



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MUCORALES
TAKIMI MANTARLARIN TÜR DAĞILIMI VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ RETROSPEKTİF OLARAK
BELİRLENMESİ**

AYŞEN İKKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2023



**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MUCORALES
TAKIMI MANTARLARIN TÜR DAĞILIMI VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ RETROSPEKTİF OLARAK
BELİRLENMESİ**

Ayşen İKKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. BEYZA ENER

TGA-2023-1313- Bursa Uludağ Üniversitesi

Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi

BURSA-2023

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Klinik örneklerden izole edilen Mucorales takımı mantarların tür dağılımı ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak belirlenmesi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Ayşen İKKAN
19.10.2023**

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

19/10/2023

Adı Soyadı: Ayşen İKKAN

Anabilim Dalı: Tıp- Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Klinik Örneklerden İzole Edilen Mucorales Takımı Mantarların Tür Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Belirlenmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	■	□	
Dış Kapak Sayfası	■	□	
İç Kapak Sayfası	■	□	
Kabul Onay Sayfası	■	□	
Sayfa Düzeni	■	□	
İçindekiler Sayfası	■	□	
Yazı Karakteri	■	□	
Satır Aralıkları	■	□	
Başlıklar	■	□	
Sayfa Numaraları	■	□	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	□	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	□	
Kaynaklar	■	□	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Beyza ENER

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK	
İÇ KAPAK	
ETİK BEYANI.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mikolojinin Tarihçesi.....	4
2.2. Mantarların Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	5
2.2.1. Mucorales Takımı Genel Özellikleri.....	8
2.3. Mukormikoz	10
2.3.1. Epidemiyolojisi.....	10
2.3.2. Patogenez	13
2.3.3. Klinik Tablolar.....	14
2.3.3.1. Rinoserebral Mukormikoz.....	14
2.3.3.2. Pulmoner Mukormikoz.....	15
2.3.3.3. Kutanöz Mukormikoz.....	16
2.3.3.4. Gastrointestinal Mukormikoz.....	16
2.3.3.5. Dissemine Mukormikoz.....	16
2.3.3.6. Diğer Mukormikoz Tabloları.....	17
2.3.4. Tanı Yöntemleri.....	17
2.3.4.1. Görüntüleme Yöntemleri.....	17
2.3.4.2. Mukormikozda Örnek Alma.....	17
2.3.4.3. Örneklerin Histopatolojik ve Direkt Mikroskopik İncelenmesi.....	18
2.3.4.4. Örneklerin Ekimi.....	19
2.3.4.5. Tanıda Biyobelirteçler.....	19
2.3.5. Mucorales Takımının Tanımlanma.....	20
2.3.5.1. Moleküler Tanımlama.	20
2.3.5.2. MALDI TOF MS ile Tanımlama.....	22
2.3.5.3 In Vitro Antifungal Duyarlılık Testleri.....	24
2.3.6. Mukormikoz Tedavisi.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Suşların Canlandırılması.....	26
3.2. Suşların Koloni morfolojileri ve Mikroskopik Morfolojilerinin İncelenmesi....	26
3.3. MALDI-TOF-MS ile Tanımlama.....	26
3.3.1 MALDI TOF MS Tanımlama için Protein Ekstraksiyonu.....	27
3.3.2. Katı ve Sıvı Besiyerlerinden Ekstraksiyonla Yapılan Tanımlamada Skorların Karşılaştırılması.....	29
3.4 Suşların Dizi Analizi ile Tanımlanması.....	29
3.4.1. Suşlardan DNA Ekstraksiyonu.....	29
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyon.....	30

3.4.3. Çoğaltılan Gen bölgesinin Agaroz Jelde Yürütülerek Görüntülenmesi.....	31
3.4.4. Pürifikasyon	32
3.4.5. Dizi Reaksiyonu.....	33
3.5. Elde Edilen Dizilerin Analizi.....	35
3.6. Suşların Antifungal Duyarlılığı.....	35
3.6.1 Antifungal Duyarlılık Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması.....	35
3.6.2 Mucorales Suşlarından In Vitro Antifungal Duyarlılık Testi İçin İnokulum Hazırlanması.....	38
3.6.3 Minimum İnhibitör Konsantrasyonların Belirlenmesi ve Yorumu.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Mucorales suşlarının Koloni Morfolojisi ve Mikroskopik Görüntüleri.....	40
4.2. Suşların MALDI TOF MS Yöntemiyle Tanımlanması.....	43
4.3. Suşların Dizi Analizi ile Tanımlanması.....	45
4.4. Antifungal Duyarlılık.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR	52
7. SİMGE VE KISALTMALAR.....	60
8. EKLER.....	62
9. TEŞEKKÜR	65
10. ÖZGEÇMİŞ.....	66

TÜRKÇE ÖZET

Mukormikoz genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda görülen Mukorales takımı mantarların sebep olduğu bir mantar enfeksiyonudur. Tanısı zor, mortalitesi yüksek ve dünya çapında nadir görülmektedir. İnsidansı tam olarak bilinmemektedir, çünkü popülasyona dayalı az çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışma ile, Mucorales suşlarının tür tanımlaması morfolojik özellikleri ve MALDI TOF MS ile yapıp ITS bölgesi ile karşılaştırılmıştır. Bu suşların antifungal duyarlılık profillerine bakılarak ülkemiz için ilk tek merkezli epidemiyolojik veri elde edilmiştir.

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Merkez Mikrobiyoloji (Mikoloji) Laboratuvarına 2003 ile 2022 tarihleri arasında gelen ve -80°C'da saklanan, ayrı hastalara ait 87 Mucorales suşu kullanıldı. ITS bölgesiyle tanımlama amacıyla sadece referans suşlarla BLAST analiz yapıldı ve oldukça net kurallar kullanıldı. Bu suşlardan 77'si ITS bölgesiyle tanımlandı ve en fazla *Rhizopus* türleri (%75,3) saptandı. Ancak 10 izolat ITS bölgesi ile tanımlamadı. Tanımlama yetersizliği %5,7 oranında olduğu düşünüldü. Tüm suşlarda cins düzeyinde moleküler tanımlama ile tam uyum sağlanmıştır. MALDI TOF MS ile tanımlamada katı ve sıvı besiyerinden ekstraksiyon arasında tür açısından bir fark olmamakla beraber sıvı ekstraksiyon yöntemi anlamlı bir şekilde daha başarılı bulunmuştur. Tür tanımlanması tam yapılmış 77 suşun, in vitro antifungal duyarlılıkları, CLSI M38 referans yöntem ile belirlendi. Posakonazol direnci saptanmamış ancak amfoterisin B direnci *Rhizopus arrhizus* suşlarında düşük oranda olsa da görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada merkezimizde en sık izole edilen türün *R. arrhizus* olduğu, MALDI TOF MS tanımlamanın sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanıldığında oldukça başarılı olduğu ve izolatlarımızda ciddi bir antifungal direncin olmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Mucorales, mukormikoz, epidemiyolojik veri, MALDI TOF MS, antifungal duyarlılık

İNGİLİZCE ÖZET

Retrospective Determination of Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Mucorales Fungi Isolated from Clinical Specimens

Mucormycosis is a fungal infection caused by fungi of the order Mucorales, usually in immunocompromised patients. It is difficult to diagnose, has a high mortality rate and is rare worldwide. Its incidence is unknown because there are a few population-based studies.

In this study, species identification of Mucorales strains was performed by morphological characteristics and MALDI TOF MS and compared with the ITS region. By looking at the antifungal susceptibility profiles of these strains, the first single-center epidemiological data for our country was obtained.

In this study, 87 Mucorales strains belonging to different patients, which were received to the Central Microbiology (Mycology) Laboratory of Bursa Uludag University Health Application and Research Center between 2003 and 2022 and stored at -80°C, were used. BLAST analysis was performed only with reference strains for identification by the ITS region and very precise rules were used. Of these strains, 77 were identified by the ITS region, with *Rhizopus* species being the most common (75.3%). However, 10 isolates were not been able identified by the ITS region. Identification failure was considered to be 5.7%. Complete agreement was achieved with molecular identification at the genus level in all isolates. Although there was no difference in terms of species between extraction from solid and liquid media in identification by MALDI TOF MS, the liquid extraction method was significantly more successful. In vitro antifungal susceptibilities of 77 strains with complete species identification were determined by CLSI M38 reference method. No posaconazole resistance was detected, but amphotericin B resistance was observed in *Rhizopus arrhizus* strains, albeit at a low rate.

In conclusion, *R. arrhizus* was the most frequently isolated species in our center, MALDI TOF MS identification was quite successful when liquid extraction method was used and there was no serious antifungal resistance in our isolates.

Keywords: Mucorales, mucormycosis, epidemiological data, MALDI-TOF-MS, antifungal susceptibility testing

1.GİRİŞ

Mukormikoz, Mucorales takımında yer alan mantarların sebep olduğu, görülme sıklığı giderek artan, hızlı ve kötü seyirli global bir mantar enfeksiyonudur. Birçok ülkede aspergillozdan sonra ikinci veya üçüncü sıradadır. Görülme sıklığı, tanısı zor olduğundan çok iyi bilinmemekle beraber, özellikle vorikonazol tedavisinin yoğun kullanımı ve riskli hastaların daha fazla izlenmesi nedeniyle giderek artmaktadır. Tedavide gecikme mortalite ile sonuçlansa da medikal, cerrahi, radyoloji ve laboratuvar ekiplerinin multidisipliner çalışması mortaliteyi azaltmaktadır.

Mukormikoz etkenleri doğada yaygın olarak bulunmalarına rağmen sekonder enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Enfeksiyona sebep olan türlerin düşük virülanslı olması ve üremeleri için uygun koşullar oluştuğunda hastalık oluşturmaları bunun en önemli sebebidir. Kontrolsüz diyabet, mukormikoz için en önemli risk faktörüdür. Bunun ötesinde nötropenik hematolojik malignitesi olan hastalar, kemik iliği alıcıları ile diğer kemoterapi veya immunoterapi yapılan maligniteli hastalar da risk altındadır (Cornely ve ark., 2019). Bilinen bir risk faktörü olmayan mukormikoz olgularında ise predispozan faktör genellikle yanık, travma ve cerrahi müdahale olmaktadır. Popülasyona dayalı az sayıda çalışma olduğundan, insidansı tam olarak bilinmez, ancak birçok çalışmada görülme sıklığının arttığı gösterilmiştir (Skiada, Pavleas, & Drogari-Apiranthitou, 2020).

Mucorales takımında yer alan türler morfolojik olarak birbirine oldukça benzerler ve kabaca 55 cins içinde 261 tür bulunmakla beraber insanlarda hastalık oluşturanların sayısı 38 civarındadır. *Rhizopus*, *Mucor* ve *Lichtheimia* cinsleri insanlarda en fazla hastalık yapan türleri barındırmaktadır. *Rhizomucor*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces* ve *Saksenaea* türleri ise bunları takip eder (Kwon, 2012). Bunun yanı sıra bu türler, belirli coğrafi bölgeler veya enfeksiyonlarda daha siktir. Örneğin *Lichtheimia* ve *Apophysomyces* kutanöz mukormikoz olgularından daha fazla izole edilmektedir. *Cunninghamella* ise pulmoner ve dissemine enfeksiyonlarda siktir (Badali ve ark., 2021).

Mukormikoz fırsatçı bir enfeksiyondur. Konağın bağışıklık durumu, mantarın türü ve enfeksiyonun yerine göre çok çeşitli klinik tablolar oluşabilir. Kutanöz/yumuşak doku, rino-orbito-serebral, sino-pulmoner, gastrointestinal ve yaygın enfeksiyon başlıca

görülen klinik tablolardır. Hızlı seyirli bir enfeksiyon olduğu için erken tanı önemlidir. Görüntüleme yöntemleri tanıda sıklıkla kullanılmakla beraber, enfeksiyonun yaygınlığı hakkında bilgi verse de etkene yönelik bilgi vermez. Mukormikoza yönelik spesifik bir serolojik belirteç de yoktur. Galaktomannan (GM) ve β -D-Glukan (BDG) testlerinin pozitif olması mukormikoz tanısından uzaklaşmada yararlı olmakla beraber miks enfeksiyonların varlığı unutulmamalıdır.

Mukormikozun tanısında enfeksiyon bölgesinden alınan biyopsi örneğinin histopatolojik ve/veya direkt mikroskopik incelenmesi en önemli basamağı oluşturur (Cornely ve ark., 2019). Histopatolojik ve/veya direkt mikroskopik inceleme kesin tanıyı koydurmakla beraber enfeksiyona yol açan tür hakkında bilgi vermez. Tür tanımlanması ve antifungal duyarlılık çalışılması için kültürün önemi büyüktür. Bununla beraber üremeleri, morfolojik olarak tanımlamak, benzer özellikleri nedeniyle oldukça zordur ve ciddi deneyim gerektirir (Cornely ve ark., 2019).

Mucorales takımı için hem “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” hem de “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” tarafından standardize edilmiş antifungal duyarlılık yöntemleri vardır (Arendrup ve ark., 2015; Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2017). Her iki yöntemde de bazı türler için epidemiyolojik eşik değerler (EED) belirlenmiş olsa da klinik sınır değerler (KSD) hiçbir tür-ilaç kombinasyonunda yoktur (Espinell-Ingroff ve ark., 2015).

Mucorales takımında, morfolojik tanımlama cins ve türlerin benzer özellikler göstermesi, kriptik ve spor oluşturmayan suşlar nedeniyle zordur. Tanımlama için çeşitli deoksiribo nükleik asit (DNA) bölgeleri değerlendirilmiş olsa da ribozomal DNA’nın “internal transcribed spacer” (ITS) bölgesi hedef olarak seçilmiştir. Bu bölgenin, aynı türün bireyleri arasındaki farklılığının az, değişik türlerin bireyleri arasındaki farklılığının fazla olması, tanımlamada altın standart olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Tanımlamada moleküler yaklaşım altın standart olsa da rutin laboratuvarlar için daha hızlı ve kolay alternatif arama çalışmaları devam etmektedir. Bunlar arasında matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) en umut vericidir. Yapılan çalışmalarda moleküler tanımlamayla %90’a kadar uyumlu sonuçlar alınmıştır (Rychert ve ark., 2018; Shao, Wan, Li, & Yu, 2018).

Ülkemizde mukormikozla ilgili, demografik özellikler, altta yatan hastalıklar, risk faktörleri, klinik formalar, tedavi ve prognoz ile ilgili birçok olgu ve literatür taramaları bulunmaktadır (Alabaz ve ark., 2021; Demirkaya ve ark., 2018). Moleküler düzeyde tür tanımlaması ise sadece üç olguda yapılmış, epidemiyolojik bir seri oluşturulmamıştır (Gümral ve ark., 2011; Kantarcioglu ve ark., 2006). Bu çalışma ile Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında -80°C’da saklanan Mucorales suşlarının tür tanımlaması morfolojik özellikler ve MALDI-TOF-MS sistemiyle yapıp ITS bölgesi ile karşılaştırılacak, antifungal duyarlılık profillerine bakılacaktır. Böylece ülkemiz için ilk epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mikolojinin Tarihçesi

Mikolojinin tarihçesi oldukça eskilere dayanmaktadır. Ancak bilimsel bir disiplin olarak ortaya konulması daha yenidir. Mantar enfeksiyonlarına ait ilk bilgiler milattan öncesine dayanır. Bilinen en eski belge M.Ö. 2000-1000 tarihlerine ait olup Hindu kutsal yazıtlarındadır. Ardından, Hipokrat'a (M.Ö. 400-300) ait bir belge bulunmuştur. Özellikle hekimler ve bilim insanları, 15. yüzyıldan (yy) itibaren tıbbi mikoloji alanında çalışmalarını arttırmışlardır (Yücel, 1999).

İsviçreli Gaspard Bauhin isimli botanikçi, "Pinax Theatri Botanici" adlı eserinde, 100 kadar mantarı özellikleriyle beraber bildirmiştir. Ancak mikolojinin de modern anlamda tarihçesi, Antonie van Leewenhoek'un, 17. yy'da mikroskobu keşfiyle hızla gelişmiştir (Yücel, 1999).

Modern anlamdaki mikoloji 18. yy sonlarına doğru önemli gelişmeler kaydetmiştir. Mikolojinin kurucusu olarak adlandırılan İtalyan botanikçi Pier Antonio Micheli, 1729'da "Nova Genera Plantarum" adlı eserde mantarlarla ilgili araştırmalarını yayımlamıştır (Ajello, 1998). Carl Linnaeus 1753 yılında "Species Plantarum" adlı eserinde mantarları bitki ve hayvanlardan ayrı bir taksonomik grup olarak sınıflandırmıştır.

Diğer bilim dallarında olduğu gibi mikoloji alanında da 19. yy'a gelindiğinde gelişmeler görülmeye başlanmıştır. Elias Magnus Fries, 1825 yılında, "Systema Mycologicum" adlı eserinde mantarları ayrıntılı olarak sınıflandırmış ve bugünkü sistematığın temellerini kurmuştur. İlk defa Robert Remak tarafından, 1835 yılında mantarların hastalık yaptığı ile ilgili açıklama yapılmıştır. Bu durum hekimlerin ilgisini çekmiş ve Gruby ile tıp mikolojisinin tarihi gelişimi başlamıştır (Yücel, 1999).

Mikolojinin bugünkü duruma gelmesinde katkı sağlayan ve mikoloji laboratuvarlarında hala aktif olarak kullanılan besiyerini geliştiren dermatolog, "Raymond Jacques Adrien Sabouraud", 1910 yılında "Les Teignes" isimli bir kitap yayımlamıştır. Bu kitapta, içeriği belirli bir besiyeri hazırlamış ve burada üreyen dermatofitleri ayrıntılı bir şekilde tarif etmiştir (Yücel, 1988).

Mantarların morfolojik ve fizyolojik özellikleri, taksonomileri ve görülme sıklığı ile ilgili çalışmalar zaman içerisinde artmıştır. Ancak doğru tür tanımlamaları, alt türler ve tiplerin belirlenmesi moleküler yöntemlerin ortaya çıkmasıyla başlamıştır (Hawksworth, & Lücking, 2017). Bu alanda ilk polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 1990 yılında, White ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (White, Oliver, Gräser, & Henn, 2008). Moleküler çalışmalar, 2010 sonrası hız kazanmış olmakla beraber halen keşfedilmeyi bekleyen çok sayıda tür bulunmaktadır.

2.2. Mantarların Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

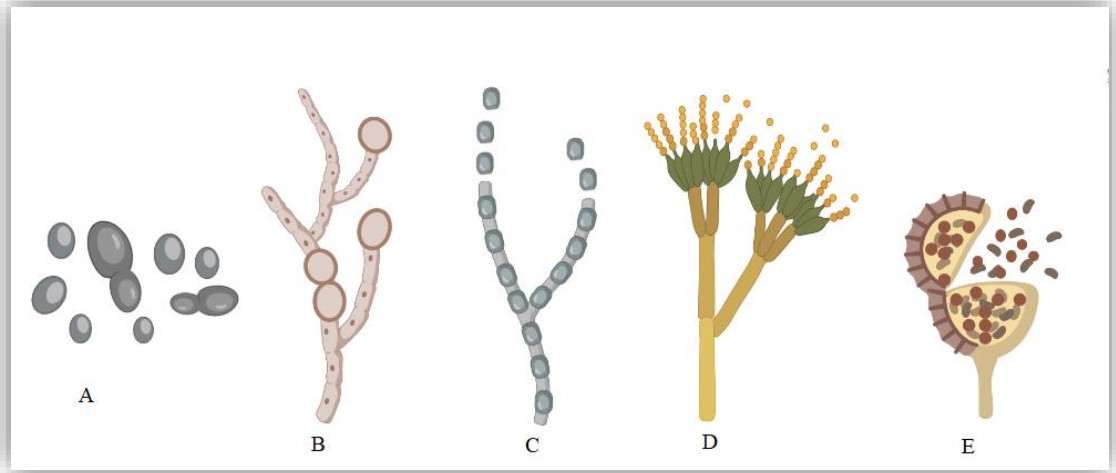
Mantarlar hava, toprak, su ve çürümüş organik maddeler gibi doğada pek çok yerde bulunabilir. Nemli ve asidik ortamları severler. Mantarı inceleyen bilim dalına mikoloji, oluşturdukları hastalıklar mikoz denir.

Canlıların oluşturduğu altı alemde biri mantarlardır. Ökaryotik canlılardır ve bitkilerden klorofil taşınamaları, heterotrof olmaları ve farklı hücre duvar yapılarıyla ayrılırlar. Hayvanlar alemi ise hem hücre duvarlarının olmaması hem de hücre zarında kolesterol bulundurmaları nedeniyle mantarlardan farklıdır. Mantarların hücre zarında esas olarak ergosterol bulunur. Mantarlar ökaryotik canlılar olması nedeniyle prokaryotik olan bakterilere de benzemezler (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2015).

Mantarlar koloni morfolojilerine göre küf ve maya olmak üzere ikiye ayrılır. Bazı türler ise insan vücut sıcaklığında maya iken doğa koşullarında küf formunda olabilir. Bu mantarlara dimorfik mantarlar denir (İnci, 1999). Mayalar küremsi şekilde tek hücrelidir. Tomurcuklanarak ürer. Küfler ise çok hücreli, filamentöz mantarlardır (Murray ve ark., 2015).

