksiyonlarının tedavi ve önlenmesinde azollerin, özellikle flukonazolün yaygın şekilde kullanımı, bu sınıftaki antifungal ilaçlara karşı ortaya çıkan direnç bildirimlerinin artmasına neden olmuştur. Candida türlerindeki azol direnci; ilacın hedefindeki enzimlerin miktar ve kalitesinde değişiklik, ilacın hedef bölgeye girişinin azalması ya da bu mekanizmaların çeşitli kombinasyonları sonucu gelişebilir. Bu şekilde, hedef enzim olan Lanosterol 14– α -demetilazı kodlayan gendeki (ERG11) nokta mutasyonları, hedef değişikliğine yol açarak azollere olan afiniteyi azaltır.ERG11'in aşırı ekspresyonu , hedef enzimin aşırı üretimi ile sonuçlanır ve bu da, hedefteki enzim moleküllerinin tümünün inaktif

hale getirilmesi için hücre içinde ilacın daha yüksek konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmasına yol açar.(42,59)

2.3.2.1. Flukonazol

Flukonazol, özellikle kandidoz tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antifungaldir. Flukonazol, suda çözünür,oral biyoyararlanımı yüksek olan birinci kuşak Triazol antifungaldir. Proteine bağlanması düşük olup santral sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm organ ve dokulara yayılır. (48,51,52) Hem oral hem de intravevöz formunun olması, hepatik, gastrik ve endokronolojik yan etkilere düşük oranlarda yol açması ve BOS'a iyi geçmesi başlıca avantajlarını teşkil etmektedir (66). Uygulanmasının ardından hemen bütün organ ve dokulara dağılım gösterir. Bir önemli özelliği ise suda çözünürlmesi nedeniyle BOS'a kolayca geçebilmesidir (67).

Lipofilik yapıdaki biyoyararlanımı bozuk olan ketokonazol ve itrakonazole göre nispeten daha küçük, suda eriyebilen bir moleküldür ve yüksek oranda absorbe olur (68).



Şekil 4: Flukonazolun kimyasal yapısı (48)

Fluconazol birçok *Candida* türüne ve *C. neoformans*'a karşı etkilidir. *Candida* türlerinden *Candida krusei* flukonazole dirençlidir (69). *C. glabrata* suşlarının flukonazole duyarlılığı ise önemli ölçüde değişkenlikler göstermektedir (70). *C. tropicalis*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis* ve *C. inconspicua* türlerinin bazı suşlarına karşı da yüksek flukonazol MİK

değerleri saptanmıştır(71,72). Bu türlerin dışında da her Candida türü içinde flukonazole dirençli suşların mevcut olması muhtemeldir. AIDS tanısı konmuş hastalarda uzun süreli flukonazol kullanımında izole edilen suşlarında dirençli paternler izole edilmektedir.(73)

Flukonazol, kandidoz, kriptokokkoz ve koksidyoidomikoz tedavisinde kullanılmaktadır, öte yandan Histoplazmoz, blastomikozve sporotrikoz tedavisinde ise ikinci bir seçenek olarak kullanılmaktadır (74). Flukonazol, transplant hastalarında (75) ve kriptokokkal menenjit tanısı konmuş AIDS olguları gibi (76) yüksek risk grubundaki hastalarda, profilaksi ve kronik supresyon tedavisine yönelik yaygın kullanım mevcuttur.

Flukonazol tedavisinde yan etkiler ve toksik reaksiyonlar nadir olarak gözlenmektedir. Flukanazol tedavisi esnasında alerjik reaksiyonlar, anjiyoödem trombositopeni ve alopesigelişebilir (77, 79).

2.3.2.2. Ekinokandinler

Ekinokandinler, bazı mantarların fermentasyonundan elde edilmiş olan semisentetik lipopeptid yapısında antifungallerdir. Ekinokandinler 1,3-β-D -glukan sentazi hızlı ve geri dönüşümsüz bağlanıp mantar hücre duvarının temel bileşimi olan 1,3-β-D- glukan sentezini inhibe ederler. Mantar hücre duvarı sentezlenemediğinden dolayı mantara karşı fungusidal etkili antifungallerdir.1,3-β-d-glukan sadece mantar hücresinin yapısında bulunduğundan sadece mantar hücrelerine toksik etkisi olmaktadır (48,60).

Fungusidal özellikte olan bu grup esas olarak diğer antifungallere dirençli suşlar da dahil olmak üzere Candida'ya etkilidir. *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*'ye etkinlikleri az, *C. neoformans*'a etkisizdirler. Aspergilluslar' a etkinliği söz konusudur, fakat çoğalmakta olan hiflere etkisi sınırlıdır (61-62-63-64-65).

Kaspofungin en çok klinik uygulaması olan ekinokandin türevidir. Proteine bağlanma oranları yüksek olup beyin omurilik sıvısındaki konsantrasyonları düşük olmakla beraber, tüm organlara yayılabilirler. Ekinokandinlerin tüm türevleri çok iyi tolere edilmektedir. Diğer ilaçlarla etkileşimi söz konusu değildir (52).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Araştırma tipi

Deneyisel model çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Yüksek Lisans tez araştırması Temmuz 2016- Ağustos 2017 tarihleri arasında, TS EN ISO 15189 Tıbbi Laboratuvarlar- Kalite ve Yeterlilik için Özel Şartlar Standardı' na göre TÜRKAK tarafından akredite edilen Dokuz Eylül Üniversitesi Hatanesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Mikrobiyal Konfirmasyon Laboratuvarı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 4044 No' lu Laboratuvar' da gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Çalışma Grupları

3.3.1.Çalışmada Kullanılan Suşlar:

ATCC 10231 Candida albicans ve *CD36 Candida dubliniensis* suş kullanılmıştır.

3.3.2. Gazla Ayrıştırma (GC) Kontrol Suşları

Pozitif Kontrol Suşu: *DSM 1117 Pseudomonas aeruginosa*

Negatif Kontrol Suşu: *Ayıraçlar ("reagent blank")*

3.3.3. Kalibrasyon Materyali

Gazla Ayrıştırma için; "MID-1300-AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries",

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 4044 No' lu laboratuvarda koleksiyon suş olarak bulunan *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD 36 Candida dubliniensis* suşları tez araştırmasında kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın değişkenleri yoktur

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Sarf Malzemeleri

Tezde Kullanılan Sarf Malzemeler	Kullanım Amacı
Petri kabı	Mikroorganizma kültürü için besiyeri hazırlamada
Steril öze	Mikroorganizmaları pasajlama, toplama işlemlerinde
15 mL cam tüpler	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
Pastör pipeti	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
Mavi uçlu pipet	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
Amber vial	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
“insert”	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
Tezde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	Kullanım Amacı
6.00N Hidrojen klorür (HCl)	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
“HPLC grade isopropyl alkol”	Yağ asidi ayrıştırma işlemlerinde
Sodyum hidroksit (certified ACS)	Yağ asitlerinin ayrıştırılmasında
% 50 Sülfirik Asit	Yağ asitlerinin ayrıştırılmasında
“Hexane (HPLC Grade)”	Yağ asitlerinin ayrıştırılması ve analizinde
“Methyl-tert-butyl ether (HPLC Grade)”	Yağ asitlerinin ayrıştırılmasında
Sodyum hidroksit (NaOH)	Yağ asitlerinin ayrıştırılmasında
Sodyum klorid (NaCl)	Yağ asitlerinin ayrıştırılmasında
Sabouraud Dextrose Agar	Maya kültürlerinde

3.6.2. Cihazların Listesi

Tezde Kullanılan Cihazlar	Kullanım Amacı
Laminar Class II B2 / Esco (HEPA/ULVA filitreli)	Biyolojik örneklerin hazırlanması ve işlenmesi
- 80 soğutucu / New Brunswick Scientific U410	Biyolojik örneklerin uzun süreli stoklanması
-20 soğutucu /	Biyolojik örneklerin uzun süreli stoklanması
+ 4 Buzdolabı / Ariston	Biyolojik örneklerin kısa süreli saklanması
Soğutmalı santrifüj /Sigma	Biyolojik örneklerin hazırlanması ve işlenmesi
Normal etüv /Heraus	Biyolojik örneklerin inkübe edilmesi
Otoklav / Hirayama	Çalışmalarda kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu, besiyerlerinin hazırlanması
Gaz kromatografisi /MIDI sistem	Yağ asiti profillerinin analizi
Su banyosu / Memmert	Moleküler örneklerin hazırlanması, biyolojik örneklerin yağ asiti incelemesi için hazırlanması
Vorteks	Moleküler örneklerin hazırlanması, biyolojik örneklerin yağ asiti ve mikolik asit incelemesi için hazırlanması

3.6.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.6.3.1. Mikroorganizmaların Üretilmesi

Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sisteminde önerildiği gibi, gazla ayrıştırma ile yağ asidi analizine göre tanımlama için *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD36 Candida dubliniensis* suşları 28⁰C’ de “Sabouraud DextroseAgar” da 24 saat inkübe edildi (80).