Küflerde görülen filamentöz yapılara hif denir. Hifler septalı ya da septasız olabilir. Hifler bir araya gelerek miselyumları oluşturur. Miselyumların besiyerindeki görüntüsü kolonidir. Miselyum; vejetatif yani beslenmeyi sağlayan miseller, reproduktif yani üremeden sorumlu sporları taşıyan misellerden oluşmaktadır (Arda, 2015; Murray ve ark., 2015).

Mantarlarda üreme sporları ile olur ve eşeyli ya da eşeysiz üreme görülebilir. En sık karşılaşılan eşeysiz sporlar blastospor, klamidiospor, artrospor, konidiospor ve sporangiospordur. Şekil 2.1’de bu yapılar görülmektedir.



Şekil 2.1. A) Blastospor, B) Klamidospor, C) Artrospor, D) Konidiospor, E) Sporangiospor

Blastospor: Maya hücrelerinde tomurcuklanma sonucu oluşan spordur. Spor olgunlaştıktan sonra ana hücreden ayrılır. Bazı durumlarda bu ayrılma gerçekleşmez ve yalancı hif adı verilen yapı oluşur (Murray ve ark., 2015).

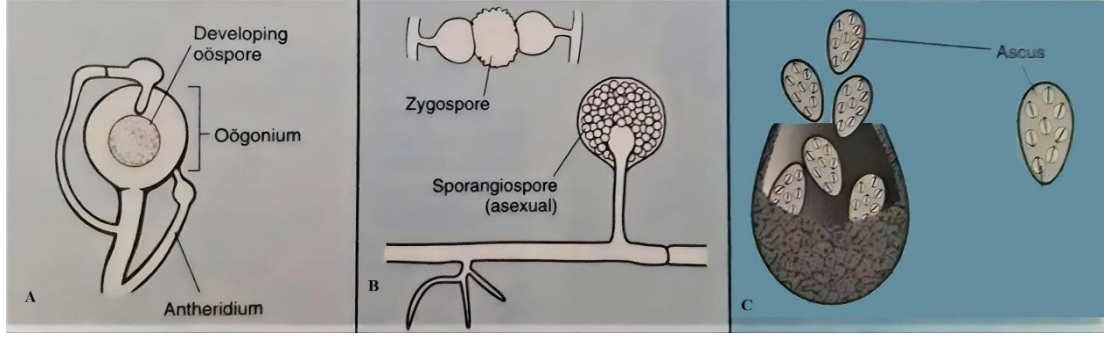
Klamidospor: Hiflerdeki bazı hücrelerin çeperlerinin kalınlaşması, protoplazmanın yoğunlaşması ve dış koşullara daha dirençli hale gelmesi sonucu oluşur (Murray ve ark., 2015).

Artrospor: Hiflerin septalardan ayrılması sonucu oluşur (Murray ve ark., 2015).

Konidiospor: Öncelikle hiflerde konidiofor adı verilen özelleşmiş bir yapı oluşur. Konidiosporlar ya direkt olarak bu yapıdan ya da sterigma adı verilen özel bir taşıyıcıdan gelişir. Tek hücreli olanlarına mikrokonidyum, çok hücreli olanlarına makrokonidyum denir (Murray ve ark., 2015).

Sporangiospor: Hiflerin ucunda yuvarlak kese biçiminde sporangium oluşur ve içerisinde sporangiosporlar oluşur. Sporangium açıldığında sporlar etrafa yayılarak çimlenir (Murray ve ark., 2015).

Eşeyli üreme sporları ise askospor, basidiospor, zigospor ve oosporudur. Şekil 2.2’de eşeyli üreme sporları görülmektedir.



Şekil 2.2. A) Oospor, B) Zygospor, C) Askospor görüntüleri

Askospor: Askus denilen kesenin içerisinde oluşan sporlardır (Arda, 2015; Murray ve ark., 2015).

Basidiospor: Lobut şeklinde basidium içerisinde sporlardır. Basidiumdan çıkan miselyumlar ile sporlar dışarı atılır (Arda, 2015; Murray ve ark., 2015).

Zygospor: Komşu iki zigogametinin birleşmesi sonucu kalın çeperli zygospor oluşur (Arda, 2015; Murray ve ark., 2015).

Oospor: Aynı karakter ve görünüme sahip erkek gamet (antheridium) ve dişi gametin (oogonium) birleşmesi sonucu oluşur (Arda, 2015; Murray ve ark., 2015).

Mantarların sınıflandırılması eşeyli spor yapıları dikkate alınarak yapılmış ve dört bölümde toplanmıştır. İnsanlarda patojen olan mantarlar ise üç bölümde yer alır.

Zygomycota: Mantarlar alemini az gelişmiş bölümünü oluşturur. Septasız ve hiyalen hiflere sahiptirler. Eşeyli sporları sporangiospordur ve haraketsizdir. Zygospor ile de eşeyli üreme gerçekleşir (Murray ve ark., 2015).

Basidiomycota: Mantarlar aleminde nispeten daha gelişmiş mantarları içerir. septumlu ve filamentli yapıda oldukları gibi tipik maya yapısında formları bulunmaktadır. Eşeyli üreme basidium adı verilen hücrenin basidiosporları oluşturmasıyla gerçekleşir (Murray ve ark., 2015).

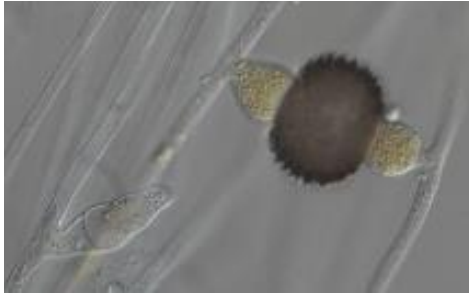
Ascomycota: Tıbbi önemi olan mantarların büyük kısmını içerir. Askus adı verilen kesenin içerisinde askosporlar oluşur. Askus yapısındaki farklılıklar bu mantarların sınıflandırılmasında önemlidir (Murray ve ark., 2015).

Taksonomik olarak mantarlar genel kurallara uygun olarak isimlendirilirler. Bunlar şu şekilde sıralanabilir; division: -mycota, class: -mycetes, order: -ales, familya: -aceae (İnci, 1999).

2.2.1. Mucorales Takımı Genel Özellikleri

Zygomycota bölümü Mucormycotina alt bölümünde yer alan Mucorales takımındaki türler, hızlı ürer ve insan vücut sıcaklığında yaşayabilmenin yanı sıra çok sayıda termofilik tür de içerir.

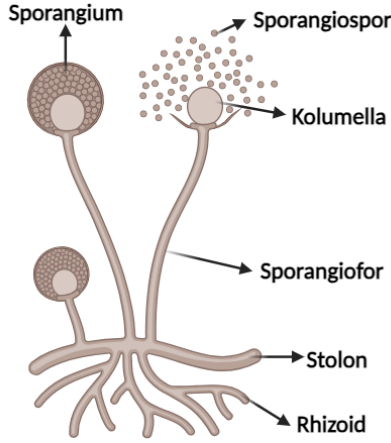
Mucorales üyeleri eşeyli olarak zigosporlar ile ürerler. Bunlar, sitoplazma ve çekirdeklerin füzyonu dahil, iki farklı hif ucunun füzyonu ile oluşan kalın duvarlı ve pigmentli sporlardır. Şekil 2.3.'de zigospor yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3. Zigospor görüntüsü (Walther, Wagner, & Kurzai, 2019)

Mucorales takımı mantarlarda septa içermeyen ve çok sayıda çekirdek içeren hifler (sönotitik miçeller) tipiktir. Septalar nadiren görülebilir ve genellikle üreme yapılarını veya şişmiş kısımları sınırlamak için oluşturulur. Eşeysiz sporları sporangiofor adındaki hif ile taşınan sporangium içerisinde üretirler ve değişik renk, şekil ve dizilimdeki bu sporlara sporangiospor denir. Sporangioforları taşıyan özelleşmiş hiflere ise stolon adı verilir. Bazı cinslerde sporangiofor ile sporangiumun birleştiği yer genişleyerek apofiz adındaki yapıyı oluşturur. Sporangium içinde sporlardan zar ile ayrılmış değişik şekillerdeki veziküller yapıya ise kolumella denir. Bazı cins ve türlerde ise besiyeri ya da substratın içine doğru gelişen köke benzer yapılara rizoit adı verilir. Şekil 2.4.'de Mukorales takımı mantarların genel mikroskobik yapısı görülmektedir.

Bazı familyalarda ise ayırt edici, özelleşmiş yapılar bulunmaktadır. Örneğin; Syncephalastraceae ailesinde sporangium küresel değil, merosporangium adı verilen kolumellası olmayan silindir şeklindedir. Değişik sayıdaki aseksüel sporlarına da “merospor” denir. Thamniaceae ve Cunninghamellaceae ailelerinde ise sporangiyum tek ya da çok az sayıda spor taşır ve sporangiyol adını alır.



Şekil 2.4. Mucorales tanımı mantarlarda genel mikroskobî

Mucorales 55 cins içinde 261 tür içerir. Bu 261 türden 38'inin insan enfeksiyonlarına neden olmuştur. Fırsatçı türleri içeren cinsler şunlardır: *Actinomucor*, *Apophysomyces*, *Cokeromyces*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Saksenaea*, *Syncephalastrum* ve *Thamnostylum* (Benny, Smith, Kirk, Tretter, & White, 2016; Spatafora ve ark., 2016; Wijayawardene ve ark., 2018). ITS dizilerine dayalı moleküler tür tanımlaması, türleri güvenilir bir şekilde ayırt ettiği için Mucorales'te tercih edilen yöntemdir. Mucorales takımı mantarların sistematigi Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1. Mucorales takımı mantarların sistematigi

Kingdom	Fungi
Phylum	Zygomycota
Subphylum	Mucormycotina
Class	Mucormycetes
Order	Mucorales
Familya	Mucoraceae
Genus	Rhizopus
	Rhizomucor
	Mucor
	Lichtheimia
	Actinomucor
	Apophysomyces
Familya	Cunninghamellaceae
Genus	Cunninghamella
	Cokeromyces
Familya	Syncephalastraceae
Genus	Syncephalastum
Familya	Saksenaeaceae
Genus	Saksenaea
Familya	Thamnostylaceae
Genus	Thamnostylum

2.3. Mukormikoz

Mukormikoz ilk olarak 1876 yılında Almanya’da kanserden ölen bir hastada tanımlanmıştır. Hastanın sağ akciğerinde mantar hifleri ve birkaç sporangium görülmüştür. Arnold Paltauf “Mycosis mucorina” adı ile ilk dissemine mukormikoz vakasını 1885’te yayınlamış ve bu enfeksiyonun bugün *Lichtheimia corymbifera* enfeksiyonu olduğu düşünülmüştür (Kwon, 2012). Ülkemizde ise 1966 yılında Doğulu ve ark. (15) tarafından yayınlanan serebral mukormikoz ilk olgudur. (Doğulu, Yardım, Tezok, Gülşen, & Akkaya, 1966)

Zygomycota phylumunda yer alan Mucorales takımı mantarlardan en sık görülen etkenler *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp. olup bunları *Rhizomucor* spp., *Saksanea* spp., *Cunninghamella* spp., *Apophysomyces* spp. takip eder (Kwon, 2012). Bu takımda bulunan mantarlar hastanın altta yatan hastalığına ve enfeksiyonun vücuda giriş noktasına bağlı olarak rinoserebral, pulmoner, gastrointestinal, dissemine, kutanöz gibi değişik klinik formlarda ortaya çıkabilir.

2.3.1. Epidemiyoloji

Mucorales takımı bağışıklığı bozulmuş konakta aniden gelişen, hızlı ilerleyen ve sonu ölümle sonuçlanabilen enfeksiyonlara neden olmaktadır (Malcolm, & Pirkko, 2007). Hematolojik malignite, uzun süreli nötropeni, kontrolsüz diyabet, solid organ nakli, kemik iliği transplantasyonu, uzun süreli kortikosteroid kullanımı, HIV, tramva en sık karşılaşılan predispozan faktörlerdir (Cornely ve ark., 2019). Bunların yanı sıra ciddi yanıklar, intravenöz kateterler, intravenöz madde alımı, böcek ısırması ile oluşan deri travmaları ile immunkompetan kişilerde de mukormikoz gelişebilir. Ayrıca hastanelerde çarşaf, yastıklar, dil basacakları, bandajlar gibi ortak kullanılan malzemelerle ilişkili salgınlar da gösterilmiştir. Bunların oluşturduğu enfeksiyonlar genellikle deri enfeksiyonlarıdır (Cheng ve ark., 2016; Sundermann ve ark., 2019).

Solunum yolu ile sporların alınması durumunda pulmoner ve rinoserebral enfeksiyon görülürken kontamine yiyecek ve tabletlerin yutulması veya dil bastırıcılarının kullanılması sonucunda gastrointestinal mukormikoz görülebilir (Rammaert ve ark., 2012).

Mukormikoz için risk faktörleri coğrafi bölgelere ve ülkelerin gelişmişlik durumuna göre değişiklik göstermektedir (Skiada ve ark., 2020). Gelişmiş ülkelerde predispozan faktör olarak en sık hematolojik malignite ve solid organ transplantasyonu görülürken, gelişmekte olan ülkelere kontrolsüz diabetes mellitus ve travma en sık etken olmuştur (Slavin ve ark., 2015).

Bazı çalışmalar ise enfeksiyon yerinin altta yatan hastalık ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Jeong ve ark., 2019; Roden ve ark., 2005; Skiada ve ark., 2011). Pulmoner mukormikoz hematolojik malignite ve nötropeni olan hastalarda daha sık karşılaşılrken rinoserebral mukormikoz diyabet ve sinüziti olan hastalarda daha sık görülür. Travma sonrası ise genellikle kutanöz mukormikoz ile karşılaşılr (Skiada ve ark., 2020).

Mukormikoz için risk faktörlerinden biri de *Aspergillus*'a etkili ama *Mucorales* takımına etkili olmayan vorikonazol ve ekinokandin grubu antifungallerin tedavi veya profilaksi amacı ile kullanılmasıdır. Uzun süreli vorikonazol kullanımı ile mukormikoz ilişkisine dair ilk yayın 2004 yılında yapılmıştır (Marty, Cosimi, & Baden 2004). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada insidansın kullanılan antifungale, lokal epidemiyolojiye ve hastaya bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Lionakis, Lewis, & Kontoyiannis 2018).

Bağıışıklığı yeterli hastalarda da görülen mukormikoz vakaları bulunmaktadır. Dağa önceden yapılan iki büyük çalışmadan Roden ve ark. yaptığı yayında vakaların %19'unun Jeong ve ark. yaptığı yayında ise toplam vakaların %18'inde altta yatan hastalık bulunmamıştır (Jeong ve ark., 2019; Roden ve ark., 2005). Ancak bu gibi durumlarda predispozan faktör bütünlüğü bozulmuş deridir. Deri bütünlüğü ise yanıklar, hayvan ısırıkları, trafik kazaları, cerrahi işlemler veya doğal afetler ile bozulabilir.

Mukormikoz görülme sıklığı artmaktadır ancak az sayıda popölasyona dayalı çalışma olduğu için kesin bir insidans-prevalans yoktur. Bunun çeşitli sebepleri vardır. Verilerin vaka raporu veya vaka serileri şeklinde çalışmalardan oluşması, zor tanı veya tanı protokollerindeki farklılıklar, kültürde üreme olmaması bunların başında gelir. Ayrıca küresel bir oran olmadığı için de karşılaştırma yapılabilecek bir veri havuzu bulunmamaktadır (Cornely ve ark., 2019; Roden ve ark., 2005).

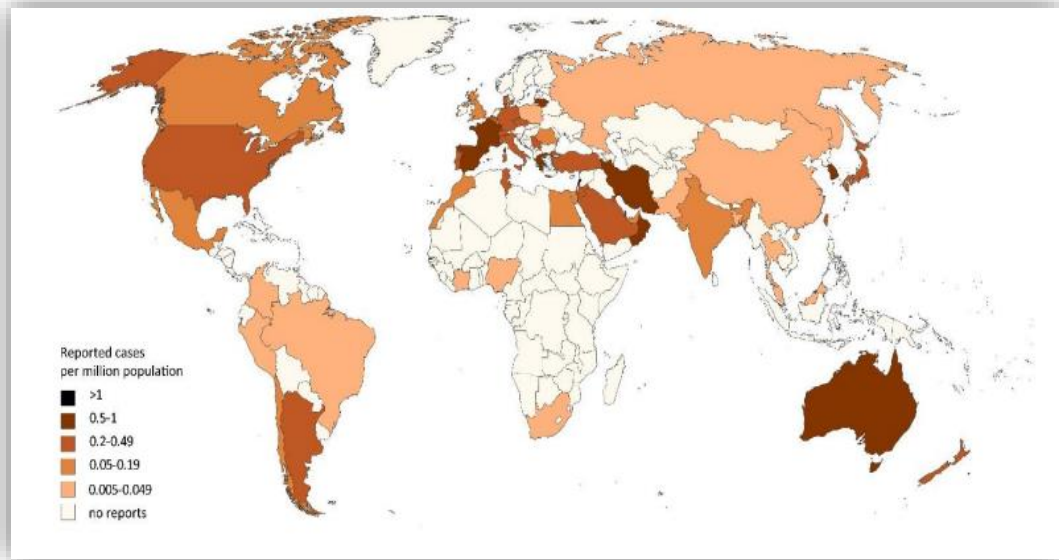
Literatürde ilk kapsamlı inceleme Roden ve ark. tarafından 2005 yılında yapılmıştır. Bu çalışma 1940-2003 yılları arasında yayınlanan, entomoforamikoz olguları dahil 929 olguyu içermektedir (Skiada ve ark., 2020). Ardından Jeong ve ark. 2000-2017 yılları arasında yayınlanan 851 vakayı analiz etmiştir. Bu çalışma, PRISMA

(Sistematik incelemeler ve Meta-Analizler için Tercih Edilen Raporlama Öğeleri) kılavuzları kullanılarak yapılmış ve raporlanmış ve yalnızca Mucorales takımı mantarların neden olduğu vakaları içermektedir (Jeong ve ark., 2019; Skiada ve ark., 2020).

Yapılan prevalans çalışmalarında net bir artış olduğu gözükmemektedir. Mesela Fransa’da nüfusa dayalı yapılan bir çalışmada, mukormikoz prevalansı 1997’de milyonda 0,7 vaka iken, 2006’da milyonda 1,2’ye yükseldiği görülmüştür (Lanternier ve ark., 2012). Aynı şekilde Belçika’da yapılan bir çalışmada da 2000 yılında milyonda 1,9 vaka iken 2009 yılında milyonda 14,8 vakaya yükselmiştir (Saegeman ve ark., 2010). İspanya’da tek bir merkezde yapılan bir çalışmada 2007 yılından önce mukormikoz nedeniyle hastaneye yatış milyonda 12 iken 2007 sonrasında bu sayı 33’e çıkmıştır. İsviçre, İran, Lübnan gibi ülkelerde yapılan prevalans çalışmalarında da artışlar olduğu görülmüştür (Cornely ve ark., 2019).

Hindistan’da ise mukormikoz prevalansı gelişmiş ülkelerdeki prevalansın yaklaşık 80 katıdır. Bu da 1000 nüfus başına yaklaşık 0.14 vakaya denk gelmektedir (Chander ve ark., 2017).

Bu artışların sebebi fiili olabileceği gibi hastalık hakkında artan bilgi ve daha gelişmiş tanı yöntemleri olabilir (Skiada ve ark., 2020). Şekil 2.5.’de mukormikoz dünyadaki insidansı görülmektedir.



Şekil 2.5. Mukormikoz insidansı ve ülkelere dağılımı

2.3.2. Patogenezi

Mukorales takımı mantarlar doğada oldukça yaygın olmalarına rağmen sekonder enfeksiyonlar oluştururlar. Düşük virülanslı olmaları ve üreyebilmeleri için uygun koşulların varlığı, bunun en önemli sebebidir. Uygun koşullar oluştuğunda vücuda giren Mukorales takımı mantarlara ait sporlar önce germine olur. Germinasyon için ise konağın doğal ve spesifik humoral ve hücrel immün sisteminden kaçabilmesi gerekmektedir. Normalde düşük virülanslı olduğu için bu oldukça zordur. Sporlar hedef dokuya girdiklerinde makrofajlar hızla o bölgeye göç ederek hif ve sporları öldürür ve germinasyonu engeller. Ancak kişi nötroopenik veya fagosit fonksiyonları bozuk ise bu savunma mekanizması olmayacağı için mukormikoz gelişme riski artacaktır. Hiperglisemi ve asidoz fagositlerin kemotaksis ve öldürme yeteneğini bozmaktadır (Chinn, & Diamond, 1982; Diamond, Haudenschild, & Erickson 1982; Topçu, Söyletir, & Doğanay, 2002).

Demir mantarların hayatta kalabilmesi için gerek duyduğu kilit elementtir. Yapılan çalışmalarda yüksek seviyelerde demir olan hastaların mukormikoza karşı duyarlılığının arttığını göstermektedir (Boelaert ve ark., 1994). Bu nedenle kandaki yüksek demir seviyeleri hiperglisemi ve diyabetik ketoasidoz (DKA) gibi asidozlu hastalarda mukormikoz duyarlılığı artmaktadır. Kandaki düşük ve anormal pH, plazma şelatörlerini destabilize eder. Böylece demirin proteinden ayrılmasını kolaylaştırır ve serumdaki serbest demir konsantrasyonunu artırır.

Mukorales takımı mantarlar için iki demir alım yolu bulunmaktadır. Bunlardan ilki; yüksek afiniteli demir alım mekanizmasıdır. Bu mekanizma üç proteinden oluşmaktadır. Bunlar; demir redüktaz (Fre), ferroksidaz (Fet3), demir permeaz (Ftr1)'dir. Burada permeaz ve ferroksidaz sistemin doğru çalışması için anahtar proteinlerdir (Navarro-Mendoza ve ark., 2018). İkincisi ise sideroforların kullanımınıdır. Sideroforlar, demiri yüksek afinite ile tutan küçük moleküllerdir. Bunlar çevrede var olan demiri almak için konak ile rekabet eder (Haas, 2003). Mukorales ortamdan demiri almak için bu iki yolu da kullanabilir.

Rhizoferrin, bazı mukorales türleri tarafından üretilen karakterize bir endojen siderofordur (Thieken, & Winkelmann, 1992). Ksenosiderofor ise *Rhizopus* spp. patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Deforoksamin, mukormikoz vakalarında en sık

görülen ksenosidefordur. Bu demir alım mekanizmaları Mucorales takımı mantarların konak içinde hayatta kalmalarını ve yayılmalarını sağlar (İbrahim ve ark., 2007).

Mukormikozun en belirgin özelliklerinden biri de anjioinvazyon yapmasıdır. Böylece doku nekrozu ve tromboza neden olur. Bu sebeple endotelial hücrelerin hasarı ve patojenlerin içeri girmesi de önemli bir adımdır. CotH atipik bir protein kinazdır. İnvazif olan patojenlerin sporlarında bulunabilir ve mucorales suşlarının da ortak bir özelliğidir (Gebremariam ve ark., 2014). CotH protein kinazları, Mucorales takımı mantarlara konakçı dokulara yapışma ve hasara neden olma yeteneği verir (Liu ve ark., 2016).

CotH proteinlerinin aracılık ettiği doku invazyonu mekanizması CotH2-CotH3'ün epitel hücrelerinin yüzeyinde GRP78 (glikozu regüle eden protein 78) ile etkileşimine dayanır. GRP78 ile CotH3 proteini bağlandığında invazyon ve doku hasarının kolaylaştığı görülmüştür. Mukormikoz gelişiminde CotH ve GRP78'in önemi in vivo modeller kullanılarak da incelenmiştir. DKA'lı farelerde, yüksek konsantrasyonlarda demir ve glikoz varlığı GRP78'in aşırı ekspresyonu ve hastalığa daha yüksek duyarlılık olduğu görülmüştür. Nispeten, CotH2 ve CotH3'ün azaltıldığında ise GRP78'in ekspresyonu normal seviyelerin üzerinde olsa bile R. delemar'ın virölansını azalmıştır (Liu ve ark., 2010).

2.3.3. Klinik Tablolar

Mukormikoz olguları çoğunlukla başka bir hastalığın tedavisi sırasında ortaya çıkar ve çoğu zaman erken teşhis edilemez. Lezyonların anatomik dağılımı etkenin girişi yeri ve hastanın altta yatan hastalığı ile ilişkilidir. En önemli klinik tablolar; Rinoserebral mukormikoz, pulmoner mukormikoz, kutanöz mukormikoz, gastrointestinal mukormikoz ve dissemine mukormikozdur.

2.3.3.1. Rinoserebral Mukormikoz

Mukormikozun en sık görülen klinik formu olup paranazal sinüslerden başlar ve yüz, damak, orbita ve beyine doğru ilerleyen bir yayılım gösterir. En sık diabetes mellitus (DM) hastalarında görülürken maligniteli hastalarda, solid organ nakli

alıcılarında da gözükabilir (Skiada ve ark., 2011). Nazal mukoza patojenin giriş kapısıdır. Sporangiosporların solunması ile patojen paranazal sinüse yerleşir. Konağın immün sistemini tarafından tutulamayan patojen germinasyon gerçekleştirir ve hızlıca çoğalmaya ve yayılmaya başlar. İlk sert ve yumuşak damağa ardından sinüslere ve sonra orbitalara ardından ise kranial bölgeye yayılabilir (Hosseini, & Borghei, 2005).

Yüz, göz ve baş ağrısı hastalardan gelen ilk şikayetlerdir. Bulanık görme, burundan pürülan akıntı gelmesi bunları takip eden belirtilerdir. Ateş, orbital inflamasyon, göz kapağında ödem, akut görme kaybı, yüzde veya damakta nekrozda ilerleyen dönemlerde gözüken komplikasyonlardır (Cornely ve ark., 2019; Kwon, 2012; Roden ve ark., 2005).

Tedavi için erken tanı önemlidir. Tanı için ise eskarlı veya nekrotik dokudan biyopsi ile histopatolojik görüntüleme ve kültür üremesi yapılmalıdır. Tedavi için de cerrahi debridman ve uygun antifungalın kullanımı ile multidisipliner bir yol izlenmelidir (Richardson, & Koukila-Kahkola, 2007).

2.3.3.2. Pulmoner Mukormikoz

Pulmoner mukormikoz patojenin aspirasyonu, solunumu veya hematolojik ve lenfatik yolla yayılımı ile ortaya çıkar. Klinik açıdan pulmoner mukormikoz ile pulmoner aspergillozu birbirinden ayırabilecek tipik ayırt edici bir belirti bulunmamaktadır. Çoğu olgu *Aspergillus* tedavisi sırasında kullanılan antifungal tedavi sırasında ortaya çıkar (Richardson, & Koukila-Kahkola, 2007). Ancak etkenin üretilmesi ile kesin tanı konulabilir. Ayrıca erken dönemde bilgisayarlı tomografide (BT) ters halo görülmesi invazif aspergillozdan ayıran bir bulgudur.

En sık maligniteli kemoterapi alan nütropenik hastalarda görülür. Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalar ve graft-versus-host hastalığı olan kişilerde de karşılaşılabilmektedir. DM hastalarında nadiren görülmektedir (Tedder ve ark., 1994). Genellikle uzun süreli yüksek ateş hastalardaki ilk şikayettir. Kuru öksürük de sıklıkla görülürken daha nadir olarak göğüs ağrısı ve dispne görülür (Gupta, Khullar, Behera, Radotra, & Sakhuja, 1998).

2.3.3.3. Kutanöz Mukormikoz

Kutanöz mukormikoz genellikle yanıklar, açık yara, cerrahi yaralar, intravenöz giriş yerleri, böcek ısırması, diken batması gibi deri bütünlüğü bozulması sonrası bu bölgeye mantar sporlarının bulaşması ile oluşmaktadır. Genellikle hastanın altta yatan hastalığı olmadığı durumlarda lokal kalır. Ancak predispozan bir faktör olması durumunda deri altı dokuyu etkileyebileceği gibi daha derinlerde kas, tendon ve kemiği etkileyen enfeksiyonlar da görülebilir. Kutanöz mukormikoz öyküleri daha çok DM hastalarında görülür. Buna rağmen diğer formlara göre daha az sistemik hastalıklarla ilişkilidir (Cornely ve ark., 2019; Topçu ve ark., 2002).

Başlangıçta ateş, şişme ve yarayı çevreleyen nekrotik eskar görünümü bu ihtimali düşündürmektedir. Apse, nodül, püstül, nekrotik ülser de oluşabilecek diğer semptomlardır (Cornely ve ark., 2019).

2.3.3.4. Gastrointestinal Mukormikoz

Gastrointestinal mukormikoz kontamine besin maddelerinin tüketilmesi sonucu mantarın sporlarının alınmasıyla sindirim sisteminde açığa çıkan bir enfeksiyondur. Lezyonlar sindirim sisteminde herhangi bir yerinde çıkabileceği gibi en sık midede görülmektedir. Klinik açısından diğer gastrointestinal sistem (GİS) hastalıklarına benzediği için tanısı çoğunlukla gecikir hatta genellikle hasta hayatta iken tanı konulamaz (Cornely ve ark., 2019). Çocuklarda, özellikle prematüre yeni doğanlarda görülmektedir. Hematolojik malignite, DM, kortikosteroid kullanımı da predispozan faktörler arasındadır.

Semptomlar tutulum olan bölgeye göre değişiklik gösterebilir. Karın ağrısı, bulantı, kusma en tipik semptomlardır. Hastada nekrotik ülser ve perforasyon, sepsis ve hemorajik şok ile sonuçlanan tablolar görülür.

2.3.3.5. Dissemine Mukormikoz

Dissemine mukormikoz iki veya daha fazla organ tutulumu şeklinde seyreden mukormikozdur. Tüm mukormikozların birbirinin ardından gelişebileceği gibi

pulmoner mukormikoz sonrası daha sık gözükür. GİS ve kutanöz mukormikoz sonrası daha az karşılaşılır. En sık karşılaşılan yayılım yeri beyin olup kalp, karaciğer, dalak ve diğer organlara da yayılım gösterebilir.

Tanısı genellikle ölüm sonrası konulabilir ve mortalitesi yüksektir. Derin immünsüprosyonu olan hastalarda, deferoksamin tedavisi gören hastalarda, derin nötropenik hastalarda karşılaşılma riski bulunmaktadır.

2.3.3.6. Diğer Mukormikoz Tabloları

Serebral mukormikoz; santral sinir sisteminin tutulmasıyla oluşan mukormikozdur. Renal mukormikoz; disemine mukormikoz vakaları dışında oldukça nadir görülen bir formudur. Osteomiyelit mukormikoz; endokardit mukormikoz, peritonit mukormikoz nadir görülen diğer mukormikoz tablolarıdır.

2.3.4. Tanı Yöntemleri

Mukormikozda erken tanı mortaliteyi azaltır. Erken tanı içinde multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir. Klinik bulgular iyi değerlendirilip radyolojik, histolojik ve mikrobiyolojik veriler toplanarak cerrahi ve medikal müdahalede bulunulmalıdır (Cornely ve ark., 2019).

2.3.4.1. Görüntüleme Yöntemleri

Görüntüleme yöntemleri kesin tanı sağlamamakla beraber kullanılması önerilir. Özellikle hastalığın yaygınlığı, tedavi planının yapılması ve tedavi yanıtının değerlendirilmesi için periyodik görüntüleme yapılması gereklidir. Hematolojik maligniteli hastalarda akciğerin BT'sinde ters "halo" görüntüsü pulmoner mukormikoz için oldukça tipik kabul edilir (Cornely ve ark., 2019).

2.3.4.2. Mukormikozda Örnek Alma

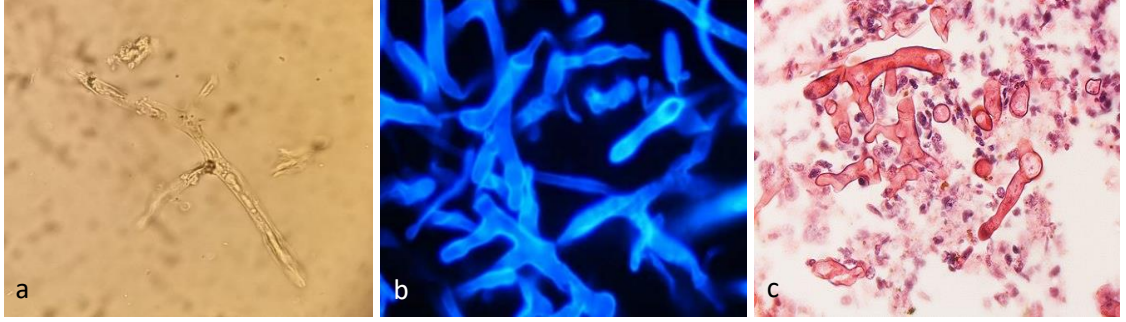
Histopatolojik ve direkt mikroskopik inceleme ile kültür için doğru örnek almak

çok önemlidir. Hızlı ilerleme gösteren mukormikoz genellikle aspergilloz ve fusaryozda da görülen doku nekrozuna neden olur. Bu sebeple kesin tanı için biyopsi örneklerinin histopatolojik ve direkt mikroskopik incelemesi ile kültürünün yapılması gerekir. Kutanöz mukormikoz olgularında sürüntü örnekleri kültür için uygun değildir. Ancak biyopsi alınamayacak hastalarda, duyarlılığının düşük olduğu göz önüne alınarak, bu yola başvurulabilir. Dissemine veya serebral mukormikoz olgularında kan kültürleri ve beyin omurilik sıvısının (BOS) tanıda yeri yoktur. Benzer şekilde pulmoner mukormikoz olgularında da bronkoalveolar lavaj (BAL) ve balgamin özgüllük ve duyarlılıkları düşüktür. Bu bölgelerden alınan örneklerdeki pozitif kültürler, her zaman klinik bulgular, radyolojik kanıtlar ve özgül olmayan laboratuvar verileriyle birlikte değerlendirilmelidir (Skiada ve ark., 2018; Richardson, & Koukila-Kahkola, 2007).

2.3.4.3 Örneklerin Histopatolojik ve Direkt Mikroskopik İncelenmesi

Mukormikoz tanısında histopatolojik ve direkt mikroskopik inceleme kültürden daha duyarlıdır. Bunun sebebi Mucorales takımı mantarların frajil bir yapısı olması ve örnekler ekilirken yapılan işlemler sırasında canlılığını kaybederek üreyememesidir (Richardson, & Koukila-Kahkola, 2007). Ayrıca, mukormikoz hızlı yayılan bir enfeksiyon olması sebebiyle hızlı tanı sağ kalım açısından önemlidir. Bu sebeple özellikle direkt mikroskopik inceleme hızlı bir işlem olması nedeniyle erken tanıda önemlidir.

Şüphelenilen bölgeden alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesinde hematoksilin-eozin (HE), Gomori methamine gümüşleme ve periodik asit-schiff (PAS) gibi boyalar kullanılmaktadır. Direkt mikroskopik inceleme de örnek yoğun ise önce küçük parçalara bölünerek, %10-30 potasyum hidroksit (KOH) ile muamele sonrası lam lamel arası boyasız olarak incelenir. Ayrıca, görüntüyü belirgin hale getirmek için laktofenol pamuk mavisini veya kalkoflor beyazı, blankofor gibi floresan boyalar da kullanılabilir. Bu boyalar hiflerin görünmesi kolaylaştırır. Mucorales takımında enleri 6-25 µm genişliğinde septasız veya seyrek septalı geniş ve düzensiz hifler görülür. Hifler 45-90 derecelik açılarla dallanır ve bazan kurdele gibi katlanmalar yapabilir (Skiada ve ark., 2018). Şekil 2.6'da Mucorales takımının direkt mikroskopik inceleme görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 2.6. Mucorales takımının direkt mikroskopik görüntüsü. a: %30 KOH ile muamele sonrası lam lamel arası inceleme b: Kalkoflor beyazı ile yapılan inceleme c: PAS ile boyanmış histopatolojik preparat

2.3.4.4. Örneklerin Ekimi

Her ne kadar mukormikoz tanısında histopatolojik ve direkt mikroskopik inceleme daha duyarlı olsa da kültür mutlaka yapılmalıdır. Kültürün yapılması tür ve cins düzeyinde tanımlama yapmaya ve izolatın antifungal duyarlılık paternini belirlemeye olanak sağlar. “European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ESCMID) tarafından 2019 yılında yayımlanan kılavuzda da kültürün yapılması AII kanıt düzeyinde önerilmiştir (Cornely ve ark., 2019). Ancak, Mucorales takımı frajil yapıda olduğu için ekim yaparken örneğin fazla hırpalanmamasına dikkat etmek gerekir ve ekim deneyimli bir personel tarafından yapılmalıdır.

Mucorales takımı mantarlar hızlı ve petri kutusunu dolduran üremeleri ile diğer türlerden ayrılmaktadır. 25-37°C’da 24-48 saatte petri kutusunu dolduran yünümsü örgüde koloniler oluşturur. Koloni renkleri beyaz, grimsi veya kahverengi olabilir. ESCMID tarafından 2019 yılında yayımlanan kılavuzda, 30°C ve 37°C olmak üzere iki sıcaklıkta da inkübe edilmesi, bazı türlerin 30°C’da daha rahat üremesi nedeniyle tavsiye edilmiştir.

2.3.4.5. Tanıda Biyobelirteçler

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan GM ve BDG gibi hücre duvarı antijenlerinin mukormikoz tanısında yeri yoktur. Mukormikoza yönelik spesifik bir serolojik belirteç de yoktur. Ancak hematolojik maligniteli hastalarda, klinik ve BT bulgularının varlığında, GM testinin kan ve özellikle BAL sıvısında negatif olması mukormikoz açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (Cornely ve ark., 2019).

Galaktomannan ve BDG testlerinin mukormikoz tanısında yeterli olmamasından dolayı ilgi, moleküler testlerle özgül DNA aranmasına kaymıştır. Ancak henüz bir standart olmadığı için kullanım önerisi daha düşüktür. Bununla ilgili olarak “The International Society for Human & Animal Mycology (ISHAM)” çalışmalar yürütmektedir. Semi-nested PCR, real time PCR gibi değişik PCR yöntemleri ve rRNA 18S küçük alt birim, 28S büyük alt birim, ITS bölgelerine özgül primer ve prob’lar kullanılmıştır. (Cornely ve ark., 2019; Kontoyiannis, & Lewis, 2015). En iyi sonuçlar biyopsi örnekleri ile yapılan testlerden alınmıştır. Yapılan çalışmalar, taze dokuda PCR ile Mucorales takımı aranmasının, formalin ile fikse parafine gömülmüş dokularda aranmasından daha başarılı olduğunu göstermiştir. Formalin fiksasyonu esnasında DNA’nın parçalanmasının bu durumdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cornely ve ark., 2019). Biyopsi örnekleri iyi sonuçlar vermekle beraber alınması kolay olmadığından diğer örnekler de önemlidir. Hızlı tanı amacıyla BAL, kan ve idrar örneklerinden yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Millon, Scherer, Rocchi, & Bellanger, 2019). Bunun yanı sıra Mucorales tespiti için PCR tabanlı ticari bir kit (PathoNostics'ten MucorGenius) de vardır (Mercier ve ark., 2019).

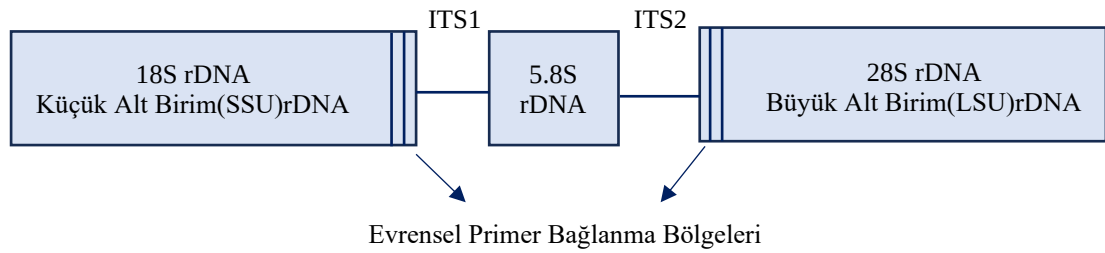
2.3.5 Mucorales Takımının Tanımlanması

Direkt mikroskopik inceleme ve koloni morfolojisi ile Mucorales takımını cins ve/veya tür düzeyinde tanımlamak kolay değildir ve deneyimli personel gerektirir. Fenotipik testler ve biyokimyasal reaksiyonların da başarılı olmaması, tanımlamada farklı yolların denenmesini gerekli kılmıştır. Tanımlamada korunmuş bölgelerin dizi analizi altın standart olarak kabul edilir. Ancak zaman alıcı ve rutin laboratuvarlar için uygun olmadığından MALDI TOF MS ile tanımlama giderek daha fazla önem kazanmıştır.