3.6.3.2. Antifungal Agar Proporsiyon Uygulaması

ATCC 10231 Candida albicans ve *CD36 Candida dubliniensis* suşları ayrı ayrı 24’ lük hücre kültür plaklarında 128 – 4 mikrogram / mL flukonazol içeren SDA agarlara ekilecek ve 28 derecede 12 ve 24 saatlik aralıklarla enkübe edilmiştir (81).

İşlemin ilk basamağında önce Flukonazol’ü 128 – 4 mikrogram /mL yoğunluklarında RPMI 1640 içerisinde çözüldürdükten sonra bu konsantrasyonlarda Flukonazol etken maddesi eklenerek, 24’lük hücre kültürü plaklarına önce SDA agar (her kuyucuğa 3’er ml olacak şekilde) ilave edilip azalan konsantrasyonlarda flukonazol eklendikten sonra inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez yöntemin geliştirilmesinde, sonra da 3 kez olmak üzere 6 kez tekrarlanmıştır (81).

3.6.3.3. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi

Gazla ayrıştırma ile yağ asiti profillerinin analizine göre *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD36 Candida dubliniensis* suşlarının tanımlama yönteminin başlangıç işlemleri Dokuz Eylül Üniversitesi TıpFakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 4044 No’ lu laboratuvarda Laminar Class 3(Biyogüvenlik Düzeyi 3 kabin koşulları) olan güvenlik kabininde çalışılmıştır. Yağ asitlerin ayrıştırılması için gerekli olan ayıraçları hazırlandı (Tablo 2). Yağ asit analizine göre *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD36 Candida dubliniensis* suş kullanılmıştır. Tanımlama yöntemi kültürden örnekleri toplama, sabunlaşma, metilasyon, ekstraksiyon, yıkama ve analiz olmak üzere altı işlembasamağından oluşmaktadır (80).

Tablo 2: Gazla Ayırıştırma ile Yağ Asiti Profillerinin Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

Ayıraç 1	45 g Sodyum Hidroksit 150 mL Metanol (HPLC grade) 150 mL Deiyonize Distile Su
Ayıraç 2	325 mL 6.00 N Hidroklorik Asit 275 mL Metanol (HPLC grade)
Ayıraç 3	200 mL Methyl tert-butyl ether (HPLC Grade) 200 mL “Hexane (HPLC Grade)”
Ayıraç 4	10.8 g Sodyum Hidroksit 900 mL Deiyonize Distile Su

Toplama: Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sisteminde önerildiği gibi üreme görülen kültür plaklarında üçüncü ekim çizgisindeki mikroorganizmalardan bir öze (40 mg) örnek tüpe alındı

Sabunlaşma: 1.00 mL ayıraç 1’den eklenerek 5- 10 saniye kadar vortekslenerek, 100⁰C’ deki su banyosunda 5 dakika bekletildi. Bu aşamadan sonra bakteri kültüründen alınan örnek canlılık- enfektif özelliğini yitirdiği için “**Biyogüvenlik Düzeyi 1**” örneğe dönüşmektedir. Su banyosundan alınan tüpler beş- 10 saniye vortekslendi ve 25 dakika 100⁰C’ deki subanyosunda bekletildi.

Metilasyon: Oda ısısında soğutulan tüplere 2.00 mL ayıraç 2 eklenip, 5- 10 saniye vortekslendi ve 80⁰C’ de 10 dakika bekletildi.

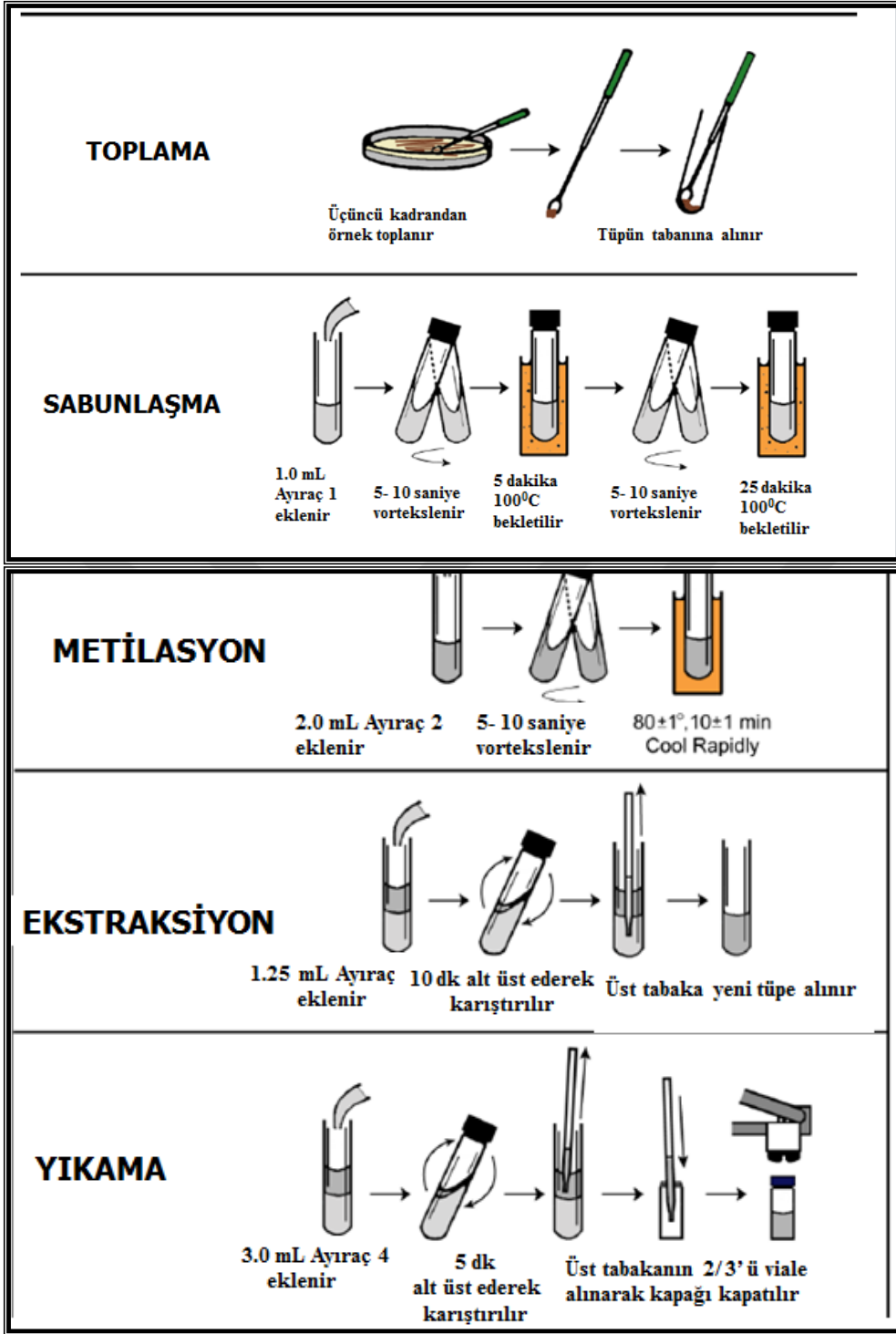
Ekstraksiyon: Oda ısısına gelen tüplere 1.25 mL ayıraç 3 eklenerek 10 dakika rotorda karışması sağlandı. Rotasyondan sonra tüpte ayrılan iki faz ayrımı gözlendi, üst faz yeni tüpe alındı.