2.3.5.1. Moleküler Tanımlama

Mucorales takımının moleküler tanımlanması, korunmuş bölgelerin dizi analizi ile yapılır. Başarılı bir moleküler tanımlama için güvenilir bir hedef dizi veya gen seçilmelidir. Tür düzeyinde güvenilir bir tanımlama yapmak için çeşitli DNA bölgeleri değerlendirilmiştir. Bu bölgeler; ribozomal RNA bölgelerinden 18S, 28S ve ITS

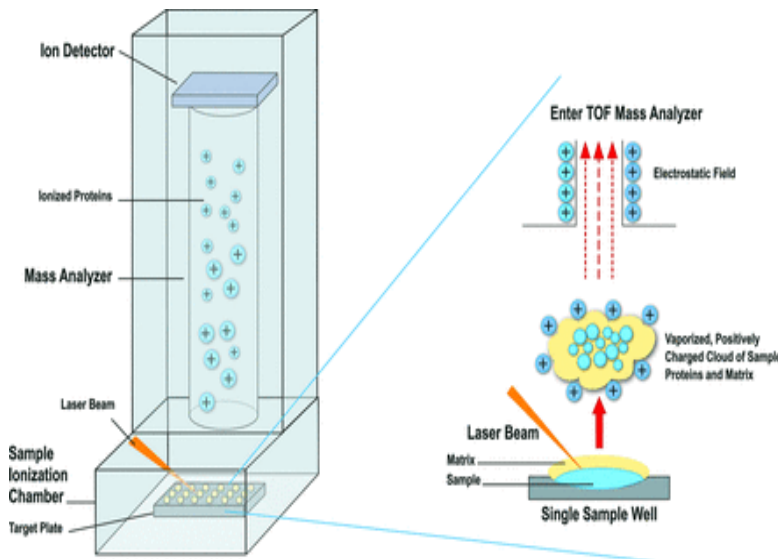
bölgelerdir (Cornely ve ark., 2019). Ancak bunlardan ITS dizisi cins ve genellikle tür düzeyinde tanımlama için hedef olarak CLSI kılavuzu tarafından önerilmiştir (Schwarz ve ark., 2006). Bu gen kompleksi ribozomal RNA (rRNA)'yı kodlayan çok kopyalı bir gen bölgesidir. Ökaryotik canlılarda bu gen bölgesi 18S küçük alt birim, 28S büyük alt birim ve 5.8S alt birimden oluşmaktadır. Bu üç gen kompleksi arasında onları birbirinden ayıran ITS bölgeleri bulunur. (Şekil 2.7) ITS1 ve ITS2 bölgeleri türler arasında değişiklikler göstermektedir. Bu bölgelerin, aynı türün bireyleri arasındaki farklılığının az, değişik türler arasındaki farklılığının fazla olması, tanımlamada altın standart olarak kullanılmasını sağlamıştır (CLSI, 2008; Balajee ve ark., 2009). Ancak bazı durumlarda bu gen bölgeleri yeterli gelmeyebilir. Bu gibi durumlarda ise β -tubulin, kalmodulin, 28S rDNA'nın D1/D2 bölgeleri ve EF-1 α genleri kullanılır (Larone, 2020).



Şekil 2.7. Ribozomal DNA gen kompleksi

Bu gen bölgelerinin dizisi Sanger yöntemiyle yapılmaktadır. Sanger metodu 1977 yılında Frederick Sanger ve ekibi tarafından geliştirilen zincir sonlandırma tekniğidir (Bolukbasi, E. & Aras, E. S., 2015). Bu yöntemde, test edilen organizmadaki gen bölgesi öncelikle PCR ile çoğaltılır. Sonra PCR'a benzer şekilde, DNA polimeraz enzimi kullanarak hedef DNA işaretlenir. Fakat PCR'dan farklı olarak reverse ve forward primerler aynı reaksiyon içerisinde bulunmaz, ayrı ayrı reaksiyonlara koyulmaktadır. Bu işlem ile çoğaltma değil işaretleme işlemi yapılmaktadır. PCR'dan bir diğer farkı ise hem DNA'nın uzaması için baz ekleyen deoksinekleotit trifosfat (dNTP) hem de DNA uzamasını engelleyen dideoksinekleotit trifosfat (ddNTP) kullanılmasıdır. Her biri için farklı renklerde olan dört tane ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) bulunmaktadır. Reaksiyon ilerledikçe her nükleotitin bir sonraki nükleotidin 3' OH ucu ile birleşir, ancak ddNTP'nin 3' OH olmadığı için zincirin uzaması durur ve zincirin son nükleotidi oluşmuştur. Bu uçta dört farklı renk boya olur. Uzayan

Klinik mikrobiyoloji uygulamaları için kullanılan MALDI TOF MS sisteminin temel prensibi peptitler ve proteinler gibi biyomoleküllerin kütle/yük oranıdır. MALDI ölçümü aslında incelenen numunenin moleküllerinin, iyonizasyonu için kullanılan faz ile lazer enerjisini absorbe edebilen yardımcı bir malzeme (matriks) yardımıyla iyonize edilmesidir (Beavis, & Chait, 1989). Analitler, lazer enerjisini analitin makromoleküllerine aktaran matriksin kristaline gömülür (Batoy, Akhmetova, Miladinovic, Smeal, & Wilkins, 2008). İşlem sırasında, test numunesinden makromolekül-matriks kompleksleri salınır (desorpsiyon fazı) ve daha sonra ortaya çıkan moleküler iyonlar, yüksek vakum ve hızlandırma voltajı altında analiz cihazına iletilir. Test edilen numunenin kütle spektrumunun veri tabanındaki spektrumlarla ilişkisini belirlemek için referans spektrumlar veya ayrıştırılmış spektrumlar veri tabanı ile karşılaştırılır ve en yakın ilişkili organizmalar sıralanır. Genel olarak kütle spektrumları; cinslere, türlere ve suşlara özgü piklerle belirlenir. Değerin yüksekliğine bağlı olarak organizma cins veya tür düzeyinde tanımlanır (Patel, 2015). Şekil 2.9’da MALDI TOF MS sisteminin çalışma düzeneği görülmektedir.



Şekil 2.9. MALDI-TOF’un çalışma düzeneği. (Patel, 2015)

MALDI TOF MS yönteminde öncelikle kültürden elde edilen bakteri veya maya kolonileri steril bir kürdan ile alınarak plate’in üzerindeki kuyucuğa sürülür ve üzerine 1 µ matriks damlatılarak kurumaya bırakılır. Burada kullanılan matriks α -HCCA (%50 asetonitril ve %2,5 trifloroasetik asit içinde çözündürülmüş α -siyano-4-hidroksisinnamik asit)’dir. Matriks analit karışımı plate üzerinde kristallendikten sonra genellikle UV

lazerden gelen lazer bombardımanına tutulur. Matriks lazer enerjisini emerek ısı enerjisine dönüştürür. Oluşan ısı analitteki moleküllerin proton kazanarak veya kaydederek iyonize olmasını sağlar. Böylece moleküller buharlaşır ve serbest gaz haline geçer. İyonize olan moleküller önce elektrostatik alan tarafından hızlandırılır ve dedektöre ulaşmak için de vakuma tabi tutulan bir uçuş tüpüne aktarılır. Bu amaçla moleküllerin bir metre uzunluğundaki uçuş tüpü içerisindeki hareketlerini hızlandırmak için 20 kV elektrik voltajı uygulanır. Cihaz içinde oluşan vakumlama, hava molekülleri ile iyonların temasını önlemektedir (Posteraro ve ark., 2013; Yılmaz, 2020). İyonlar uçuş tüpünde hareket ederken, bir reflektör ile dedektöre yansıtılır. Küçük iyonlar daha hızlı hareket etmesi sebebiyle büyük iyonlara göre dedektöre daha hızlı ulaşır. Dedektör iyonların uçuş süresini (TOF), analitin kütleini(m) ve yükünü(z) hesaplayarak (uçuş zamanı kütle spektrometrisi, TOF MS) analite ait bir kütle spektrumu oluşturur. Oluşan spektrumlar her mikroorganizma türüne özgü olduğundan bu spektrumlara kütle parmak izi denir. Bu spektrumlar daha sonra cihazın veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait tüm spektrumlarla karşılaştırılır ve tanımlama yapılır (Clark ve ark.,2013; Ölmez, 2020; Singhal ve ark., 2015). Tanımlamanın doğruluğunu tahmin eden bir log skor değeri (LSV) üretilir. $LSV \geq 1,70$ ise cinse özgü tanımlama olarak kabul edilir, $LSV \geq 2,00$ ise türe özgü tanımlama olarak kabul edilir (Clark ve ark.,2013).

Günümüzde ticari olarak dört tane farklı MALDI TOF MS sistemi bulunmaktadır. Bunlar; Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), Vitek MS (Biomerieux, Durham, NC, Fransa), Andromas (Andromas SAS, Fransa) ve Axima/Saramis (Shimadzu, Japonya) sistemleridir (Tekinaslan, 2022). Bu sistemlerden iki tanesi ise bakterilerin ve mantarların tanımlanması için Food and Drug Administration (FDA)’den onay almıştır. Bunlar; Biotyper CA System (Bruker Daltonics) ve Vitek MS (bioMérieux)’dir (Patel, 2015).

2.3.5.3 In Vitro Antifungal Duyarlılık Testleri

Mucorales takımı mantarlar için “EUCAST, E.DEF 7.3.2” ve “CLSI, M38” in vitro antifungal duyarlılıkta kullanılabilecek olan referans testler bulunmaktadır. Her iki kılavuzda da 24 saatlik inkübasyon sonrası minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)

belirleyen mikrodilüsyon yöntemi önerilmiştir. Mucorales takımı için in vitro/in vivo korelasyonu gösteren çalışmalar azdır ve elde edilen MİK değerlerini yorumlamak güçtür. Bu sebeple bazı türler için EED oluşturulmuş olmakla beraber iki referans yönteminde de KSD yoktur (Cornely ve ark., 2019).

2.3.6. Mukormikoz Tedavisi

Mukormikoz tanısı sonrası başarılı bir tedavi için öncelikle mümkünse predispozan faktör ortadan kaldırılır ardından cerrahi müdahale ve uygun antifungal tedavi gereklidir. Yapılan çalışmalar amfoterisin B'nin çeşitli türlere karşı daha iyi bir aktivite gösterdiği ve daha düşük MİK sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle bu takım üyelerinin sebep olduğu enfeksiyonlara amfoterisin B'nin lipid formülasyonları birinci basamak ajan olarak önerilmektedir (Cornely ve ark., 2019).

Azol grubu antifungallerden ise posakonazol ve isavuconazol tedavisi kurtarma tedavisi olarak önerilmektedir. Aynı zamanda ESCMID ve European Confederation of Medical Mycology (Avrupa Tıbbi Mikoloji Konfederasyonu [ECMM]) kılavuzlarında renal yetmezlik tablosu mevcut iken intravenöz olarak Lipozomal amfoterisin B yerine kullanılması önerilmiştir (Cornely ve ark., 2019). Bununla birlikte posakonazol ve özellikle isavuconazolün bu takıma karşı in vitro aktivitesine ilişkin veriler azdır. Yapılan çalışmalar daha çok bu iki antifungalın bazı Mucorales takımı üyelerinde daha düşük MİK değerlerinde olduğunu göstermiştir. Bu da bu antifungallerin türe özgü aktivite sağladığını düşündürmektedir (Borman, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM), Merkez Mikrobiyoloji (Mikoloji) Laboratuvarında -80°C’da saklanan, ayrı hastalara ait 87 *Mucorales* suşu kullanıldı. Çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 11 Mayıs 2022 tarihli ve 2022-10/13 no’lu karar ile izin alındı.

3.1. Suşların Canlandırılması

Bursa Uludağ Üniversitesi, SUAM, Merkez Mikrobiyoloji (Mikoloji) Laboratuvarında -80°C’da saklanmış olan *Mucorales* takımı suşlar, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA: Oxoid, Hampshire, İngiltere) besiyerine pasajlanarak 37°C’da iki gün inkübe edildi. SDA’daki (Oxoid) üremelerden tekrar yeni bir SDA (Oxoid) besiyerine pasaj yapılarak aynı koşullarda yeniden inkübe edildi. Böylece üst üste yapılan iki pasaj ve inkübasyon ile suşların saflığı ve canlılığından emin olundu (Carolis ve ark., 2012).

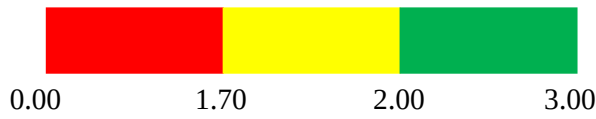
3.2. Suşların Koloni Morfolojileri ve Mikroskopik Morfolojilerinin İncelenmesi

Saflığından emin olunan suşlar yeni bir SDA (Oxoid) besiyerine pasajlanarak 37°C’da inkübe edildi. Kolonilerin boyutları yeterli düzeyde olduğu zaman (genellikle 2-3. gün) rengi ve dokusu açısından incelendi ve SAMSUNG GALAXY A6 SM-A6007F ile görüntüleri çekildi. Mikroskopik inceleme, laktofenol pamuk mavisi ile selofan bant yöntemi kullanılarak yapıldı. Mikroskopta hif ve spor yapıları incelenerek fotoğrafları SAMSUNG GALAXY A6 SM-A6007F ile çekildi. Suşların koloni ve mikroskopik morfolojileri, “Atlas of Clinical Fungi” kullanılarak incelendi ve tanımlama yapılmaya çalışıldı (Hoog ve ark., 2020).

3.3. MALDI-TOF-MS ile Tanımlama

Microflex LT/SH mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) cihazı, MALDI-TOF-MS ile tanımlamada kullanıldı. FlexControl 3.4 yazılım

programıyla (Bruker Daltonics) 2.000 ila 20.000 kDa kütle aralığında pikler (spektrum) elde edildi. Bilinmeyen bu spektrumlar MBTCompass yazılımı (Bruker Daltonics) aracılığıyla kütüphanedeki (Filamentous Fungi Library [FFL4.0 Bruker Daltonics]) türlerle eşleştirildi ve tür tanımlaması yapıldı. Elde edilen skorlar 0.00- 1.69 arası ise güvenilir olmayan tanımlama; 1.7-1.99 arası cins düzeyinde güvenilir ancak tür düzeyinde güvenilir olmayan tanımlama; ≥ 2.0 skorlamalar ise tür düzeyinde güvenilir tanımlama olarak değerlendirildi (Shao ve ark., 2018). Şekil 3.1’de Bruker Daltonik’in de önerdiği skorlara göre renk değerlendirmesi görülmektedir.



Şekil 3.1. MALDI TOF MS’in skorlara göre renk değerlendirmesi

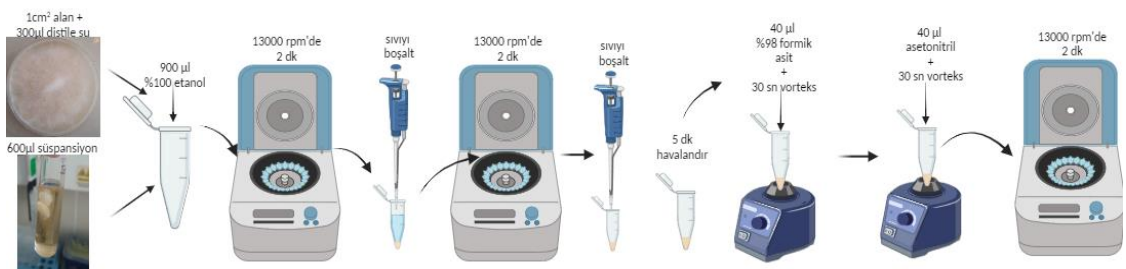
MALDI TOF MS ile öncelikle beş suş dört farklı yöntem ile tanımlandı. Bu yöntemlerden ilkinde, SDA (Oxoid) besiyerinde olan üremeden alınan bir parça, MALDI-TOF-MS “target” (Bruker Daltonik) üzerine konuldu ve üzerine 1 µl, %50 acetonitril (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, ABD) ve %2,5 triflorasetik asit (Bruker Daltonik) içinde satüre, matriks (α -cyano-4 hydroxy-cinnamic asit [HCCA; Bruker Daltonik]) damlatılarak okutuldu. İkinci yöntemde ise mayalardaki gibi örneği “target”e (Bruker Daltonik) koyup, üzerine %70’lik formik asit (Merck & Co., Inc) damlatıp kurumaya bırakıldı ve kuruduktan sonra satüre matriks (HCCA; Bruker Daltonik) damlatılarak okutuldu. Üçüncü yöntem olarak katı besiyerinden protein ekstraksiyonu, dördüncü yöntem olarak ise sıvı besiyerinden protein ekstraksiyonu yapıldı ve beş suşla yapılan bu ön çalışma sonuçları değerlendirilerek başarılı bulunan iki yöntemle diğer suşlar tanımlandı.

3.3.1 MALDI TOF MS Tanımlama için Protein Ekstraksiyonu

Katı besiyerinden yapılan ekstraksiyonda, Mucorales suşları SDA’da (Oxoid) 24 saat 37°C’da üretildi. Mikro santrifüj tüplerine (Eppendorf AG [120.086], Hamburg, Almanya) 300 µl distile su koyup üzerine katı besiyerindeki koloniden 1cm² kadar alan eklendi. Daha sonra üzerine 900 µl %100 etanol ilave edip 13000 rpm’de iki dakika

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dipte kalan çökeltiye zarar vermeden üstteki sıvı faz tüpten uzaklaştırılarak yeniden 13000 rpm’de iki dakika daha santrifüj edildi. Yeniden kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kuruması ve etanolün tamamen uzaklaşması için beş dakika bekletildi. Kuruyan peletin üzerine 40 µl asetonitril (Merck & Co., Inc) ilave edilip 30 saniye vortekslendi. Ardından 40 µl %98 formik asit (Merck & Co., Inc) koyulup 30 saniye daha vortekslendi ve 13000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi. Şekil 3.2’de bu ekstraksiyon basamakları resmedilmiştir. Bu işlemden sonra ekstraksiyonun üst kısmındaki sıvıdan 1 µl “target”e (Bruker Daltonik) damlatıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 1 µl satüre matriks (HCCA; Bruker Daltonik) damlatıldı ve yeniden oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra target cihaza yerleştirildi ve okuma yapıldı (Schwarz, Guedouar, Laouiti, Grenouillet, & Dannaoui, 2019; Cassagne ve ark., 2011)

MALDI-TOF-MS ile küfler ve çok hücreli mantarların tanımlanması halen problemlidir. Kültür koşulları bu problemin başlıca nedenidir. Katı besiyerindeki kolonilerden alarak yapılan tanımlama, bulaşan agar ve üreme yapılarının tek bir formda olmaması nedeniyle başarılı olmamaktadır. Kültür koşullarının kütle spektrumu üzerindeki etkilerini azaltmak ve tek tip formda üretime yardımcı olmak için standartlaştırılan sıvı bazlı bir yöntem geliştirilmiştir (Schulthess ve ark., 2014). Bu çalışmada da bu yöntem kullanıldı. SDA’da (Oxoid, England) 24 saat 37°C’da üreyen suşlardan 1 cm²’lik bir alan sıvı besiyerine (PDB: Pepton [10 gr] dekstroze [20 gr] broth [1000ml distile su]) aktarıldı. Bir gün oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra süspansiyondan 600 µl alıp mikro santrifüj (Eppendorf AG) tüpüne aktarıldı ve üzerine 900 µl %100 etanol ilave edilip 13000 rpm’de iki dakika santrifüj edildi. Bundan sonra, katı ekstraksiyon yöntemindeki aynı basamaklar (Şekil 3.2) uygulanarak devam edildi (Schulthess ve ark., 2014; Shao ve ark, 2018).



Şekil 3.2. Mantarların MALDI TOF MS ile tanımlanması için gerekli ekstraksiyon basamakları

Öncelikle mantar hücre duvarının yıkımı ve dokuların eritilmesi için SDA (Oxoid) besiyerinde üretilmiş koloniden bir parça (yaklaşık 1 cm² kadar), içinde 4-5 adet porselen boncuk (çapı: 3mm Genbiotek, İstanbul) olan iki ml'lik mikrosantrifüj tüpünün (Eppendorf AG) içerisine, homojenizasyon amacıyla kondu. Üzerine, ekstraksiyon kitinin içinden çıkan ve yüksek tuz içerikli “cetyltrimethyl ammonium bromide” (CTAB) tampon solüsyonundan 600 µl eklendi ve homojenizatörde (Allsheng Bioprep 6; Allsheng Instruments Co., Ltd., China) iyice karıştırıldı (90 sn 4350 hız/döngü; toplam 10 döngü). Ardından suşlar 65°C'da 30 dakika inkübe edildi. Böylece iyi bir homojenizasyon sağlandı. Daha sonra karışıma 600 µL kloroform: izoamil alkol (24:1) eklenip 30 sn vortekslendi ve 10 dakika 13000×g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üsteki sıvı faz yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) aktarıldı. Üzerine 150 µL CXD tampon solüsyonu ve 300 µL %100 etanol eklenip homojen bir karışım elde etmek için vortekslendi. Bir mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) bir HiBind DNA Mini Kolon yerleştirildi. Örneğin tamamı kolona aktarıldı ve bir dakika 10000Xg'de santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. HiBind DNA Mini Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) yerleştirildi. Üzerine 650 µL DNA yıkama tamponu kondu ve DNA yıkandı. Bu DNA yıkama işlemi iki kere yapıldı. HiBind DNA Mini Kolon matriksinin kurutulması ve artık etanolün uzaklaştırılması için mini kolon tekrar yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) yerleştirildi ve boş olarak 13000Xg'de iki dakika santrifüj edildi. HiBind DNA Mini Kolon temiz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) aktarıldı. Üzerine ısıtılmış (65°C) steril deiyonize su eklenip bir dakika oda sıcaklığında bekletildi ve bir dakika 10000xg'de santrifüj yapıldı (“Omega Bio-Tek”, t.y.). DNA kalitesi ve miktarı UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman-Coulter, Brea Ca, ABD) cihazında 280/260 nm dalga boyunda optik dansite ve konsantrasyon incelenerek belirlendi.

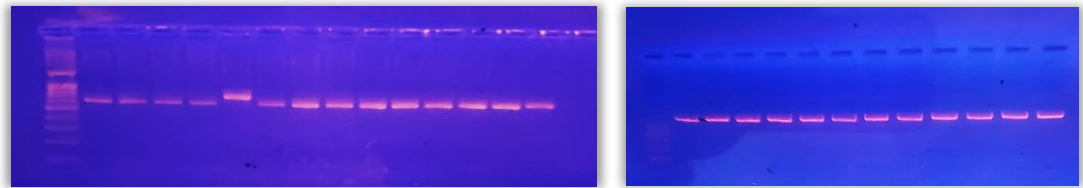
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyon

Bütün izolatlarda ITS bölgesi (ITS1 ve ITS2), universal primeler olan ITS1 (5'TCC GTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Lu ve ark., 2013). PCR işlemi, içeriğinde TaqTM DNA Polimeraz, reaksiyon tamponu (20 mM Tris-HCl, 80 mM KCl, 4 mM MgCl₂),

dNTP karışımı, enzim stabilizatörü, sediment yükleme boyası bulunan ExPrime Taq™ Premiks 2X (Genetbio Co., Ltd. Daejeon, Republic of Korea) ticari ürün ile yapıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda total hacim 20,5 µl olacak şekilde bir karışım (ExPrime Taq™ Premix 2X: 10µl, 1 nM forward ve reverse primerler [her birinden 1,5 µl], 100-1000 ng arası ekstrakta edilmiş DNA [3 µl] ve 4,5 µl nükleaz içermeyen su) oluşturuldu (“Genetbio”, t.y.). PCR reaksiyonu Techne TC-412 Thermal Cycler (Keison Products, Essex, UK) cihazında yapıldı. İlk denatürasyon 94°C’da 5 dk; ardından, 94°C’da 45 sn, 53°C’da 45 sn ve 72°C’da 2 dk şeklinde 35 döngü; son uzama ise 72°C’da 7 dk olarak ayarlandı (Lu ve ark., 2013).

3.4.3. Çoğaltılan Gen bölgesinin Agaroz Jelde Yürütülerek Görüntülenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan bölgenin kalitesi ve doğruluğu, %2’lik agaroz jelde elektroforetik olarak yürütülerek incelendi. Agorozun hazırlanmasında Tris- Borat- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)(TBE: 12,8 gr trizma-base, 5,5 gr borik asit, 4 ml 0.5M EDTA, bir litre distile su) tampon çözelti kullanıldı. TBE çözeltisinden 100 ml alındı ve 2 g agaroz (LE 500, Genetbio) eklenerek yaklaşık iki dakika 100°C’da kaynatıldı. İçine bantların görünürlüğünü sağlamak amacıyla 0.5 µg/ml etidyum bromür (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ilave edildi. Karışım, yatay elektroforez aparatına (Thermo Scinetific, ABD) dökülerek yaklaşık bir saat kurumaya bırakıldı. Tarak ile açılan kuyucuklardan ilkinde 100-1500 baz arası 100’lük açılıma sahip “marker” (100bp DNA Marker, M-1000, Genetbio), diğerlerine ise PCR ile çoğaltılan örneklerden 4 µl ve yükleme solüsyondan (6X DNA Loading Dye [10 mL], B-2006, Genetbio) 3 µl konuldu. Yürütme 90 Voltta 400 mA’de 75 dakika boyunca yapıldı. Oluşan bantlar ultraviyole (UV) ışık (Wealtech, ABD) altında incelendi. Mucorales takımı açısından oluşan bant uzunluğunun 500-800 baz arasında olması beklendi. Resim 3.2’ de PCR ürünlerinin jelde yürütülme görüntüleri görülmektedir.



Resim 3.2. PCR ürünlerinin jelde yürütülme görüntüleri

3.4.4. Pürifikasyon

Pürifikasyon E.N.Z.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek) kullanarak onun protokolüne uygun bir şekilde yapıldı. Bu sistemde, proteinlerin ve diğer maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayan, optimize edilmiş koşullarda DNA veya RNA'yı spesifik olarak bağlayan HiBind® matriks bulunmaktadır. Matrikse bağlanan nükleik asitler, diğer maddelerin uzaklaştırılmasından sonra deiyonize su veya düşük tuzlu tamponla kolaylıkla elde edilebilir (“Omega Bio-Tek”, t.y.). Resim 3.3’te E.N.Z.A. Cycle Pure Kit kutu ve içeriği gösterilmektedir.



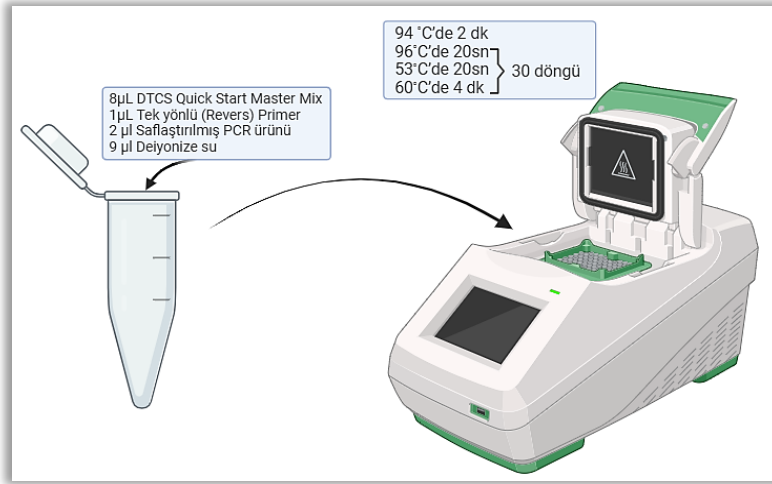
Resim 3.3. E.N.Z.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, ABD) ve içeriği

Çoğaltılmış PCR ürünü 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) aktararak üzerine dört katı kadar kitin içinden çıkan “CP Buffer” kondu ve vortekslendi. Kitte bulunan 2 ml’lik toplama tüpüne bir HiBind DNA Mini Kolon yerleştirildi. Örneğin tamamı kolona aktarıldı ve 24°C’da 60 sn 13000 rpm’de santrifüj edildi. Ardından çıkan süzüntü atıldı ve HiBind DNA Mini Kolon toplama tüpüne yeniden takıldı. DNA yıkama tamponundan 700 µl eklenerek bir dakika 14000 rpm’de santrifüj edilip süzüntü atıldı. Bu işlem iki kez yapıldı. Ardından iki dakika 14000 rpm’de kolonu kurutmak için santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atıldı. Kolon temiz mikrosantrifüj tüpüne (Eppendorf AG) yerleştirildi ve üzerine 35 µl steril deiyonize su eklendi. Oda sıcaklığında iki dakika bekletildi ve 14000 rpm’de 60 saniye santrifüj

edildi. HiBind DNA Mini Column atılıp saf hale DNA elde edildi (“Omega Bio-Tek”, t.y.). Pürifikasyon sonrasında da yukarıda anlatıldığı şekilde agaroz jel elektroforez ile bandların uygunluğu incelendi.

3.4.5. Dizi Reaksiyonu

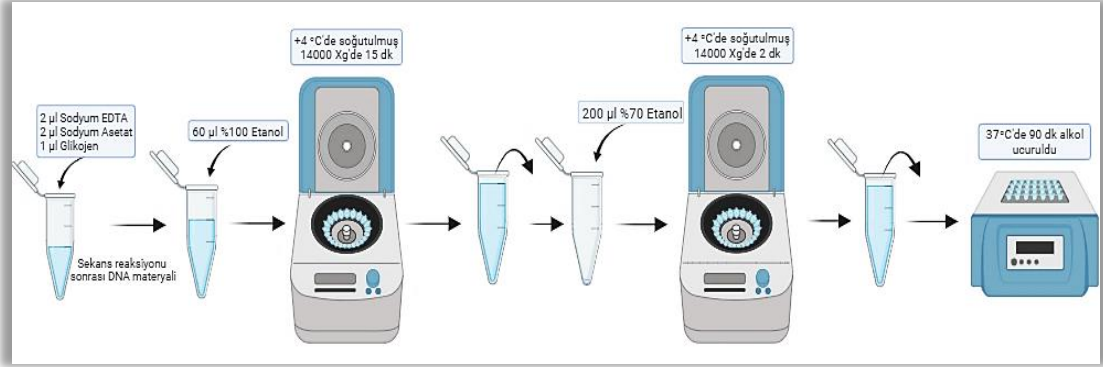
Dizi reaksiyonu için “Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS; Beckman-Coulter) Quick Start” kiti kullanıldı. Bu işlem sırasında tüm reaktifler buz üzerinde tutuldu ve belirli bir sıraya göre eklendi. Öncelikle 9 µl deiyonize su ince duyarlı bir tüpe kondu. Üzerine 2 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 1µl tek yönlü (revers) primer (10 pmol/ µl) ve 8µl “DTCS Quick Start Master Mix” eklendi. Dizi reaksiyonu 94°C’da 2 dk ve ardından 30 döngü olacak şekilde 96°C’da 20 sn 53°C’de 20 sn ve 60°C’de 4 dk olacak şekilde Techne TC-412 Thermal Cycler (Keison Products) cihazında yapıldı. Şekil 3.3.’de dizi reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.3. Dizi reaksiyon basamakları

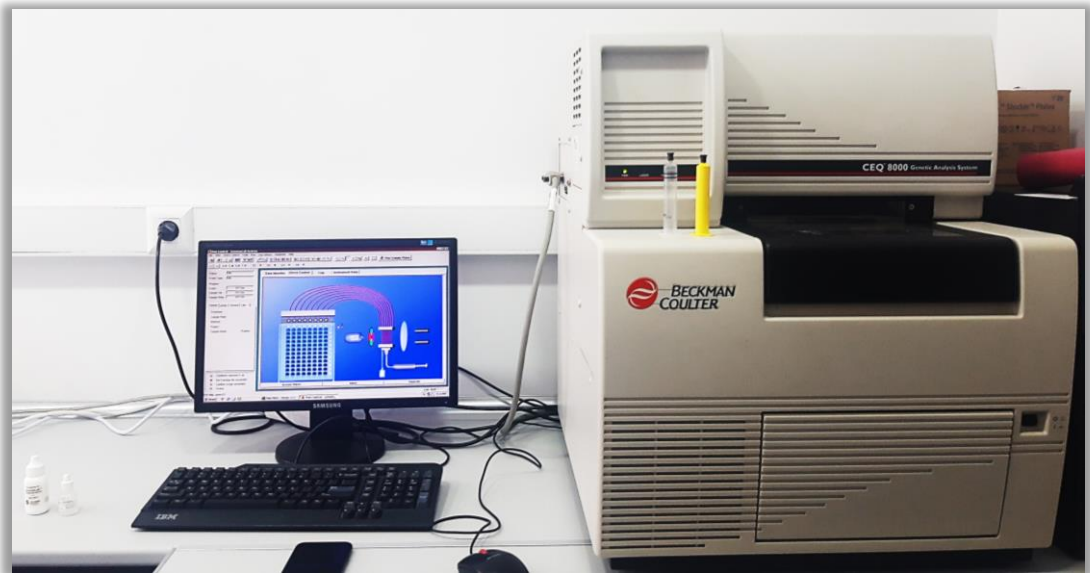
Reaksiyonunun sonlandırmak ve DNA’nın görünür olmasını sağlamak için alkolle çöktürme işlemi yapıldı. Her bir suş için 2 µl sodyum asetat (Sigma-Aldrich), 2 µl sodyum etilendiamin tetraasetik asit (EDTA; Sigma-Aldrich) ve 1 µl kitin içinden çıkan glikojen sonlandırma solüsyonu olarak mikro santrifüj (eppendorf AG) tüpünde hazırlandı. Üzerine dizi reaksiyonu eklendi. Karışım üzerine 60 µl %96’lık soğuk etil alkol (bio-Rad) ilave edilerek +4°C’da 14000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Çökeltiyi dokunmadan süpernatant atıldı ve 200 µl %70’lik soğuk etil alkol (bio-Rad) ilave

edilerek +4°C’da 14000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Yeniden süpernatant atıldı ve alkolün de uzaklaşması için 37°C’da 90 dk bekletildi ve kitin içinden çıkan 40 µl “Sample Loading Solution” içinde tekrar süspanse edildi. Alkolde çöktürme işleminin aşamaları şekil 3.4.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Alkolle çöktürme basamakları

Hazırlanan süspansiyon 96 kuyucuklu plağa (Beckman-Coulter; PN 609801) aktarıldı. Kitin içerinden çıkan mineral yağı her bir kuyucuğa bir damla damlatılarak plak cihaza (Beckman-Coulter CEQ8000) yüklendi (Resim 3.4.) ve dizi reaksiyonu programı (GenomeLab; GeXp) seçilerek işlem başlatıldı.



Resim 3.4. Beckman-Coulter CEQ8000 cihazı

3.5. Elde Edilen Dizilerin Analizi

Cihaz (Beckman-Coulter CEQ8000), analizi tamamladıktan sonra ham veri ekranda incelendi ve baş ve/veya sondaki uygunsuz kısımlar kesilerek “Fatsa formatında” indirildi. Fungal Internal Transcribed Spacer rDNA (ITS) RefSeq Targeted lokus projesindeki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA177353>) RefSeq dizileri kullanılarak BLAST veri tabanı oluşturuldu (URL: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/Fungi>) (Son Değişirme Tarihi: 2023-09-05). ITS RefSeq Targeted lokus projesi, uluslararası mantar taksonomistlerinin doğru isimlendirme için oluşturdukları bir proje olup MycoBank, Index Fungorum, ISHAM ve UNITE gibi uluslararası mantar kuruluşlarının kolebrasyonu ile gerçekleşmiştir (Nilsson ve ark., 2015). Sorgu dizileri, blastn (Sürüm 2.12.0+) programının megablastın metodu kullanılarak veri tabanına hizalandı (Zheng, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000). Verilerin, %96-%100 blastn ile eşleşmesi, E değerinin 0,0 olması ve sorgu dizisinin en az %95’ini kapsaması halinde anlamlı kabul edildi. Bu kriterleri karşılamayan veriler "tanımlanamadı" olarak değerlendirildi. Aynı cinse ait diziler, MAFFT (Versiyon 7.5.2.0) uygulaması ile hizalandı ve çoklu dizi hizalama FASTA dosyaları (MSA) oluşturuldu (Kazutaka, Kuma, Toh, & Miyata, 2005).

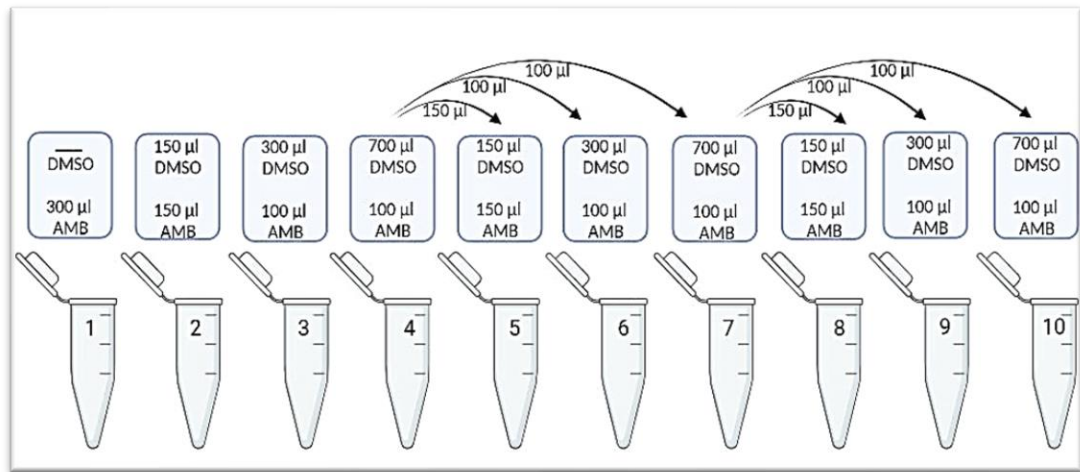
3.6. Suşların Antifungal Duyarlılığı

Mukormikoz tedavisinde kullanılan amfoterisin B ve posakonazolün in vitro antifungal etkinliğine, CLSI M38 tarafından küf mantarları için geliştirilen, standart mikrodilüsyon yöntemi ile bakıldı. İlaçların sulandırımı, inokulum hazırlanması ve miktarı, inkübasyon sıcaklığı ve zamanı, besiyeri formülü ve MİK belirleme gibi kriterler bu referans yönteme göre yapıldı (CLSI, 2017).

3.6.1 Antifungal Duyarlılık Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması

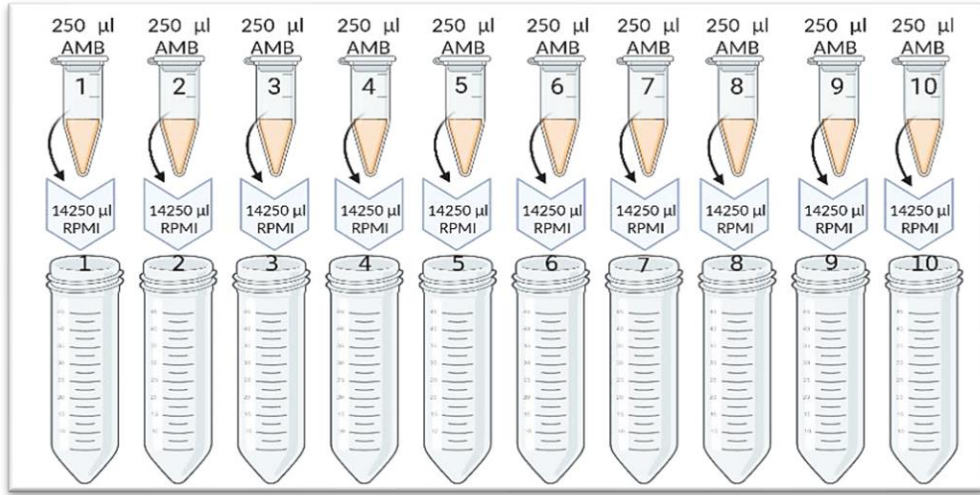
Mikrodilüsyon plakları manuel olarak laboratuvarımızda hazırlandı. CLSI M38 dokümanında önerdiği gibi “U” tabanlı, 96 kuyucuklu, kapaklı ve steril polistiren plaklar (Microcult, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Mikrodilüsyon plaklarına dağıtım

yapmadan önce her iki ilaç da 1600 µg/ml'lik stok solüsyonlardan referans dokümana uygun olarak seyreltilti. İlk sulandırma mikro santrifüj tüplerinde (Eppendorf AG) dimetil sülfoksit (DMSO; Merck & Co., Inc) kullanılarak yapıldı. Şekil 3.5'de amfoterisin B'nin (posakonazol için de aynı) DMSO'daki sulandırımı görülmektedir. Kısaca 1 no'lu mikro santrifüj tüpü boş bırakılıp 2-5-8 no'lu mikro santrifüj tüplerine 150 µl DMSO, 3-6-9 no'lu mikro santrifüj tüplerine 300 µl DMSO ve 4-7-10 no'lu mikro santrifüj tüplerine 700 µl DMSO konuldu. Daha sonra 1 no'lu mikro santrifüj tüpüne 300 µl amfoterisin B veya posakonazol (1600 µg/ml), 2 no'lu mikro santrifüj tüpüne 150 µl amfoterisin B veya posakonazol, 3 ve 4 no'lu mikro santrifüj tüplerine 100'er µl amfoterisin B veya posakonazol koyup iç içe karıştırıldı. Dört ve 7 no'lu mikro santrifüj tüplerinden ise şekil 3.5.'de görülen miktar, diğer tüplere aktarıldı. Böylece ilaçların iki kat azalan (1600-3,125 µg/ml) seri dilüsyon yapıldı (CLSI, 2017).



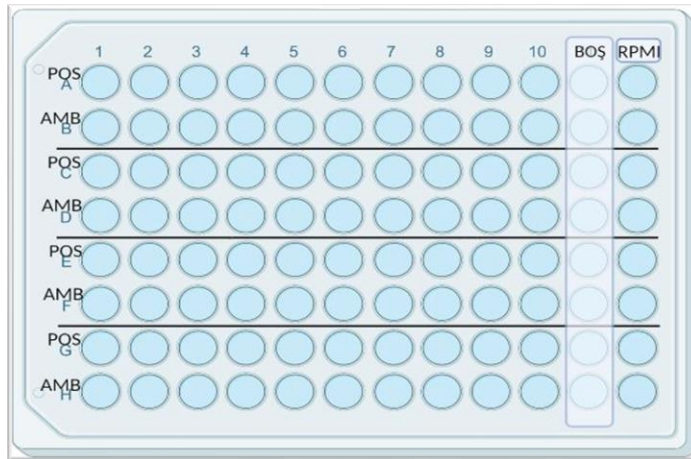
Şekil 3.5. Amfoterisin B veya posakonazolün DMSO içindeki seri dilüsyonu

Dimetil sülfoksitin etkisini azaltmak için her iki ilacın da “3-morpholinopropane-1-sulfonik asit (MOPS; Sigma-Aldrich), ile tamponlanmış L-glutaminli-sodyum bikarbonatsız Roswell Park Memorial Institute (RPMI; Sigma-Aldrich), besiyerinde 1/50 sulandırımı yapıldı. Böylece 32-0,06 µg/ml aralığında iki kat seri dilüsyon hazırlandı. Şekil 3.6.'da 1/50 sulandırımının nasıl yapıldığı görülmektedir.