Yıkama: Üst fazın alındığı tüpe 3.00 mL ayıraç 4’ den eklenerek, beş dakika rotorda karışması sağlandı. Rotasyondan sonra üst fazın 2/3’ ü amber viallere alındı.

Analiz: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyal Konfirmasyon Laboratuvarı'ndaki "Gazla Ayırıştırma" cihazında analiz edildi. Örneklerin piklerinin yüksekliklerinden elde edilen ham kromatografik data, "ChemStation Software" kullanılarak işlemlendi ve "Sherlock Software" kullanılarak yorumlandı. "Toplam Yağ Asiti Pikleri" ("Total Fatty Acid Peaks") her suş için belirlendi ve yağ asiti profillerine göre oluşturulmuş olan suşlardan oluşan kütüphane ile karşılaştırılarak tanımlama yapıldı. (Sherlock, 2012).

Sistemin kontrolü: Sistemin çalışması yani analiz işleminin gerçekleşebilmesinde cihazın analize başlaması için hazır olup olmadığı ve her 10 örnekte bir cihazın düzgün çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için kalibrasyon materyali olarak "MID-1300-AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries" kullanıldı. Cihazın şartlanmış olduğu sistemde kalibrasyon okuması gerçekleşmediği koşullarda sistem kendini kapattı. Kapatma işlemi gerçekleştiği durumlarda sistemin çalışma basamakları ve kalibrasyon materyali kontrol edildi (80).

Her tanımlama işleminde pozitif kontrol olarak: *DSM 1117 Pseudomonas aeruginosa* suşu, negatif kontrol olarak ayıraçlar ("reagent blank") kullanıldı.



Şekil 2: Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi (80)

3.7. Araştırma Planı

TARİH	PLANLANAN ÇALIŞMA
Ocak Haziran 2016	Literatür araştırması ve ön hazırlığın yapılması
Haziran – Eylül 2016	Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Sözleşmesinin yapılması, Etik Kurul izninin ve Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu izninin alınması
Kasım- Aralık 2016	Deneysel Araştırmanın Gerçekleştirilmesi
Şubat- Nisan 2017	Araştırma verilerinin analiz edilmesi ve değerlendirilmesi
Nisan- Ağustos 2017	Yüksek Lisans Tezinin yazılması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Gazla ayrıştırma yöntemine göre yağ asidi profiline göre ATCC 10231 *Candida albicans* ve CD36 *Candida dubliniensis* suşların tanımlanmasının yapılmasında sistemin çalışması için eğitimler 27- 29 Mart 2013 tarihleri arasında alınmıştır.

Gazla ayrıştırma yöntemi ile yağ asidi profillerine göre anaerob bakteritanımlaması için FDA onayı: 50(k) Number: kO52485”Gazla ayrıştırma yöntemi ile yağ asidi profillerine göre anaerob bakteritanımlaması için “Association of Analytical Communities, (AOAC)” onayı: 2004.11Gazla ayrıştırma yöntemi ile yağ asidi profillerine göre aerob bakteritanımlaması için CDC onayı: “0801.Issue1: 15 January 1998.Methods:0801, Issue1”

Sistemin kontrolü yöntem içinde tanımlıdır ve değerlendirme tanımlı yöntem gereği yapılmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıkları yoktur

3.10. Etik Kurul Onayı

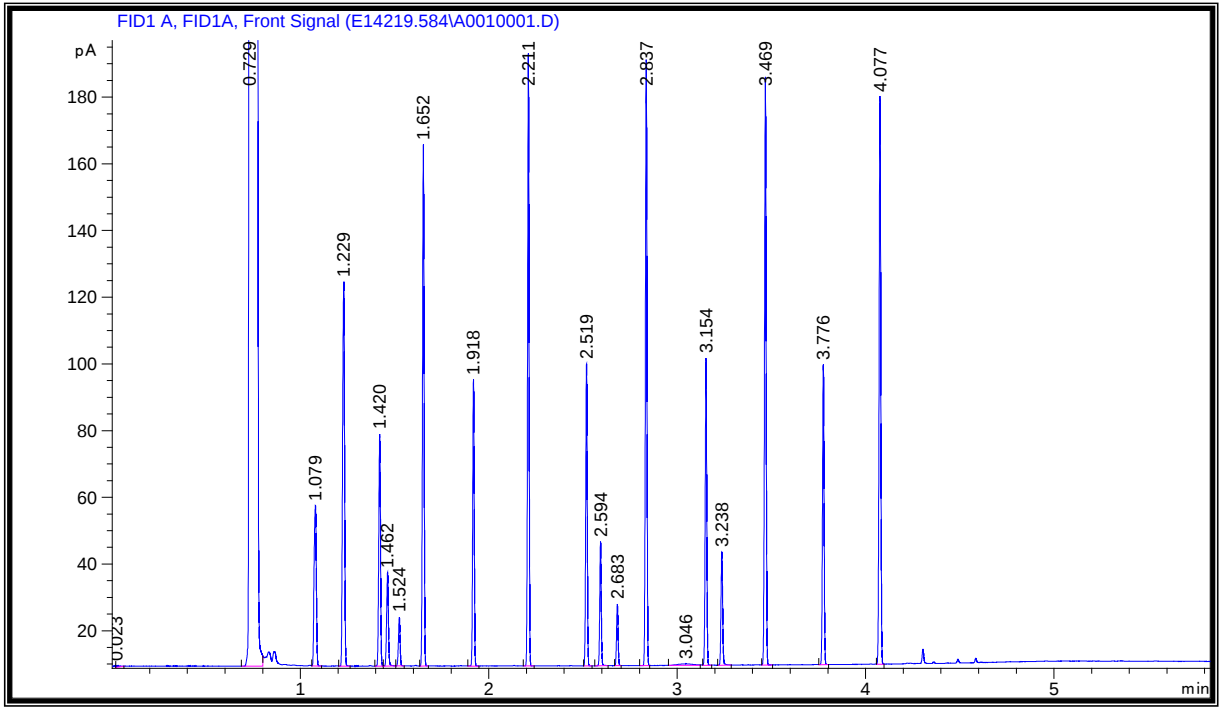
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmalı Etik Kurulu'nun 28.07.2016 tarihli toplantısında 2016/21-03karar numarası ile araştırmanın etik kurul onayı alınmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi

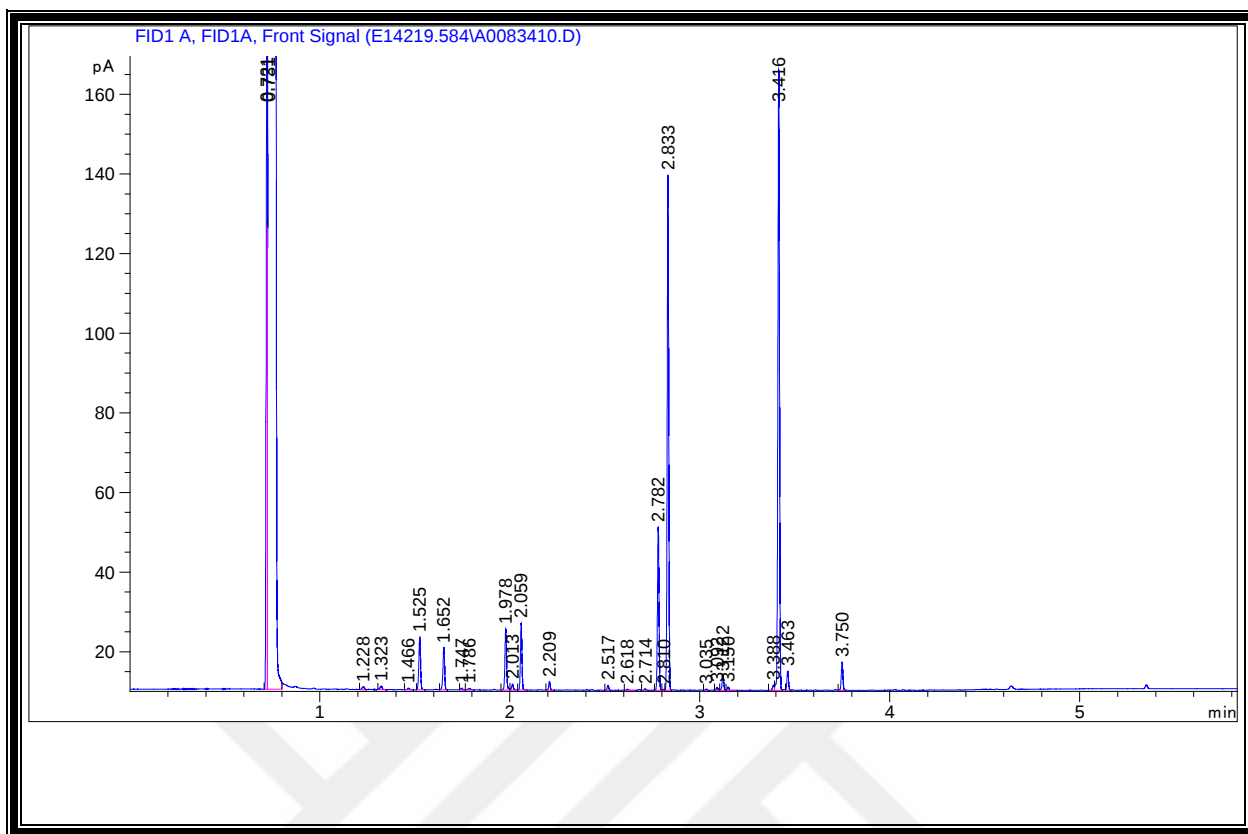
Gazla ayrıştırma analiz yöntemi sisteminin çalışmaya hazır olup-olmadığını denetlemek için kullanılan “MID-1300-AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries” sonucu sistemin çalışmaya hazır olduğunu göstermiştir (Şekil 2).



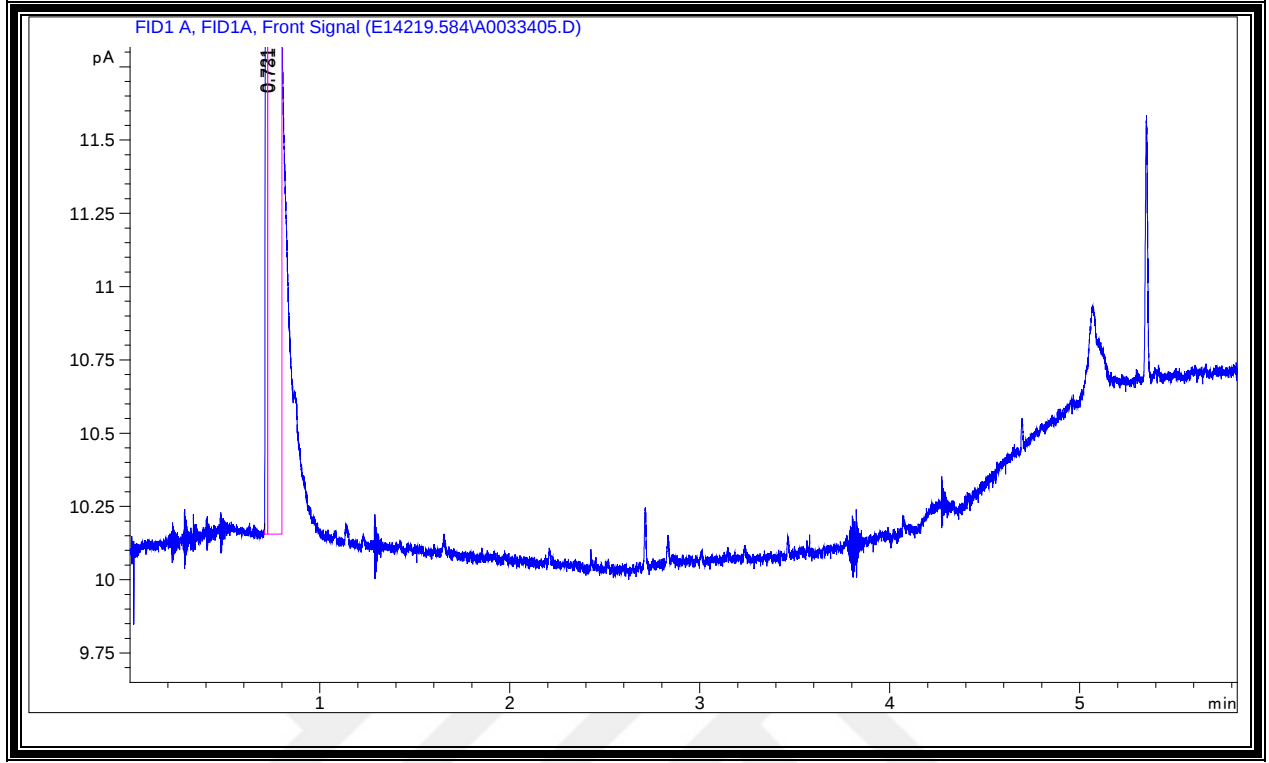
Library	Sim Index	Entry Name
RCLIN6 6.10	0.996	MIDI Calibration Mix 1

Şekil 5: Gazla Ayrıştırma Yönteminin “MID-1300-AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries” sonucu

Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sisteminde önerildiği gibi, kanlı agarda üretilen pozitif kontrol suşu *DSM 1117 Pseudomonas aeruginosa* ve negatif kontrol *Ayıraçlar* (“reagent blank”) kromatografik sonuçları sistemin doğru çalıştığını göstermektedir (Şekil 3).



Library	Sim Index	Entry Name
RCLIN6 6.10	0.944	<i>Pseudomonas-aeruginosa</i>



*** Library match not attempted negatif kontrol sonucu ("reagent blank")

Şekil 6: Gazla Ayırıştırma Yönteminin pozitif kontrol *DSM 1117 Pseudomonas aeruginosa* ve negatif kontrol *Ayıraçlar* ("reagent blank") kromatografik sonuçları

Tablo 3: ATCC 10231 *Candida albicans* ve CD36 *Candida dubliniensis* YST28 kütüphanesindeki karşılaştırması