Şekil 3.6. Antifungallerin RPMI besiyerinde 1/50 sulandırımı

İlaçların, MOPS ile tamponlanmış RPMI besiyerinde 1/50 sulandırım yapıldıktan sonra her tüpten 100 µl alarak aynı sıradaki mikrodilüsyon plaklarına dağıtıldı. En yüksek konsantrasyon (32 µg/ml) birinci kuyucuğa, diğerleri sırayla diğer kuyucuklara konuldu. En düşük konsantrasyon (0,06 µg/ml) 10. kuyucukta oldu. Şekil 3.7’de çalışmada hazırladığımız mikrodilüsyon plaklarından bir tanesi örnek olarak verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi 11. kuyucuk boş bırakıldı. Üreme kontrolünü yaptığımız son kuyucuğuna (12. kuyucuk) 100 µl MOPS ile tamponlanmış RPMI besiyeri (ilaçsız) kondu. İçinde değişik konsantrasyonlarda antifungal olan bu kuyucuklara daha sonra çalışma suşlarından hazırlanan 100 µl inokulum eklenmesi ile her iki ilaç için de son konsantrasyonlar 16-0,03 µg/ml şeklinde CLSI M38 dokümanında önerildiği aralıkta oldu (CLSI, 2017).



Şekil 3.7. Hazırlanmış olan bir antifungal mikrodilüsyon plağının görüntüsü

3.6.2 Mucorales Suşlarından In Vitro Antifungal Duyarlılık Testi İçin İnokulum Hazırlanması

Canlandırılmış ve saflığından emin olunan Mucorales suşları eğri patates dekstroza agar (PDA; Oxoid) besiyerine pasajlandı ve 35°C’da inkübe edildi. İyi bir sporlanma elde edene kadar (maksimum 7 gün) inkübasyonda tutulması önerilmekle beraber Mucorales suşları hızlı ürediğinden, CLSI M38’de de belirtildiği gibi 48 saatlik inkübasyon yeterli oldu. Üremenin olduğu PDA besiyeri içerisine 1 ml steril serum fizyolojik ve 3 damla Tween 20 (Sigma Aldrich) eklendi. Birkaç kere aşağı yukarı pipet ucuyla nazik bir şekilde kazındı ve 5 dk ağır partiküllerin aşağı çökmesi için beklendi. Sıvı kısım pipet yardımıyla çekilerek steril bir mikro santrifüj tüpüne (Eppendorf AG) aktarıldı. Tekrar 5 dk ağır partiküllerin çökmesi beklendi. Üsteki kısım tekrar yeni bir steril tüpe alındı ve 15 sn vorteks ile karıştırıldı. İnokulum süspansiyonun absorbansı 530 nm’de spektrofotometrik (Beckman Coulter) olarak ölçüldü. Spektrofotometrik olarak absorbansı 0,15-0,17 olarak ayarlanan inokulum süspansiyonu 1/50 oranında tamponlanmış RPMI besiyeri ile sulandırıldı. Böylece $0,4 \times 10^4$ – $2,5 \times 10^4$ CFU/ml’lik inokulum hazırlanmış oldu. Hazırlanmış inokulumdan 100 µl mikrodilüsyon plaklarına dağıtıldı ve 35°C’da 21-26 saat inkübe edildi. Her bir suş için kontrol amaçlı koloni sayımı yapıldı. RPMI ile yapılan 1/50 sulandırımından ($0,4 \times 10^4$ – $2,5 \times 10^4$ CFU/ml) 1 µl alınarak SDA besiyerine damlatıldı. Bir gece 35°C’da inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayıldı. Koloni sayısı 4-50 arasında olduğu zaman inokulum miktarının doğru olduğu kabul edildi (CLSI, 2017).

3.6.3 Minimum İnhibitör Konsantrasyonların Belirlenmesi ve Yorumu

Uygun inkübasyon sonunda mikrodilüsyon plakları ayna yardımıyla gözle okundu. Her iki ilaç için de üremenin %100 inhibe edildiği ilk kuyucuk MİK olarak değerlendirildi (CLSI, 2017). Mucorales suşlarında CLSI M38 referans yöntemi ile belirlenmiş KSD olmadığı için elde edilen MİK’lerle duyarlı/dirençli yorumu yapılmadı. Ancak, EED bulunan bazı türler için amfoterisin B ve posakonazol MİK’leri wildtype (WT)/non-wild type (NWT) olarak yorumlandı (CLSI 2020; Espinel-Ingroff ve ark., 2015). Tablo 3.1’de EED bulunan suşlar özetlenmiştir. Suş sayısı 10’dan fazla

olan ve epidemiyolojik eşik değeri bulunmayan türler için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplandı.

Tablo 3.1. Mucorales suşları için belirlenmiş epidemiyolojik eşik değerler

	Amfoterisin B		Posakonazol	
	EED %95*	EED %97,5*	EED %95	EED %97,5
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	1 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
<i>Mucor circinelloides</i>	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml
<i>Rhizopus arrhizus</i>	2 µg/ml	4 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
<i>Rhizopus microsporus</i>	2 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml

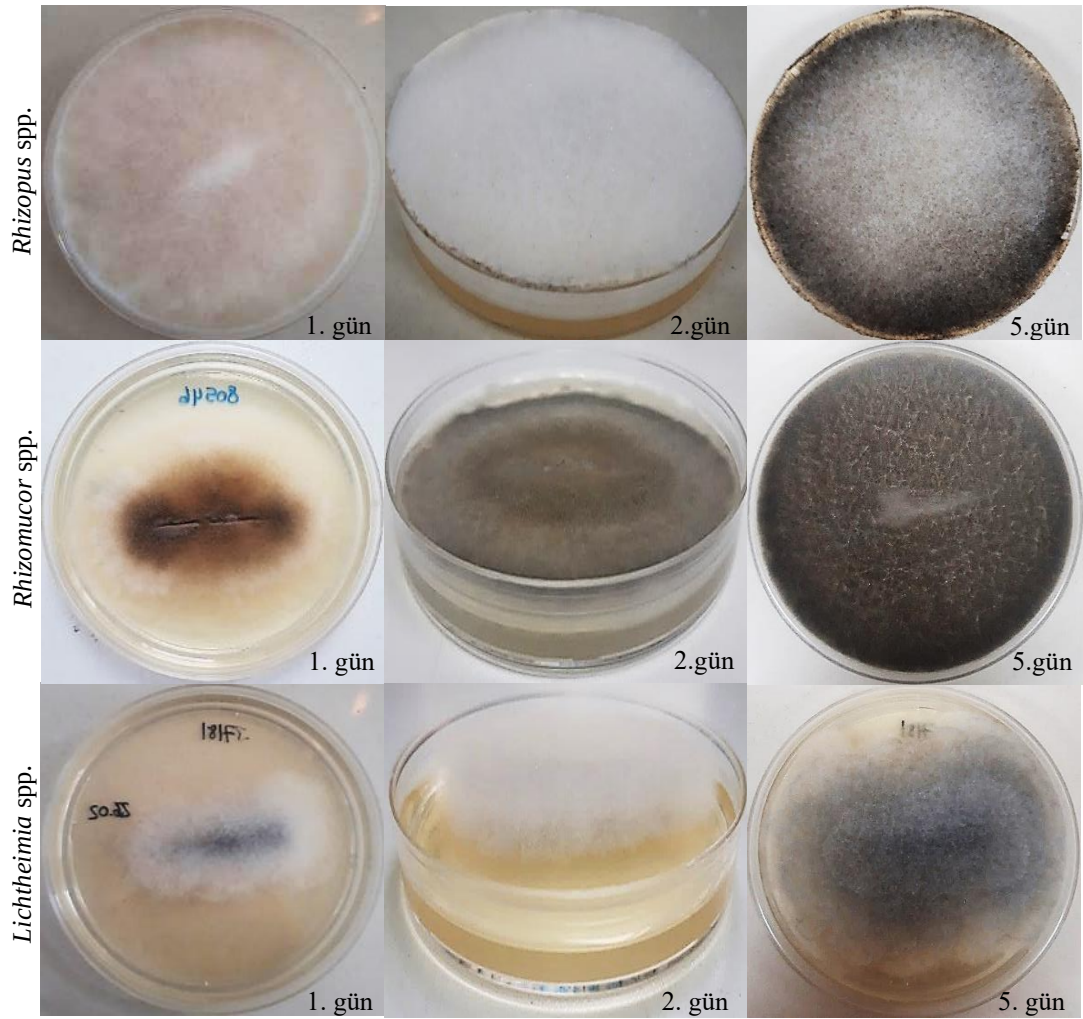
*Suşların %95 veya %97,5'ini kapsayan en yüksek MİK değeri

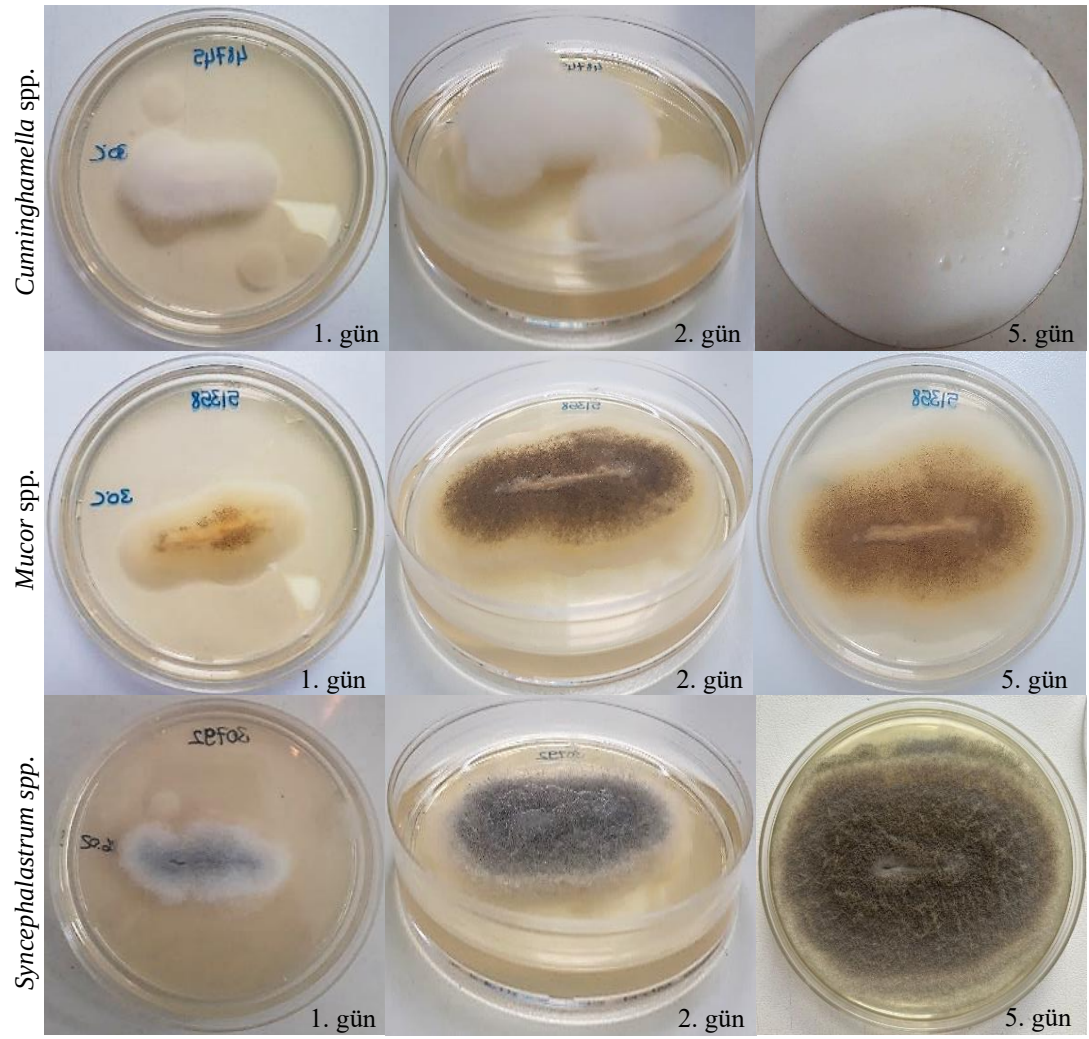
4. BULGULAR

Çalışmamızda Bursa Uludağ Üniversitesi SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji (Mikoloji) laboratuvarına gelen ve üreme olması sonucu -80°C’da saklanan suşlar çalışıldı. Laboratuvarımızda Kasım 2003 – Kasım 2022 tarihleri arasında 138 hastadan Mucorales takımı izole edildi ve bu çalışmada, bunlardan saklanmış olan ve saf şekilde izole edile 87 hastaya ait izolatlar kullanıldı.

4.1. Mucorales suşlarının Koloni Morfolojisi ve Mikroskopik Görüntüleri

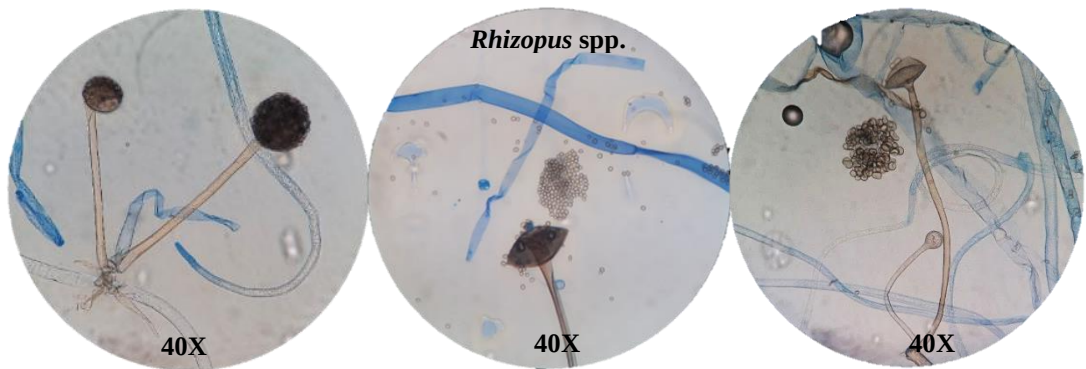
Farklı koloni morfolojilerine sahip suşların 1., 2., 5. günlerindeki görüntüleri Resim 4.1’de görülmektedir.

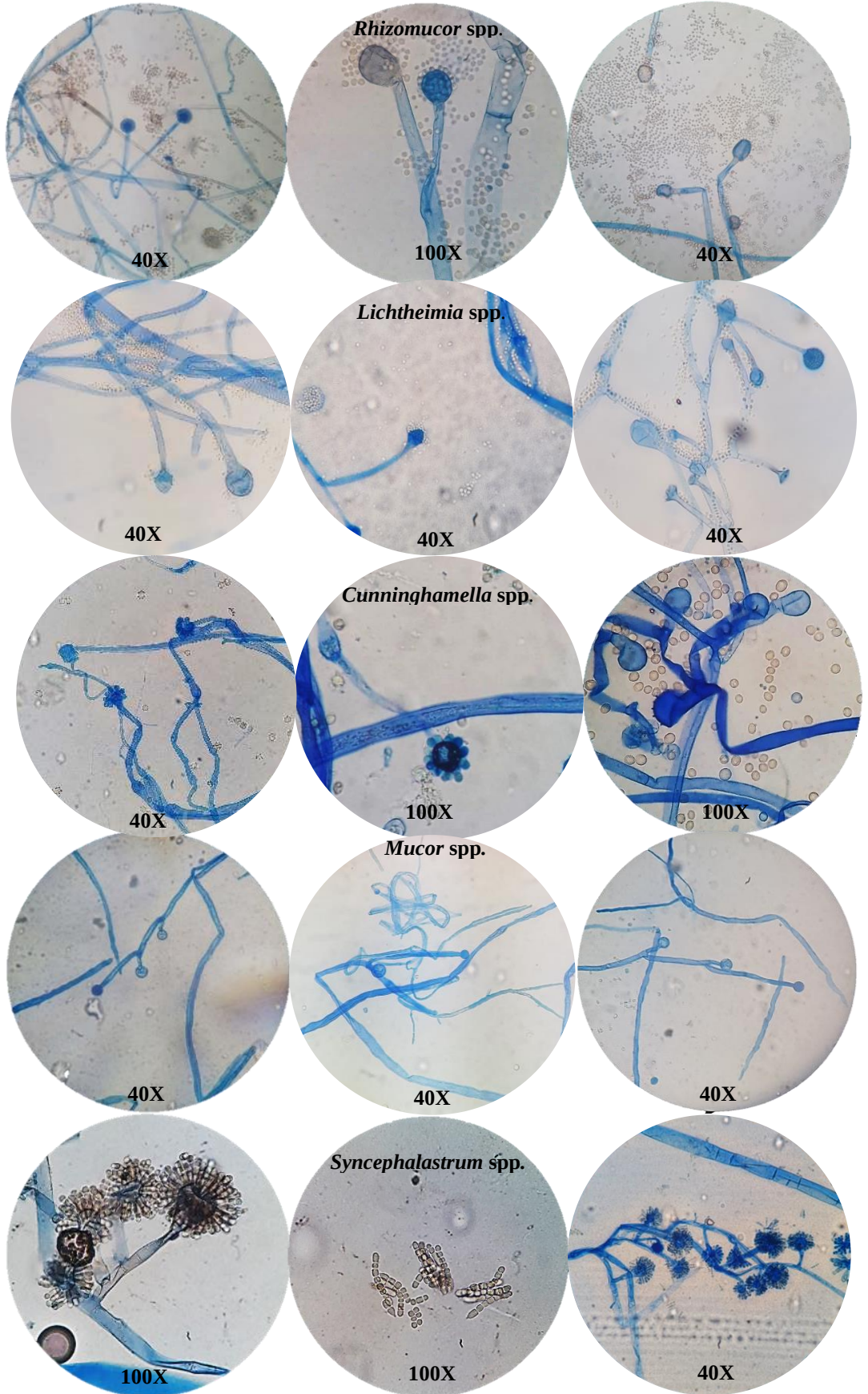




Resim 4.1. Suşların 1., 2., 5. günlerindeki kolonileri morfolojileri

Farklı mikroskobik morfolojilere sahip suşların 4. günlerindeki görüntüleri Resim 4.2’de görülmektedir (Walsh ve ark. 2020).





Resim 4.2. Mikroskopik görüntüler

Cinslere göre değişen bu farklı morfolojik özellikler tablo 4.1’de özetlenmiştir. Morfolojik tanımlama sonucu, 61 *Rhizopus* cinsi %100 doğru tanımlanabilirken 57’si (%93,4) tür düzeyinde (*R. arrhizus*) doğru tanımlandı. *Rhizomucor*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*, *Mucor* ve *Syncephalastrum* cins düzeyinde %100 doğru tanımlanırken tür düzeyinde tanımlama yapılamadı.

Tablo 4.1. Cinslere göre morfolojik özellikler

	Rhizopus sp.	Rhizomucor sp.	Lichtheimia sp.	Cunninghamella sp.	Mucor sp	Syncephalastrum sp
Koloni rengi	Başlangıçta beyaz, olgunlaştıkça siyah	Başlangıçta kahve/gri, olgunlaştıkça kahverengi	Beyaz gri	Kremsi beyaz	Başlangıçta sarımsı olgunlaştıkça kahve /sarı	Başlangıçta grimsi beyaz olgunlaşınca grimsi siyah
Koloni yapısı	Yaygın 24. saatte petriyi dolduran	Yassı yayılım gösteren	Pamuksu	Keskin yuvarlak kompakt koloniler	Yassı yayılım gösteren	Pamuksu
Sporan gium	Büyük yuvarlak (üsten basık)	Küçük yuvarlak (yandan basık)	Konik (vezikül)	Vezikül üzerinde tek sporlu sporangiol	Yuvarlak	Bezelye gibi sıralı zincir sporlardan oluşur (merosporangium)
Sporan giofor	Kısa, uzun-kalın	Uzun-ince	Uzun-ince	Uzun ince	Uzun ve kısa sporangiofor Kısa sporangiofor üzerindeki sporangiumda kıvrılma	Kısa-kalın

4.2. Suşların MALDI TOF MS Yöntemiyle Tanımlanması

MALDI TOF MS ile tanımlamada öncelikle beş suş kullanılarak dört yöntemin denemesi yapıldı. Bu yöntemlerden ilki besiyerinde olan üremeden bir parça hif alınarak plate’in üzerine konuldu ve matriks damlatılarak okutuldu. İkinci yöntemde ise mayalardaki gibi örneği koyup üzerine %70’lik formik asit damlatıp kurumaya bırakıldı ve kuruduktan sonra matriks damlatılarak okutuldu. Üçüncü yöntem olarak katı besiyerinden ekstraksiyon yapıldı. Dördüncü yöntem denemesi olarak ise sıvı besiyerinden ekstraksiyon yapıldı. Tablo 4.2’de elde edilen sonuçlar görülmektedir. Bu sonuçlardan sonra sadece katı ve sıvı ekstraksiyon yöntemi ile çalışmaya devam edilmeye karar verildi.

Tablo:4. 2. MALDI TOF MS ile tanımlamada yöntem deneme sonuçları

Deneme Suşları	Direkt koloniden tanımlama (Skor / Tür)	Formik asit (%70) uygulama sonrası tanımlama (Skor / Tür)	Katı besiyerinden ekstraksiyon (Skor / Tür)	Sıvı besiyerinden ekstraksiyon (Skor / Tür)
1	1.37 / <i>Rhizomucor pusillus</i>	Pik elde edilemedi	2.35 / <i>Rhizomucor pusillus</i>	2.06 / <i>Rhizomucor pusillus</i>
2	1.24 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	Pik elde edilemedi	1.96 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	2.26/ <i>Rhizopus arrhizus</i>
3	1.41 / <i>Rhizopus microsporus</i>	Pik elde edilemedi	1.88 / <i>Rhizopus microsporus</i>	2.09/ <i>Rhizopus microsporus</i>
4	1.12 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	1.96 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	1.75 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	1.93 / <i>Rhizopus arrhizus</i>
5	1.11 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	Pik elde edilemedi	1.92 / <i>Rhizopus arrhizus</i>	2.20 / <i>Rhizopus arrhizus</i>

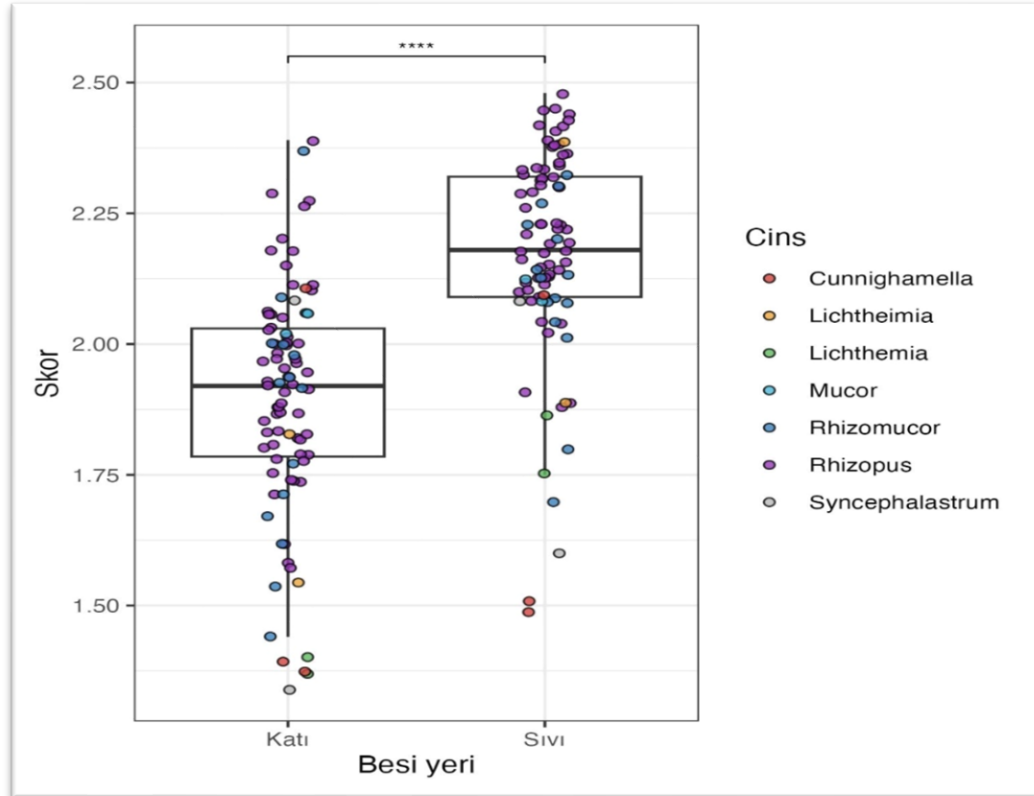
Katı ve sıvı besiyerinden yapılan ekstraksiyonlarda skorlar farklı olsa da cins ve tür düzeyinde farklı sonuç elde edilmedi. MALDI TOF MS ile 87 suşun tür tanımlaması Tablo 4.3.'de görülmektedir.

Tablo 4.3. MALDI TOF MS ile 87 Suşun Tür Dağılımı

TÜR	SUŞ SAYISI n (%)	≥2		170-1,99		≤1,69	
		Katı	Sıvı	Katı	Sıvı	Katı	Sıvı
<i>Rhizopus oryzae</i>	57 (%65,5)	21 (%36,8)	55 (%96,5)	33 (%57,9)	2 (%3,5)	3 (%5,3)	0
<i>Rhizomucor pusillus</i>	13 (%14,9)	5 (%38,5)	13 (%100)	6 (%46,2)	0	2 (%15,4)	0
<i>Rhizopus microsporus</i>	4 (%4,6)	1 (%25)	3 (%75)	3 (%75)	1 (%25)	0	0
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	2 (%2,3)	1 (%50)	1 (%50)	0	0	1 (%50)	1 (%50)
<i>Rhizomucor miehei</i>	2 (%2,3)	0	0	0	2 (%100)	2 (%100)	0
<i>Syncephalastrum monosporum</i>	2 (%2,3)	1 (%50)	1 (%50)	0	0	1 (%50)	1 (%50)
<i>Mucor circinelloides</i>	2 (%2,3)	2 (%100)	2 (%100)	0	0	0	0
<i>Lichtheimia cormbifera</i>	2 (%2,3)	0	1 (%50)	1 (%50)	1 (%50)	1 (%50)	0
<i>Lichtheimia ramosa</i>	1 (%1,1)	0	0	0	1 (%100)	1 (%100)	0
<i>Lichtheimia sp.</i>	1 (%1,1)	0	0	0	1 (%100)	1 (%100)	0
<i>Cunninghamella elegans</i>	1 (%1,1)	0	0	0	0	1 (%100)	1 (%100)

Katı besiyerinden yapılan ekstraksiyon sonrası tanımlamada suşların 31 tanesinin (%35,6) skoru ≥2, 43 tanesinin (%49,4) skoru 1,70-1,99 arası, 13 tanesinin (%14,9) skoru ≤1,69 olarak bulundu. Sıvı besiyerinden yapılan ekstraksiyon sonrası

tanımlamada suşların 76 tanesinin (% 87,4) skoru ≥ 2 , sekiz tanesinin (% 9,2) skoru 1,70-1,99 arası, üç tanesinin (% 3,4) skoru $\leq 1,69$ olarak bulundu (Tablo 4.3). İki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılan tanımlamalarda elde edilen skorların ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (paired t test; $p \leq 0,0001$). Şekil 4.1’de skorların ortalama değerlerinin dağılımı görülmektedir.



Şekil 4.1. Katı ve sıvı besiyerinden yapılan tanımlamada skorların ortalama değerlerinin dağılımı

4.3. Suşların Dizi Analizi ile Tanımlanması

ITS dizisi ile MALDI TOF MS tanımlamanın karşılaştırılması Tablo 4.4’de görülmektedir. MALDI TOF MS tanımlamada sıvı besiyerinden yapılan ekstraksiyon sonuçları daha anlamlı bulunduğu için, karşılaştırmada bunlar kullanıldı ve skoru ≥ 2 olanlar tür düzeyinde, 1,99-1,70 olanlar cins düzeyinde doğru kabul edildi. Skoru $\leq 1,69$ olan sadece üç suş (*C. bertholletiae*, *C. elegans*, *S. monosporum*) vardı. Çalışmamızda 87 Mucorales suşunun 77’si ITS bölgesi ile (Sorgu dizisinin en az %95’ini kapsaması ve verilerin %96-%100 blastn ile eşleşmesi, E değerinin 0,0 olması koşuluna uygun) tür düzeyinde tanımlandı. Kalan 10 suş belirlenen koşullar dahilinde herhangi bir türle

eşleşmediğinden tanımlanamadı. ITS dizi analizi ile tanımlanan 77 suşun, MALDI TOF MS sıvı ekstraksiyon yöntemiyle 77'si (%100) cins düzeyinde 72'si (%93,5) tür düzeyinde doğru tanımlandı. Tablo.4.4.'de ITS dizisi ile MALDI TOF MS tanımlamaları karşılaştırılmıştır.

Tablo.4.4. ITS dizisi ile MALDI TOF MS tanımlamanın karşılaştırılması

CİNS ve TÜRLER	ITS DİZİSİ ile TANIMLAMA n	MALDI TANIMLAMA n (%)
<i>Rhizopus spp</i>	58	58 (100)
• <i>R. arrhizus</i>	57	55 (96,5)
• <i>R. microsporus</i>	1	1 (100)
<i>Rhizomucor spp</i>	13	13 (100)
• <i>R. pusillus</i>	13	13 (100)
<i>Mucor spp</i>	2	2 (100)
• <i>M. circinelloides</i>	2	2 (100)
<i>Lichtheimia</i>	4	4 (100)
• <i>L. cormbifera</i>	1	1 (100)
• <i>L. ramosa</i>	2	0
• <i>L. ornata</i>	1	0
TOPLAM	77	77 cins düzeyi / 72 tür düzeyi

ITS dizi analizi ile tanımlanamayan 10 suşun dört tanesinde (%40) MALDI TOF MS sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ≥ 2 skor elde edildi. Bunlardan ikisi *R. microsporus* iken birer tane *C. bertholletiae* ve *S. monosporum* vardı. MALDI TOF MS sıvı ekstraksiyon yöntemiyle tanımlanamayan (skor $\leq 1,69$) ancak güvenilir olmasa da *C. bertholletiae*, *C. elegans*, *S. monosporum* diye isimlendirilen üç suş ITS dizi analiziyle de tanımlanamadı. Tablo 4.5.'de ITS dizi analiziyle tanımlanamayan suşların MALDI TOF MS sıvı ekstraksiyon yöntemiyle tanımlanma skorları görülmektedir.

Tablo 4.5. ITS dizi analiziyle tanımlanamayan suşların MALDI TOF MS sıvı ekstraksiyon yöntemiyle tanımlanma skorları

Türler	MALDI TOF MS Sıvı ekstraksiyon yöntemiyle tanımlama skoru
<i>Rhizopus microsporus</i>	2,08
<i>Rhizopus microsporus</i>	2,21
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	2,09
<i>Syncephalastrum monosporum</i>	2,08
<i>Rhizopus microsporus</i>	1,91
<i>Rhizomucor miehei</i>	1,8
<i>Rhizomucor miehei</i>	1,7
<i>Syncephalastrum monosporum</i>	1,6
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	1,51
<i>Cunninghamella elegans</i>	1,49

4.4. Antifungal Duyarlılık

ITS dizi analiz ile tür düzeyinde doğru tanımlanan Mucorales takımına ait 77 suşun CLSI M38 ve M61 referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antifungal duyarlılıkları yapıldı (CLSI, 2017; CLSI, 2020). Duyarlılık için ülkemizde kullanımı olan posakonazol ve amfoterisin B tercih edildi. Tablo 4.6’da posakonazolün in vitro antifungal etkinliği görülmektedir.

Tablo 4.6. Posakonazolün in vitro aktivitesi

	RANGE µg/ml	MODE µg/ml	MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	WT		NWT	
					%95*	%97,5**	%95*	%97,5**
<i>Rhizopus arrhizus</i> (57)	≤0.03-0.50	0.125	0.125	0.25	%100	%100	-	-
<i>Rhizopus microsporus</i> (1)	0.25				%100	%100	-	-
<i>Rhizopus pusillus</i> (13)	0.06-0.50	0.25	0.25	0.25	-	-	-	-
<i>Mucor circinelloides</i> (2)	0.125				%100	%100	-	-
<i>L. ramosa</i> (2)	0.25-1.0				-	-	-	-
<i>L. cormbifera</i> (1)	0.125				%100	%100	-	-
<i>L. ornata</i> (1)	0.25				-	-	-	-

*Suşların %95’ini kapsayan en yüksek MİK değeri; **Suşların %97,5’ini kapsayan en yüksek MİK değeri

Tablo 4.7’de amfoterisin B’nin in vitro antifungal etkinliği görülmektedir.

Tablo 4.7. Amfoterisin B için invitro aktivite

	RANGE µg/ml	MODE µg/ml	MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	WT		NWT	
					%95*	%97,5**	%95*	%97,5**
<i>Rhizopus arrhizus</i> (57)	≤0.03-≥16.0	0.50	0.50	1.0	%94,7	%98,3	%5,3	%1,7
<i>Rhizopus microsporus</i> (1)	2.0				%100	%100	-	-
<i>Rhizopus pusillus</i> (13)	0.25-1.0	0.50	0.50	1.0	-	-	-	-
<i>Mucor circinelloides</i> (2)	1.0				%100	%100	-	-
<i>L. ramosa</i> (2)	1.0				-	-	-	-
<i>L. cormbifera</i> (1)	0.5				%100	%100	-	-
<i>L. ornata</i> (1)	1.0				-	-	-	-

*Suşların %95’ini kapsayan en yüksek MİK değeri; **Suşların %97,5’ini kapsayan en yüksek MİK değeri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Merkez Mikrobiyoloji (Mikoloji) Laboratuvarımızda, 2003-2022 tarihleri arasında 87 hastadan izole edilen Mucorales takımı mantarların koloni ve mikroskopik morfolojileri, MALDI TOF MS ve ITS bölgelerinin dizisi ile tür düzeyinde tanımlanması yapılmış ve antifungal duyarlılık profilleri incelenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla daha önce Türkiye’de bu kadar geniş bir hasta grubuyla farklı yöntemler kullanılarak tür tanımlaması yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile ülkemize ait ilk tek merkezli epidemiyolojik bir seri elde edilmiştir.

Mukormikoz bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda akut, hızlı gelişen ve kötü prognoza sahip bir hastalıktır. Klinik belirtilerin değişkenlik göstermesi, altta yatan hastalık sebebiyle belirtilerinin geç fark edilmesi ve farklı uzmanlık alanlarına sahip hekimler tarafından izlenmesi sebebiyle erken tanı bazen mümkün olmamaktadır. Hastalığın geç fark edilmesi ve tedaviye geç kalınması mortaliteyi arttırmaktayken erken fark edilmesi durumunda cerrahi ve antifungal ajanlarla beraber tedavi edilmesi mümkündür (Sun, & Singh 2011).

Mukormikoz tanısında klinik örneklerden kültür yapmak türlerin tanımlanmasına ve antifungal duyarlılık testlerine olanak sağladığından önemlidir. Ancak Mucorales takımı mantarlar frajil yapıda oldukları için üretmek kolay değildir. Daha önceden yapılan çalışmalarda, Roden ve arkadaşları (Roden ve ark., 2005) direkt mikroskopisi pozitif örneklerin %50’sinde, Jeong ve arkadaşları (Jeong ve ark., 2017) ise %21’inde üreme saptamamışlardır. Ancak, üreme oranları düşük olsa da kültür yapmak tüm kılavuzlarda yüksek kanıt düzeyi ile önerilmektedir (Cornely ve ark., 2019; Skiada ve ark. 2020). Üreme olması durumunda tür tanımlanması rutin hizmetlerde istenmemekle beraber epidemiyolojik çalışmalarda veya *Cunninghamella* gibi mortalitesi daha yüksek türleri saptamada önem kazanır (Cornely ve ark.). Bu çalışmada da epidemiyolojik amaçla tür tanımlaması yapılmıştır.

Mucorales takımı mantarları, farklı türlerin benzer özellikler göstermesi nedeniyle koloni ve mikroskopik morfolojileriyle tanımlamak oldukça zordur. Kriptik suşların olması veya spor oluşturmayan ya da standart besiyerlerinde üremeyen türler nedeniyle zorluk daha da artmaktadır. Bu çalışmada 87 suş morfolojik olarak tanımlanmaya çalışılmış ve tüm suşlarda cins düzeyinde moleküler tanımlama ile tam

uyum sağlanmıştır. Her ne kadar morfoloji ve moleküler tanımlama arasındaki yüksek düzeyde uyum (>%90) yalnız referans laboratuvarlarda sağlansa da deneyim kazanarak cins düzeyinde tanımlama yapılabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir (Alvarez ve ark., 2009). Özellikle *Cunnighamella* ve *Syncephalastrum* gibi mantarların tipik mikroskopik morfolojileri, cins düzeyinde tanımlamayı sağlamaktadır. *Rhizopus* cinsi (*arrhizus*) basık şekilde olan tipik başı ve rizoidleri ile kolaylıkla tanımlanmaktadır. *Rhizomucor*, *Lichtheimia* ve *Mucor* türleri en fazla benzerlik göstermekle beraber *Mucor* cinsinin sarı, *Rhizomucor* cinsinin kahverengi ve *Lichtemia* cinsinin beyaz kolonileri çoğunlukla ayırt edici özelliktedir (Hoog ve ark., 2020; Yang ve ark., 2016).

Mucorales takımındaki türlerin tanımlanmasında birçok genetik lokus incelenmiştir. ITS bölgesinin güvenilir ve doğru tanımlamayı sağladığı çalışmalarda gösterilmiş ve kullanılması önerilmiştir (Balajee ve ark., 2009; CLSI, 2008). Bu çalışmada da ITS bölgesiyle tanımlama amacıyla 87 Mucorales takımı izolat kullanıldı. Ancak izolatların 10 tanesinde ITS bölgesi ile tanımlama sağlanamadı ve bunların iki tanesi morfolojik olarak *Syncephalastrum* ve üç tanesi *Cunnighamella* düşünülen izolatlardı. Yapılan çalışmalarda, *S. racemosum* ve *Cunnighamella* suşlarının tanımlanmasında, ITS bölgesinin yetersiz kaldığı ve ribozomal büyük alt birimin (28S) D1-D2 bölgesinin ek olarak kullanılması önerilmiştir (Kurahara, Shimatani, Ryuge, & Tsuyuguchi, 2023; Mousavi ve ark., 2019; Raju, Santhanakumar, & Kesavachandran, 2020; Yang ve ark., 2016). Bu çalışmada morfolojik olarak *Rhizopus* ve *Rhizomucor*'a benzeyen diğer beş suş için farklı genetik lokusların sekanslarına bakılmasının veya tüm genom analizi yapılmasının uygun olacağı düşünüldü (Cornely 2019). Çeşitli çalışmalarda ITS bölgesinin bu türleri tanımlamada başarılı olduğu söylenmekle beraber Mucorales takımı suşlarda, ITS bölgesinde çeşitliliğin çok olması, bazen veri tabanlarıyla eşleştirmeyi güçleştirmektedir. Bu çalışmada sadece referans suşlarla BLAST analiz yapıldı ve oldukça net kurallar kullanıldı. Ayrıca çeşitli çalışmalar sonucu yüklenen (publik diziler) diziler kullanılmadı. Bu durumun %5,7 oranında tanımlama yetersizliğine yol açtığı düşünüldü.

Geniş kapsamlı yapılmış çalışmalar ve meta analizlerde *Rhizopus* türlerinin çoğunlukla ilk sırada ve %40-79 oranında mukormikoz olgularından izole edildiği gösterilmiştir (Badali ve ark., 2021; Bonifaz ve ark., 2021; Jeong ve ark., 2019; Roden ve ark., 2005). Literatür ile uyumlu olarak bu çalışmada da ITS bölgesiyle tanımlanan

77 suş arasında en fazla *Rhizopus* türleri (%75,3) saptandı. Ancak diğer çalışmalarda ikinci ve üçüncü sıklıkta görülen cinslerin *Mucor* ve *Lichetemia* olduğu vurgulanmaktadır (Badalı ve ark., 2021; Bonifaz ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda ise hiç azımsanmayacak oranda ikinci sırada (%16,9) *Rhizomucor pusillus* bulundu. Tür dağılımında coğrafi farklılıkların olduğu, örneğin Avrupa’da *Lichetemia* türlerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Skaıda ve ark., 2011). *Apophysomyces variabilis* ise Hindistan’da ikinci sırada saptanmıştır. *Apophysomyces* türleriyle gelişen mukormikoz olgularının %60’ı Hindistan’dan bildirilmiştir (Chakrabarti ve ark., 2003). *Mucor irregularis* çoğunlukla Çin ve Hindistan’daki olgulardan izole edilmiştir (Hemashettar ve ark., 2011). Dolayısıyla tür dağılımında coğrafi farklılıklar vardır. Türkiye’de yapılmış geniş kapsamlı epidemiyolojik başka çalışma olmadığından, çalışmamızda ikinci sırada saptadığımız *R. pusillus*’un bizim ülkemize özgü olup olmadığı konusunda yorum yapmak mümkün değildir. Daha kapsamlı çalışmalarda bu durum açıklık kazanacaktır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda çarşaf, duşlar, hava ve havalandırma sistemlerinde çok sayıda *R. pusillus* sporlarına rastlanılmış ve hastanelerde salgınlar oluşturabilme potansiyelinden bahsedilmiştir (Walther, Wagner, & Kurzai, 2020). Bu çalışmada çevre örneklerinden tarama yapılmadığından hastane ortamımızla ilgili verimiz yoktur. Ancak yeni bir çalışma ile hastane ortamının taranması planlanmıştır.