STRAIN	PASAGE	TOTAL RESPONSE	PERCENT NAME	TOTAL NAME	METHOD	LIBRARY	COMPARISON CHART	DISTANCE
C.albicans	1.pasaj	126494	79.88%	101050	SYEAST6	YST28	C. albicans GC subgroup A	11557
C.albicans	1.pasaj	59020	58.36%	34444	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.albicans	1.pasaj	88246	73.74%	65076	SYEAST6	YST28	C. albicans GC subgroup A	15657
C.albicans	2.pasaj	59260	55.35%	32800	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.albicans	2.pasaj	54079	67.82%	36677	SYEAST6	YST28	Lipomyces- strakeyi	23332
C.albicans	2.pasaj	73986	76.62%	56691	SYEAST6	YST28	C. albicans GC subgroup A	12228
C.albicans	3.pasaj	78515	75.49%	59273	SYEAST6	YST28	C. albicans GC subgroup A	12084
C.albicans	3.pasaj	71733	76.09%	54578	SYEAST6	YST28	Lipomyces- strakeyi	20808
C.albicans	3.pasaj	44323	60.92%	27001	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.dubliniensis	1.pasaj	60566	67.38%	40811	SYEAST6	YST28	Kluyveromyces-maexianus var.lactis	16318
C.dubliniensis	1.pasaj	52893	73.48%	38867	SYEAST6	YST28	C. albicans GC subgroup A	16946
C.dubliniensis	1.pasaj	54543	60.93%	33234	SYEAST6	YST28	Lipomyces- strakeyi	25664
C.dubliniensis	2.pasaj	49173	30.23%	14863	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.dubliniensis	2.pasaj	75507	65.54%	49490	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.dubliniensis	2.pasaj	32733	54.85%	17953	SYEAST6	YST28	not matches found	
C.dubliniensis	3.pasaj	76587	74.32%	56916	SYEAST6	YST28	Kluyveromyces-maexianus var.lactis	10506
C.dubliniensis	3.pasaj	91232	66.70%	60847	SYEAST6	YST28	Kluyveromyces-maexianus var.lactis	9.102
C.dubliniensis	3.pasaj	84697	78.63%	66599	SYEAST6	YST28	Kluyveromyces-maexianus var.lactis	9.251

Tablo 4: ATCC 10231 *Candida albicans* ve CD36 *Candida dubliniensis* YSTCLIN6 kütüphanesindeki karşılaştırması

STRAIN	PASAGE	TOTAL RESPONSE	PERCENT NAME	TOTAL NAME	METHOD	LIBRARY	COMPARISON CHART	DISTANCE
C.dubliniensis	1.pasaj	51062	56.15%	28672	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	19145
C.dubliniensis	1.pasaj	54373	61.14%	33243	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup B	11828
C.dubliniensis	1.pasaj	50038	54.13%	27083	SYSTCLN6	YSTCLN	not matches found	
C.albicans	1.pasaj	78938	80.44%	63499	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	13403
C.albicans	1.pasaj	57547	56.96%	32781	SYSTCLN6	YSTCLN	not matches found	
C.albicans	1.pasaj	83064	79.55%	66073	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup B	12823
C.albicans	2.pasaj	56091	52.13%	29241	SYSTCLN6	YSTCLN	not matches found	
C.albicans	2.pasaj	72268	48.73%	35216	SYSTCLN6	YSTCLN	not matches found	
C.albicans	2.pasaj	99202	60.66%	60174	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgorup A	23261
C.dubliniensis	2.pasaj	55729	55.75%	31070	SYSTCLN6	YSTCLN	C.keyfr	19967
C.dubliniensis	2.pasaj	51694	74.63%	38579	SYSTCLN6	YSTCLN	not matches found	20562
C.dubliniensis	2.pasaj	63932	58.00%	37081	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	13443
C.albicans	3.pasaj	36804	77.14%	28391	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	24007
C.albicans	3.pasaj	27698	104.10%	28834	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	21067
C.albicans	3.pasaj	55015	54.17%	29804	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	15470
C.dubliniensis	3.pasaj	46182	56.06%	25890	SYSTCLN6	YSTCLN	C.albicans GC subgroup B	13139
C.dubliniensis	3.pasaj	52901	48.61%	25714	SYSTCLN6	YSTCLN	C. albicans GC subgroup A	

4.2. Gazla Ayrıştırma ile Yağ Asidi Profillerinin Analizi

Bil	Type	Method	Seq#	ID Num	Name	Status
1	Calib	SYSTCLN6	1	1	1300AA- Calib-Stand-R317101- p9.0-t170	Running
2	Blank	SYSTCLN6	5326	5326	hexane	Queued
3	Samp	SYSTCLN6	5327	5327	reagent blank	Queued
4	Samp	SYSTCLN6	5328	5328	Candida albicans kontrol1	Queued
5	Samp	SYSTCLN6	5329	5329	Candida albicans kontrol2	Queued
6	Samp	SYSTCLN6	5330	5330	Candida albicans kontrol3	Queued
7	Samp	SYSTCLN6	5331	5331	hexane	Queued
8	Samp	SYSTCLN6	5332	5332	Candida dubliniensis kontrol1	Queued
9	Samp	SYSTCLN6	5333	5333	Candida dubliniensis kontrol2	Queued
10	Samp	SYSTCLN6	5334	5334	Candida dubliniensis kontrol3	Queued
11	Samp	SYSTCLN6	5335	5335	hexane	Queued
12	Samp	SYSTCLN6	5336	5336	256 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
13	Samp	SYSTCLN6	5337	5337	128 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
14	Samp	SYSTCLN6	5338	5338	64 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
15	Samp	SYSTCLN6	5339	5339	hexane	Queued
16	Samp	SYSTCLN6	5340	5340	32 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
17	Samp	SYSTCLN6	5341	5341	16 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
18	Samp	SYSTCLN6	5342	5342	8 mikrogram/mL Flukonazol C. albicans	Queued
19	Samp	SYSTCLN6	5343	5343	hexane	Queued
20	Samp	SYSTCLN6	5344	5344	256 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
21	Samp	SYSTCLN6	5345	5345	128 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
22	Samp	SYSTCLN6	5346	5346	64 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
23	Samp	SYSTCLN6	5347	5347	hexane	Queued
24	Samp	SYSTCLN6	5348	5348	32 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
25	Samp	SYSTCLN6	5349	5349	16 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
26	Samp	SYSTCLN6	5350	5350	8 mikrogram/mL Flukonazol C.dubliniensis	Queued
27	Samp	SYSTCLN6	5351	5351	hexane	Queued
28	Samp	SYSTCLN6	5352	5352	C.albicans plate kontrol	Queued
29	Samp	SYSTCLN6	5353	5353	C. dubliniensis plate kontrol	Queued
30	Samp	SYSTCLN6	5354	5354	hexane	Queued
31	Empty					Done
32	Empty					Done
33	Empty					Done
34	Empty					Done

Flukanozol Etkisinde ATCC 10231 Candida albicans ve CD36 Candida dubliniensis suşlarının YSTCLIN6 kütüphanesindeki karşılaştırması yapıldığında, flukanozol etkisindeki ATCC 10231 Candida albicans ve CD36 Candida dubliniensis suşlarının YSTCLIN6 kütüphanesindeki karşılaştırması sonucunda yağ asiti piki tespit edilememiştir.

Flukanozol etkisindeki ATCC 10231 Candida albicans ve CD36 Candida dubliniensis mayalarının sayısının azlığı nedeniyle tespit edilecek miktarda yağ asiti elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Mantar enfeksiyonlarının sıklığının ve öneminin artması antifungallerin sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır. Tedavideki yaklaşımların düzenlenmesinde alternatif ilaçların arayışında ve gözlenen direnç sorunu nedeniyle standart antifungal duyarlılık yöntemlerinin önemi artmıştır.

Antifungal duyarlılık testleri özellikle enfeksiyon ciddi boyutlarda ise ve tedaviye dirençliyse, daha öncesinde antifungal ilaçlarla karşılaşmış bir hastada ortaya çıkmışsa ya da nadir gözlenen bir tür tarafından oluşturulmuşsa, bu hastalığa neden olan mantarlara uygulanır (82, 83).

Günümüzde özellikle Onkoloji ve AIDS hastaları başta olmak üzere düşük immun dirence sahip kişilerde hızla gelişen ve bazen de ölümcül enfeksiyonlara sebebiyet veren *Candida* türlerine karşı yeni antifungal ajan arayışları büyük bir hızla sürmektedir. Bu hastalar uzun süren tedavi süreçlerinde antifungal ilaçlarla tedavi edilmeye çalışılsa da *Candida* enfeksiyonları tam olarak eradike edilememektedir (84).

Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak yağ asiti profilleri, klonal olarak birbirine çok yakın olan bu iki *Candida* suşunun antifungal flukonazole karşı zamana bağlı yanıtının değerlendirilmesinde kanıt sağlayacaktır (80, 84).

ATCC 10231 Candida albicans ve *CD36 Candida dubliniensis* suşlarının GC ile analiz edilerek, oluşan yağ asidi piklerini, standart suşlardan oluşan kütüphanesi ile karşılaştırarak, benzerlik oranına göre tanımlama yapmaktadır. Günler süren klasik tanımlama işlemlerine karşılık aynı gün etkin, verimli ve güvenilir sonuç verilmesi hasta güvenliği kapsamında hastanın tanısı yapılarak tedavi/ uygulama/ bakıma zamanında ulaşımı sağlanmış olacaktır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyal Konfirmasyon Birimi'nde yer alan "Gas Chromatography" (GC) cihazı ile yağ asiti profillerine göre tanımlama hızı ve güvenilir şekilde yapılabilmektedir. Sonuçlar "**Benzerlik Cetveli**" (BC, "Similarity Index") esasına göre FDA tarafından onaylanan bir örnek hazırlama-değerlendirme-tanımlama yöntemi gerçekleştirilerek değerlendirilir. GC cihazında aerop-anaerop bakterinin ve mayaların "yağ asidi dizilimleri" ilgili kütüphaneler kayıtlıdır. Bilinmeyen bakteri ve/veya maya kolonilerinden yağ asitleri ayrıldıktan sonra (ayırıştırmanın

ilk basamağından itibaren değerlendirilen örnekler steril durumdadır ve biyogüvenlik riski taşımazlar), ilgili cihazlarda analiz edilirler. Yağ asidi profillerini belirten kromatografik pikler, standart suşların izleri ile karşılaştırılarak, dökümleri yapılır. Sistemin özü budur ve FDA ve CDC tarafından onaylanmıştır.

Laboratuvar güvenliği için laboratuvarında karşılaşılan risk ve tehlikelerin tanımlanıp, güvenlik programı oluşturulmalıdır. Biyogüvenlik Düzeyi 3 laboratuvar koşullarında çalışması gerek *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD36 Candida dubliniensis* türlerinin tanımlama işlemi Mikrobiyal Konfirmasyon Laboratuvarı'nda HEPA/ ULPA filitreli Güvenlik Düzeyi Class 2 B2 olan güvenlik kabininde çalışılmaktadır. *ATCC 10231 Candida albicans* ve *CD36 Candida dubliniensis* tanımlama yönteminin ilk basamağından (sabunlaşma) sonra çalışılan örnekler enfeksiyöz özelliğinin kaybetmektedir ve çalışan için biyolojik tehlike kalmamaktadır. Yine aynı şekilde geçerli kılınan gazla ayrıştırma ile yağ asidi profillerine göre tanımlama yönteminin ilk basamağından sonra örnekler sterildir ve biyolojik risk taşımazlar. Laboratuvar çalışanları tüm laboratuvar hizmetlerini biyogüvenlik kabininde gerçekleştirmekte ve güvenlik önlemi olarak maska, eldiven ve gözlük kullanmaktadır. Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak yağ asiti profilleri, klonal olarak birbirine çok yakın olan bu iki *Candida* suşunun antifungal flukonazole karşı zamana bağlı yanıtının değerlendirilmesinde kanıt sağlayacaktır (80, 84)

Mikrobiyal identifikasyon basamağında *Candida albicans* ile *Candida dubliniensis* ayırımının hızlı, güvenilir ve güvenli bir yöntemle gerçekleştirilebilmesi, özellikle iki suşun flukonazole direnci açısından önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hasta ve çalışan güvenliği sağlıkta kalite geliştirme ve akreditasyonun temel dayanaklarından biridir. Hasta örneklerinin güvenli bir süreç içinde laboratuvara kabulü, laboratuvar içinde analizin güvenli koşullarda gerçekleştirilmesi, analizin etkin, verimli, söz verilen zamanda yapılması hastanın tanı/ tedavi/ bakım süreçlerinin başlamasında birincil öneme sahiptir. Bu noktada analizin yapıldığı laboratuvarın uluslararası standartlara uygun olarak güvenilir sonuç vermesi sürecin doğru olarak başlamasında etkilidir. Uluslar arası standart yöntemlerle çalışan laboratuvarın bu çalışmalarını sürdürürken belgelendirmesi akreditasyonun gereklerinden biridir.

Yağ asitleri mikroorganizmaların duvar yapılarında yer alırken, her bir yağ asidi o mikroorganizma için fenotipik bir parmak izi olarak tanımlanabilir. Standart alınmış örnekler, standart koşullarda getirildikleri laboratuvarında standart besiyerinde, standart koşul ve sürede enkübe edildikten sonra eğer üreme varsa, oluşan kolonilerden alınan örnekler ile ilk aşamadan itibaren başlatılan sabunlaştırma ve onu izleyen basamaklar sonunda hem laboratuvar çalışanları için güvenli bir ortamda çalışma sağlanır, hem de elde edilecek identifikasyon uluslararası standartlara uygun bir sonuç olarak karşımıza çıkar.

Yağ asitleri mikroorganizmaların duvar yapılarında yer alırken, her bir yağ asidi, o mikroorganizma için “fenotipik bir parmak izi” olarak tanımlanabilir. Bu noktadan hareketle, tanısı yağ asidi profili ile konan bir mikroorganizmanın “antibiyogramı” da bu yöntemle çalışılabilir sonucunu görüyoruz.

Candida gurubu ve maya grubunun tıptaki diğer önemli üyeleri (*Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*,...gibi) için, özgün “yağ asidi antibiyogram” çalışmaları yapılabilir. “Duyarlılık – dirençlilik” noktasında belirleyici olan yağ asitlerinden ayrı bir standart kütüphane oluşturulabilir. MIDI Sherlock Sistemi buna müsaittir (“Research Use Only”).

Standart alınmış örnekler, standart koşullarda getirildikleri laboratuvarında standart besiyerinde, standart koşul ve sürede enkübe edildikten sonra eğer üreme varsa,

- Üreme görülen kolonilerden alınan örnekler ile ilk aşamadan itibaren başlatılan sabunlaştırma ve onu izleyen basamaklar sonunda;
- Laboratuvar çalışanları için güvenli bir ortamda çalışma sağlanır,
- Sonuçta da elde edilecek identifikasyon uluslar arası standartlara uygun bir sonuç olarak karşımıza çıkar.

Çalışmaların, antibiyogram çalışmalarını da içerek şekilde yeni kültür maya türleri ile çalışılması bu tezdeki yöntem uygulamaları ile daha ileri düzeye taşınabilir.



7. KAYNAKLAR

- 1.Pfaller MA,Diekema DJ: The Epidemiology of invasive candidiasis:a persistent public health problem, Clin Microbial Rev.20;133-163,2007
- 2.Brandt ME,warnock DW: Taxonomy and classification of fungi. In Versaloviç J, ed 10, Washington,DC, 2011,American society for microbiology Press.
- 3.Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC,Winn WC, Color atlas and Textbook of diagnostic Microbiology, Philadelphia :Lippincott, 1997:983-1069
- 4.Guarro J, J. Gene ve A.M:Stchigel.1999 Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev.12:454-500
- 5,Brandt ME, Warnock DW: Taxonomy and classification of fungi. In Versalovic J, et al, editors:Manual of clinical microbiology , ed 10, Washington, DC, 2011,American society for Microbiology press.
- 6.Cole GT: Fungal pathogenesis. In Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA, editors:Clinical mycolgy, New York, 2003, Churchill livingstone.
- 7.Cramer RA Jr,Perfect JR: Recent advances in understanding human opportunistic fungal pathogenesis mechanisms. In Annaisie EJ,McGinnis MR,Pfaller MA, editors:Clinical mycology, ed 2, New York, 2009, Churchill livingstone.
- 8.Diagnani MC, et al: Candida. In Annaisie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors: Clinical mycology, ed 2, New York, 2009, Churchill Livingstone.
- 9.D . Bitor, O Lortholary, Y. Lestrat, J. Nicolau, B. Coignard, P. Tattevin, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010 Emerg Infect Dis, 20(2014), pp.1149-1155
- 10- Kurtzman, C.P. ve J.W. Fell (ed.).1998. The yeasts, A Taxonomic Study 4th ed. Elsevier,New York, N.Y.
- 11-Howell SA, Hazen KC. Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance. Manual of Clinical Microbiology. Vol 2. Canada: American Society for Microbiology; 2011. P 1-29
- 12-Tümbay E.Candida, Cryptococcus ve tıbbi önemi olan diğer mayalar.In: Başustaoğlu, A.Kubar A,Yıldıran ŞT, Tanyüksel M.(çev editörleri). Klinik mikrobiyoloji.9. baskı. Ankara:atlas kitapçılık;2009.1762-4
- 13-Kauffman CA. Overview of candida infections. Upto date 2013.

- 14-Saniç A. Mantarlar: Genel mikrobiyolojik özellikler ve sınıflandırma Mutlu Ulusoy S.Arman D, Uzun Ö editör. Fungal infeksiyonlar. Ankara: Bilimsel tıp yayınevi,2006 p.9-20
- 15-Gale CA, Berman J, Cell cycle and growth control in *Candida* species. In: Calderon CA, and Clancy CJ, eds, *Candida and Candidiasis*. Second edition. Washington DC: American society for Microbiology Press,2012 p.101-24
- 16-Moran G, Coleman D, Sullivan D, An introduction to the medically important *Candida* species In:Calderone CA and Clancy CJ. Eds *Candida and Candidiasis*. Second ed.Washington DC:American society for Microbiology Press,2012p,11-25
- 17-Odds,F.C.1988. *Candida and Candidiasis*, 2nd ed. Bailliere Tindall, London, United Kingdom.
- 18-Brawner D, L, G.L. Anderson ve K. Y. Yuen. 1992 Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates . *J. Clin.Microbiol.* 30:149-153
- 19-Asakura, K. S.-I. Iwaguchi, M. Homma, T. Sukai, K. Higashide ve K. Tanaka. 1991. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2531-2538
- 20-Augur, P., C. Dumas ve J. Joly. 1979. A study of 666 strains of *Candida albicans*:correlation between serotype and susceptibility to 5- fluorocytosine . *J. Clin. Microbiol* 139:590-594
- 21-Soll, D.R. ve C. Pujol . 2003. *Candida albicans* clades .*FEMS Immunol. Med Microbiol.* 39:1.
- 22-Gale CA ,Berman j. Cell cycle and growth control *Candida* species. In:Calderone ca and Clancy CJ, eds. *Candida and Candidiasis*. Second edition.washington DC. American society for Microbiology Press, 2012 p.101-24
- 23-Schoofs a, Odds FC, Colebunders R, Jeven M, Goossens H,. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV- Infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16:296
- 24-Ramage G. Martinez JP. Lopez-Ribot IL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials; a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6:979-986.
- 25-Tay ST; Abidin IA, Hassan H, Ng KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Med Mycol.* 2011; 49:556-60
- 26-Pera S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal *Candidiasis* . *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1695

- 27- Pincus DH, Orega S, Chatellier S. Yeast identification past,present and future methods. *Med Mycol* 2007;45(2):97-121
- 28-Pulcrano G, Lulo VD,Vollaro A, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *Journal of Microbiol methods*.94;2013:262-66
- 29-Larone DH(ed).Medically important fungi.5th edition. Washington DC:ASM Press;2011
- 30-Hazen CK, Howell SA, *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance . In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edition. Washington DC: ASM Press;2007 .1762-88
- 31-Marcos Y, Pincus DH O'connor L, Glynn B (eds). *Fungal diagnostics:methods in molecular biology*.2013
- 32-Baumgartner C, Freydiere A, Gille Y.Direct identification and recognition of yeasts species from clinical material by using *Albicans ID* and *CHROMagar Candida* plates . *J Clin Microbiol* 2003;34:454-6
- 33-Dealler SF. 1991. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory.*J.Clin Microbiol* . 29:1081-1082
- 34- Freydiere AM, Robert R, Ploton C, et al. Rapid identification of *Candida glabrata* with anew commercial test, *GLABRATA RTT*. *J. Clin Microbiol* 2003;41:3861-3
- 35-Al Mosaid,A.D, Sullivan, I.F.Salkin, D. Shanley ve D. C. Coleman.2001.Differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans* on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J.Clin. Microbiol*.39:323-327
- 36-Odds,F.C, L.Van Nunel ve G.Dams.1998.Prevalence of *C.dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol*.36:2809-2873
- 37-Pinjon E, D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley ve D. Coleman.1998. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *J. Clin. Microbiol*.36:2093-2095
- 38-Schoofs A, F.C.Odds, R. Colebunders, M. Ieven, ve H. Goossens. 1977.Use specialized isolation media for recognition and identification of *C. dubliniensis* isolates from HIV-infected patients . *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect dis*. 16:296-300
- 39-Velegraki. A, ve M.Logotheti . 1998. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *C. dubliniensis* (sp:nov.) reduces 2,3,5-triphenylketrazolium chloride. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*.20:239-241.
- 40-Reis E, Shadomy H.J, Lyon G.H, (eds). *Fundemental Medical Mycology* New Jersey:Wiley- Blackwell;2012.

- 41-Adams ED, Cooper BH. Evaluation of a modified Wickerman medium for identifying medically important yeasts. *Am L Med Technol* 1974;40:377-88
- 42-Gubbins,P.O, Anaissie,E.J.(2009)Antifungal therapy.In *Clinical Mycology*. Anaissie E.J, Mc Ginnis M. R, Pfaller M.A, (Eds.), Churchill Livingstone.
- 43- Roemer, T, Krysan, D.J.(2014) .Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Gold Spring Harb Perspect med*, 4(5). Doi: 10.1101/cshperspect. A019703.
- 44-Doğruman Al.F. Çeşitli örneklerden izole edilen Candida türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığının belirlenmesinde standart makrodilüsyon ile E test yöntemlerinin karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Erzurum,2000
- 45-Wingard j.r. Infections due to resistant Candida species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clinical infectious Diseases* 1994;19(1): 49-53
- 46-Dalgıç. N, Erdal. İ, (2005) Sistemik etkili antifungal ilaçlar. *Klinik Pediatri*, 4(3), 90-98
- 47- Küçükoğlu.K.(2008).Antifungal tedavide son gelişmeler.*Ankara Ecz.Fak. Derg.* 37(1), 63-90.
- 48-Murray,P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A.(2009).Antifungal Agents.In *Medical Microbiology*. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (Eds.), Elsevier, Philadelphia.pp.679-688
- 49-Matthews R.C., pathogenicity determinants of Candida albicans: potential targets for immunotherapy? *Microbiology* 1994;1505-1511
- 50-Yeğenoğlu.Y.(2012). Antifungal direnci gösteren mantarlar. *Ankem Derg.* 26(Ek2), 254-260.
- 51-Arıkan, S., Rex, J.H. (2007). Antifungal agents.In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P.R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M.L., Pfaller M.A.(Eds.), 9 ed. ASM Pres, Washington .pp.1949-1960.
- 52- Rex, J.H.,Stevens, D.A.(2014).Systemic Antifungal Agents. In *Mandel, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious Diseases*. Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J.(Eds.), Elsevier Health Sciences, Philadelphia.pp.549-563
- 53-Sugar, A.M, Lyman,C.A, A Pratical guide to medically important fungi and the diseases they cause. Lippincott_Raven publishers New york 1998:95-119
- 54-Uzun, Ö. Sistemik etkili antifungal ilaçlar. Akalın,E. Eds. *Klinik uygulamada Antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ilaçlar*. Güneş Kitapevi, Ankara, 1994:273-298

- 55-Andriole V.T, İnvaziv fungal infeksiyonlarda güncel ve gelecekteki tedavi. In Remington J.S, Swartz M.N, eds. İnfeksiyon hastalıklarında güncel ve klinik yaklaşımlar. Ünal S, Black well science 1998:20-40
- 56-Sürücüoğlu s. Sistemik azoller ve amfoteresin B'nin yeni formülasyonları. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, Kongre kitabı,1999:183-186
- 57-White T. C, Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. ASM News 1997; 63:427-433
- 58-Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *C. albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995:2378-2386
- 59-Johnson E:M, Espinel-Ingroff A.V, Pfaller M. A. :Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. In Versalović J, et al, editors: Manuel of Clinical Microbiology , ed 10, Washington, DC, 2011, American Society for Microbiology Press.
- 60-Aderiye, B.I., Oluwole, O.A.(2015). Antifungal agents thet target fungal cell Wall components:a reew. Agri Biol Sci, 1:206-216
- 61-Kebudi. R,. Yeni Antifungaller:İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü,Pediyatrik hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, İstanbul. Ankem derg.2007;21(ek2):210:215
- 62-Paul. O,Gubbins.Scott.A, McConnell, and jarret R. Amsden. Antifungal Agents.2005:289-337
- 63-S Das, M.R. Shivaprakash and A. Chakrabartınew. Antifungal agents in pediatric practice.
- 64-Aslan.T. Yeni Antifungaller. İstanbul Şişli Eftal eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.2007.
- 65-Keady. S, Thacker. M, Caspofungin in the treatment of invasive fungal infections Intensive and Critical Care Nursing. (2006)22,59-62
- 66-Como, J.A. ve W.E. Dismukes. 1994.Oralazole drugs as systemic antifungal therapy .N. Engl.J. Med.330:263-272
- 67-Humphrey, M.J., S. Jevons ve M.H.Tarbit.1985.Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stablr triazole antifungal drug, in animals and humans.Antimicrob.Agents Chemother.28:648-653
- 68- Pelletier R, Loranger L, Marcotte H et al. Voriconazole and fluconazole susceptibility of candida isolates. J Med Microbiol.2002;51:479
- 69-Manso E, M. Montillo, G. Discepoli,ve P.leoni.1991.Fluconazole resistanceof *Candida krusei*. Boll.Ist.Sieroter milan 70:527-529

- 70-Pfaller M.A, ve D.J.Diekema. 2004.Twelve years of fluconazolein clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibilityof bloodstream isolates of *Candida*. Clin. Microbiol.infect.10:11-23
- 71-Baran J. Jr, E. Clauber, J. Barczak, K. Riederer ve R. Khatib. 2000. Trends in antifungal susceptibility among *Candida* sp. Urinary isolates from 1994 and 1998 .J. Clin. Microbiol.38:870-871
- 72-Pfaller M.A, S.A Messer, S. Gee, S. Joly, C.Pujol, D.J.Sullivan, D.C.Coleman ve D.R.Soil.1999. in vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. J.Clin: Microbiol.37:870-872
- 73-Rex J.H, Rinaldi M.G, Pfaller M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole .1995.Antimicrob. Agents Chemother.39:1-8
- 74-Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock ve C.M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. Clin. Microbiol.Rev.12:40-79
- 75-Kanda, Y., R. Yamamoto, Chizuka, T. Hamaki, M. Suguro, C. Arai, T. Matsuyama, N. Takezako, A.Miawa, W. Kem, M. Kami, H. Akiyama, H.Hirai ve A. Togawa. 2000. Prophylacticaction of oral fluconazole against fungal infection in neutropenic patients a meta-analysis of 16 randomized, controlled trials.Cancer 89.1611-1625
- 76-Manfredi,R., A. Mansroianni, O.V. Coronado ve F. Chiodo.1997. Fluconazole as prophylaxis against fungal infection in patients with advanced HIV infection. Arch.Intern.Med. 157:64-69
- 77-Abbott, M., D.L. Hughes, R. Patel ve G.R. Kinghorn. 1991. Angio-oedema after fluconazole. Lancet.338:633
- 78-Agarwal,A., V. Sakhaja ve K.S. Chugh. 1990. Fluconazole-induced thrombocytopenia. Ann.Intern.Med.113:899
- 79-Pappas, P.G., C.A.Kauffmann, J. Perfect,P.C. Johnson, D.S. McKinsey, D.M. Bamberger, R.Hamill, P.K. Sharkey,S.W. Chapman ve J.D. Sobel.1995. Alopecia associated with fluconazole therapy.Ann.Intern. Med. 123:354-357.
- 80- Sasser M, Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids.Techical Note 2001
- 81- Yoshida T, Jono K, Okonogi K. Modified Agar Dilution Susceptibility Testing Method for Determining In Vitro Activities of Antifungal Agents, Including Azole Compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997; p.1349-51

- 82- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507–21.
- 83- Pfaller MA, Messer SA, Gee S et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 870–2.
- 84- Peltroche-Liacsahuanga H1, Schmidt S, Seibold M, Lütticken R, Haase G. Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. *J. Clin Microbiol.* 2000 Oct;38 (10). 3696_704.



EK-1-Etik Kurul İzni

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/21-03	Tarih:28.07.2016
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN'ın sorumlusu olduğu "Flukanazol Etkisi Altında Candida Albicans ve Candida Dubliniensis'in Yağ Asiti Profillerinin Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Seviç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SERENİNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	DEU Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

EK-2-Kurum İzni



ARAŞTIRMA AMAÇLI ANALİZLER SÖZLEŞME FORMU

Proje Adı: FLUKANAZOL ETKİSİ ALTINDA *CANDIDA ALBICANS* VE *CANDIDA DUBLINIENSIS*' IN YAĞ ASİTİ PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Proje Sahibi:

Adı-soyadı: Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN
Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji
Telefon no: 24501
E posta adresi: huseyin.baskin@gmail.com
İmza:

Merkez Laboratuvarı ile iletişimde görevli proje çalışanı:

Adı-soyadı: Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN
Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji
Telefon no: 24501
E posta adresi: huseyin.baskin@gmail.com
İmza:

Projede görev alan Merkez Laboratuvarı çalışanı:

Adı-soyadı: Metin ÜSTÜN
Telefon no: 22668
E posta adresi: metin.ustun@deu.edu.tr
İmza:

Proje Kapsamında Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilecek olan testler

Test Adı	Cihaz	Kodu	Adet	Birim Maliyet (TL)	Toplam Maliyet (TL)	Zaman dilimi	
Yağ asidi analizi	GC					Başlangıç	Bitiş

Merkez Laboratuvarı tarafından verilecek belge ve bilgiler (Başvuru Formunda istenmişse) ektedir.

Not: Araştırmanın süreci içinde analiz için kullanılan yöntem ve /veya cihaz değişebilir. Araştırma sonlandığında kullanılan yöntem ve cihaz tekrar sorgulanmalıdır.

Bu çalışma yukarıda belirtilen koşullar doğrultusunda Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilecektir.

ML YÖNETİMİ ONAYI

AD SOYAD:

İMZA:

Prof.Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN
Merkez Laboratuvarı Başkanı
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Uzmanı
Eğ. No 81224-8196 Tescil No: 48325-57751

Belge No: MLFB.510.03

Güncelleme No / Tarihi: 00/21.1.2011

EK -3 ARBİS ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Metin ÜSTÜN

TC Kimlik No / Pasaport No:	18590492266
Doğum Yılı:	1965
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Telefon :	0232 412 25 68
Faks :	
e-posta :	metin.ustun@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	1988
TR	Dokuz Eylül	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Tıbbi Mikrobiyoloji, Tıbbi Biyoloji, Seroloji, Parazitoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
	-		

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