Çalışmamızda tür tanımlanması tam yapılmış 77 suşun, in vitro antifungal duyarlılıkları, CLSI M38 referans yöntem ile belirlendi. Mucorales takımı için in vitro/in vivo korelasyonu gösteren çalışmalar olmadığından elde edilen MİK değerlerini yorumlamak güçtür. Bu sebeple bazı türler için EED oluşturulmuş olmakla beraber iki referans yöntemde de KSD yoktur (Espinell-Ingroff ve ark., 2015). Bu çalışmada direncin yüksek olduğu bilinen *Cunninghamella* izolatları tanımlanmadığından dirençle çok karşılaşılmamıştır (Roden ve ark., 2005). Posakonazol direnci saptanmamış, ancak amfoterisin B direnci *Rhizopus arrhizus* suşlarında düşük oranda olsa da görülmüştür. Benzer şekilde, bazı çalışmalarda *Rhizopus* türlerinde amfoterisin B MİK’lerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Badalı ve ark., 2021).

Günümüzde moleküler yöntemler mantarların tür düzeyinde tanımlanması için altın standarttır. Ancak pahalı olup özel ekipman veya uzmanlık gerektirir ve klinik laboratuvarlarda yaygın olarak bulunmaz. MALDI TOF MS dakikalar içerisinde tür tanımlaması yapabilen hızlı ve güvenilir bir teknolojidir. Ticari sistemlerde bakteriler

ve mayalar için kanıtlanmış veri tabanları mevcut iken filamentöz mantarlar için gelişmiş değildir. İnkübasyon süresi, besiyeri seçimi ve örnek hazırlamadaki farklılıklar sonuçları etkileyebileceğinden filamentöz mantarların tanımlanmasında zorluklar devam etmektedir. Bruker Daltonics yakın zamanda birçok filamentöz mantarların tanımlaması için “Filamentous Fungi Library FFL4.0” isimli bir kütüphane oluşturmuştur (“Bruker Daltonics”, t.y.). Bu çalışmada da tanımlama bu kütüphaneden yararlanılarak yapıldı. Sıvı ekstraksiyon yöntemi literatür uyumlu olarak katı ekstraksiyondan daha başarılı bulundu (Li ve ark., 2020). Katı ekstraksiyon yönteminde skorlar düşük olmakla beraber farklı tür tanımlaması olmadığından rutin hizmette öncelikle katı ekstraksiyonla başlanıp sonuç alınamadığı durumda sıvı ekstraksiyona geçilmesi ve böylece sıvı ekstraksiyondaki inkübasyonla kaybedilecek gecikmenin kısaltılabileceği düşünüldü.

MALDI TOF MS ile tanımlamaya bu çalışmada cins ve tür düzeyin oldukça başarılı (>%90) uyum elde edildi. Yapılan çalışmalarda bu çalışmayla uyumlu olarak *Rhizopus* suşlarını tanımlamada tür düzeyinde başarılıydı (Shao ve ark., 2018). Ancak *Cunninghamella* ve *Syncephalastrum* suşlarında tanımlama güvenilirliği düşüktü (Shao ve ark., 2018; Zvezdanova ve ark., 2023). Bu çalışmada da üç *Cunninghamella* suşundan biri ve iki *Syncephalastrum* suşundan biri tür düzeyinde güvenilir olarak tanımlandı. Diğer suşlar Bruker algoritmasına göre tanımlanamadı. Ayrıca *Lichtheimia ornata* suşunun Bruker veri tabanında bulunmaması sebebiyle yanlış tanımladığı çalışmalarda bahsedilen diğer bir konuydu (Barker ve ark., 2022; Shao ve ark., 2018). Bu çalışmada ITS dizisi ile *Lichtheimia ornata* olarak adlandırılan bir suş MALDI TOF MS ile tür düzeyinde güvenilir olmamakla beraber *Lichtheimia cormbifera* olarak tanımlandı.

Sonuç olarak bu çalışmada merkezimizde en sık izole edilen türün *R. arrhizus* olduğu, literatürden farklı olarak ikinci sırada *Rhizomucor pusillus* görüldüğü, MALDI TOF MS tanımlamanın özellikle sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanıldığında oldukça başarılı olduğu ve izolatlarımızda ciddi bir antifungal direncin olmadığı saptandı.

6. KAYNAKLAR

- Ajello, L. (1998). Italian contributions to the history of general and medical mycology. *The Journal of Medical Mycology*, 36 (1), 1-5.
- Alabaz, D., Yılmaz, G., Uğuz, A., Özdemir, S., Şaşmaz, İ., & Bayram, İ. (2021). Mucormycosis in a pediatric population: a review of 20 cases from southern Turkey. *Turkish Journal of Pediatrics*, 63(1), 11-22. <https://doi.org/10.24953/turkjpeds.2021.01.002>.
- Alvarez, E., Sutton, D. A., Cano, J., Forhergill, A. W., Stchigel, A., Rinaldi, M. G., & Guarro, J. (2009) Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1650-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.00036-09>.
- Anhalt, J., & Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 47, 219-225. <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>.
- Arda, M. (2015). Temel Mikrobiyoloji. (s.11-22). Ankara: Medisan Yayınevi.
- Arendrup, M.C., Guinea, J., Cuenca-Estrella, M., Meletiadis, J., Mouton, J.W., & Howard, S.J. (2015). EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. (2023, 7 Ağustos). Erişim adresi: <https://www.eucast.org>
- Badali, H., Cañete-Gibas, C., McCarthy, D., Petterson, H., Sanders, C., David, M.P., ... Wiederhold, N.P. (2021). Epidemiology and antifungal susceptibilities of mucoralean fungi in clinical samples from the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 59(9), e01230-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.01230-21>.
- Balajee, S.A., Borman, A.M., Brandt, M.E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., ... Wickes, B.L. (2009). Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 877-884. <https://doi.org/10.1128/jcm.01685-08>.
- Barker, K.R., Kus, J.V., Normand, A.C., Gharabaghi, F., McTaggart, L., Rotstein, C., ..., Tadros, M., (2022). A Practical Workflow for the Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, Mucorales by MALDI-TOF MS: Database, Medium, and Incubation Optimization. *Journal of Clinical Microbiology*, 60 (12), e01032-22. <https://doi.org/10.1128/jcm.01032-22>.
- Batoy, S.M.A.B., Akhmetova, E., Miladinovic, S., Smeal, J., & Wilkins, C.L. (2008). Developments in MALDI mass spectrometry: the quest for the perfect matrix. *Journal of Applied Spectroscopy*, 43(6), 485-550. <https://doi.org/10.1080/05704920802108198>.
- Beavis, R.C., & Chait, B.T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), 432-435. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290031207>.
- Benny, G.L., Smith, M.E., Kirk, P.M., Tretter, E.D., & White, M.M. (2016). Biology of microfungi. Challenges and future perspectives in the systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. *Biology of Microfungi* içinde (pp. 65–126). Germany: Springer. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_5.

- Boelaert, J.R., Van Cutsem, J., de Locht, M., Schneider, Y.J., & Crichton, R.R. (1994). Deferoxamine augments growth and pathogenicity of *Rhizopus*, while hydroxypyridinone chelators have no effect. *Kidney International*, 45, 667-671. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.89>.
- Bonifaz, A., Tirado-Sánchez, A., Hernández-Medel, M.L., Araiza, J., Kassack, J.J., Angel-Arenas, T., ... González, G.M. (2021). Mucormycosis at a tertiary-care center in Mexico. A 35-year retrospective study of 214 cases. *Mycoses*, 64 (4), 372–380. <https://doi.org/10.1111/myc.13222>.
- Bruker Daltonics. (t.y.). MBT Filamentous Fungi Library 4.0 Erişim adresi: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/mbt-filamentous-fungi-library.html>.
- Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., & Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(12), 1026-1030. <https://doi.org/10.1002/RCM.1290081224>.
- Carolis, E., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., Vella, A., Florio, A.R., R. Torelli, R., ... Fadda, G. (2012). Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 475-484. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x>.
- Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., ... Piarroux, R. (2011). Mould routine identification in the clinical laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE*, 6(12): e28425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028425>.
- Chakrabarti, A., Ghosh, A., Prasad, G.S., David, J.K., Gupta, S., Das, A. ... Chakrabarti, T. (2003). *Apophysomyces elegans*: An emerging zygomycete in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2), 783–788. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.783-788.2003>.
- Chander, J., Singla, N., Kaur, M., Punia, R.S., Attri, A., Alastruey-Izquierdo, A., ... Guarro, J. (2017). *Saksenaeya erythrospora*, an emerging mucoralean fungus causing severe necrotizing skin and soft tissue infections—A study from a tertiary care hospital in north India. *The Journal of Infectious Diseases*, 49(3), 170-177. <https://doi.org/10.1080/23744235.2016.1239027>.
- Cheng, V.C.C., Chen, J.H.K., Wong, S.C.Y., Leung, S.S.M., So, S.Y.C., Lung, D. C., ... Yuen, K.Y. (2016). Hospital outbreak of pulmonary and cutaneous zygomycosis due to contaminated linen items from substandard laundry. *Clinical Infectious Diseases*, 62(6), 714-721. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1006>.
- Chinn, R.Y., & Diamond, R.D. (1982). Generation of chemotactic factors by *Rhizopus oryzae* in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis. *Infection and Immunity*, 38(3), 1123-1129. <https://doi.org/10.1128/iai.38.3.1123-1129.1982>.
- CLSI Standart M38. (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI supplement M59. (2020). *Epidemiologic cut off values for antifungal susceptibility testing*. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- CLSI approved guideline MM-18A. (2008). *Interpretive criteria for bacteria and fungi identification by DNA target sequencing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cornely, O.A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S.C.A., Dannaoui, E., Hochhegger, B., ... Chakrabarti, A. (2019). Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12), 405-421. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30312-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30312-3).
- Demirkaya, M.H., Aslan, H., Şehnaz, A., Aypak, A., Demiroğlu, Z., Ersöz, G., ... Heberl, M., (2018). Mucormycosis in Turkey. *Transplantation*, 102(sup7), 666. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000543601.70416.c0>.
- Diamond, R.D., Haudenschield, C.C., & Erickson, N.F. (1982). Monocyte-mediated damage to *Rhizopus oryzae* hyphae in vitro. *Infection and Immunity*, 38(1), 292-297. <https://doi.org/10.1128/iai.38.1.292-297.1982>.
- Doğulu, S., Yardım, M., Tezok, O.F., Gülşen, M., Akkaya, A. (1966). Cerebral mucormycosis. *Bulletin of Gülhane Military Academy*; 9:219-222.
- Espinell-Ingroff, A., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Cordoba, S., Dannaoui, E., Dufresne, P., ... Turnidge, J. (2015). Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of Mucorales. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (3), 1745–1750. <https://doi.org/10.1128/AAC.04435-14>.
- Gebremariam, T., Liu, M., Luo, G., Bruno, V., Phan, Q.T., Waring, A.J., ... Ibrahim, A.S. (2014). CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 237-250. <https://doi.org/10.1172%2FJCI71349>.
- Gümrall, R., Yıldızoğlu, Ü., Saraçlı, M.A., Kaptan, K., Tosun, F., & Yıldırım, Ş.T. (2011). A case of rhinoorbital mucormycosis in a leukemic patient with a literature review from Turkey. *Mycopathologia*, 172, 397–405. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9449-z>.
- Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: The role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 316-330. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1335-2>.
- Hawksworth, D.L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum Journal*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>.
- Hemashettar, B.M., Patil, R.N., O'Donnell, K., Chaturvedi, V., Ren, P., Padhye, A.A. (2011). Chronic rhinofacial mucormycosis caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (6), 2372–2375. <https://doi.org/10.1128/JCM.02326-10>
- Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Ahmed, S.A., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., & Vitale, R.G. (2020). *Atlas of Clinical Fungi*. Hilversum: Foudation of Atlas of Clinical Fungi.
- Hosseini, S.M., & Borghei, P. (2005). Rhinocerebral mucormycosis: pathways of spread. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 262, 932-938. <https://doi.org/10.1007/s00405-005-0919-0>. <http://antibiotechnology.com/>
- Genetbio. (t.y.). ExPrime Taq™ Premix (2X). Erişim adresi: <http://genetbio.co.kr/>.

- Gupta, K.L., Khullar, D.K., Behera, D., Radotra, B.D., & Sakhuja, V. (1998). Pulmonary mucormycosis presenting as fatal massive haemoptysis in a renal transplant recipient. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(12), 3258–3260. <https://doi.org/10.1093/ndt/13.12.3258>.
- Ibrahim, A.S., Gebermaria, T., Fu, Y., Lin, L., Hussein, M.I., French, S.W., ... Spellberg, B.J. (2007). The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2649–2657. <https://doi.org/10.1172/jci32338>.
- İnci, R. (1999). Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (1. baskı) içinde (s.1015-1021). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Jeong, W., Keighley, C., Wolfe, R., Lee, W.L., Slavin, M.A., Kong, D.C.M., & Chen, S.C. (2019). The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.011>.
- Kantarcioglu, A.S., Yucel, A., Nagao, K., Sato, T., İnci, E., Ögreden, Ş., ... Altaş, K. (2006). *Rhizopus oryzae* strain isolated from resected bone and soft tissue specimens from a sinonasal and palatal mucormycosis case. Report of a case and in vitro experiments of yeastlike cell development. *Journal of Medical Mycology*, 44(6), 515-521. <https://doi.org/10.1080/13693780600764973>.
- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>.
- Kazutaka, K., Kuma, K., Toh, H., & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33 (2): 511–18. <https://doi.org/10.1093/nar/gki198>.
- Keys, C.J., Dare, D.J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., ... Shah, H.N. (2004). Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(3), 221-242. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.004>.
- Kontoyiannis, D.R., Lewis, R.E. (2015). Agents of mucormycosis and entomophthoromycosis. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. (8th ed) (page 2909-2919) Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone.
- Kurahara, Y., Shimatani, Y., Ryuge, M., & Tsuyuguchi, K. (2023). Pulmonary Mucormycosis caused by *Cunninghamella bertholletiae*. *The Japanese Society of Internal Medicine*. e2465-23 <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2465-23>.
- Kwon-Chung, K.J. (2012) Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clinical Infectious Diseases*, 54(1), 8-15. <https://doi.org/10.1093/cid/cir864>.
- Lam-Tung, N., Schmidt, H.A., Haeseler, A., & Minh, B.Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32 (1), 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
- Lanternier, F., Dannaoui, E., Morizot, G., Elie, C., Garcia-Hermoso, D., Huerre, M., ... Lortholary, O. (2012). A global analysis of mucormycosis in France: The RetroZygo Study (2005–2007). *Clinical Infectious Diseases*, 54(1), 35-43. <https://doi.org/10.1093/cid/cir880>.

- Lionakis, M.S., Lewis, R.E., & Kontoyiannis, D.P. (2018). Breakthrough invasive mold infections in the hematology patient: current concepts and future directions. *Clinical Infectious Diseases*, 67(10), 1621-1630. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy473>.
- Li, Y., Wang, H., Hou, X., Huang, J.J., Wang, P.C., Xu, Y.C. (2020). Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Antifungal Susceptibility Testing of Non-Aspergillus Molds. *Frontiers in Microbiology*, 11, 922-930. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00922>.
- Liu, H., Lee, M. J., Solis, N. V., Phan, Q. T., Swidergall, M., Ralph, B., ... Filler, S. G. (2016). *Aspergillus fumigatus* CalA binds to integrin $\alpha 5\beta 1$ and mediates host cell invasion. *Nature Microbiology*, 2, e16211. <https://doi.org/10.1038%2Fnmicrobiol.2016.211>.
- Liu, M., Spellberg, B., Phan, Q.T., Fu, Y., Fu, Y., Lee, A.S., ... Ibrahim A.S. (2010). The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1914-1924. <https://doi.org/10.1172/jci42164>.
- Lu, X.L., Najafzadeh, M.J., Dolatabadi, S., Ran, Y.P., Gerrits van den Ende, A.H.G., Shen, Y.N., ... de Hoog, G.S. (2013). Taxonomy and epidemiology of *Mucor irregularis*, agent of chronic cutaneous mucormycosis. *Persoonia*, 30, 48–56. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X665539>.
- Marty, F.M., Cosimi, L.A., & Baden, L.R. (2004). Breakthrough Zygomycosis after Voriconazole Treatment in Recipients of Hematopoietic Stem-Cell Transplants. *The New England Journal of Medicine*, 350(9), 950-952. <https://doi.org/10.1056/nejm200402263500923>.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., ... Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946-1954. <https://doi.org/10.1128/jcm.00157-08>.
- Mercier, T., Reynders, M., Beuselinck, K., Guldentops, E., Maertens, J., & Lagrou, K. (2019). Serial Detection of Circulating Mucorales DNA in Invasive Mucormycosis: A Retrospective Multicenter Evaluation. *Journal of Fungi*, 5(4), 113. <https://doi.org/10.3390/jof5040113>.
- Millon, L., Scherer, E., Rocchi, S., & Bellanger, A.P. (2019). Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *Journal of Fungi*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.3390/jof5010024>.
- Mousavi, B., Botterel, F., Costa, J.M., Arné, P., Guillot, J., & Dannaoui, E. (2019). Occurrence and species diversity of human-pathogenic Mucorales in commercial food-stuffs purchased in Paris area. *Medical Mycology*, 57 (6), 739–744. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy121>.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., & Pfaller, M.A. (2015). Medical microbiology. *Bacteriology* (8th edition) in (pp.106-348). Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., ... Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Journal of Scientific Reports*, 8, 7660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26051-x>.

- Nenni, M., Çelebier, M., & Süslü, İ. (2020). Proteomik Çalışmalara Genel Bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 40(1), 48-58.
- Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., ... Abarenkov, K. 2015. A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments*, 30 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14121>.
- Omega Bio-Tek. (t.y.). E.Z.N.A.[®] HP Fungal DNA Kit. Erişim adresi: <https://www.omegabiotech.com/product/e-z-n-a-hp-fungal-dna-kit/>
- Patel, R., (2015) MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*, 61(1), 100-111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>.
- Raju, B., Santhanakumar, K.S., & Kesavachandran, U. (2020). Gastrointestinal involvement of unusual Mucormycete *Syncephalastrum racemosum* in a diabetic patient with adenocarcinoma: rare case presentation with review of literature. *Infection*, 48, 791–797. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01455-y>.
- Rammaert, B., Lanternier, F., Zahar, J.R., Dannaoui, E., Bougnoux, M.E., Lecuit, M., & Lortholary, O. (2012). Healthcare-associated mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (1), 44-54. <https://doi.org/10.1093/cid/cir867>.
- Richardson, M.D., & Koukila-Kahkola, P. (2007). *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* ve Diğer Sistemik ve Subkütanöz Zigomikoz Etkenleri (M. A. Saraçlı, Çev.) *Klinik Mikrobiyoloji* (9. baskı) içinde (s.1839- 1855). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Robert M.G., Romero, C., Dard, C., Garnaud, C., Cognet, O., Girard, T., ... Maubon, D. (2020). Evaluation of ID fungi plates medium for identification of molds by MALDI Biotyper. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(5), e01687-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01687-19>.
- Roden, M.M., Zaoutis, T.E., Buchanan, W.L., Knudsen, T.A., Sarkisova, T.A., Schaufele, R.L., ... Walsh, T.J. (2005). Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clinical Infectious Diseases*, 41(5), 634-653. <https://doi.org/10.1086/432579>.
- Romanelli, A.M., Sutton, D.A., Thompson, E.H., Rinaldi, M.G., & Wickes, B.L. (2010). Sequence-Based Identification of Filamentous Basidiomycetous Fungi from Clinical Specimens: a Cautionary Note. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(3), 741-752. <https://doi.org/10.1128/JCM.01948-09>.
- Rychert, J., Slechta, E.S., Barker, A.P., Miranda, E., Babady, N.E., Tang, Y.W., ...Hanson, K.E. (2018.) Multicenter evaluation of the Vitek MS v3.0 system for the identification of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(2), 1353-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01353-17>.
- Saegeman, V., Maertens, J., Meersseman, W., Spriet, I., Verbeken, E., & Lagrou, K. (2010). Increasing Incidence of Mucormycosis in University Hospital, Belgium. *Emerg. The Journal of Infectious Diseases*, 16(9), 1456-1458. <https://doi.org/10.3201/eid1609.100276>.
- Schulthess, B., Ledermann, R., Mouttet, F., Zbinden, A., Bloemberg, G.V., Böttger, E.C., & Hombach, M. (2014). Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2792-2803. <https://doi.org/10.1128/JCM.00049-14>.
- Schwarz, P., Guedouar, H., Laouti, F., Grenouillet, F., & Dannaoui, E. (2019). Identification of Mucorales by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Fungi*, 5(3), 56.

- <https://doi.org/10.3390/jof5030056>.
- Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F., & Dannaoui, E. (2006). Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 340-349. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.2.340-349.2006>.
- Shao, J., Wan, Z., Li, R., & Yu, J. (2018) Species identification and delineation of pathogenic Mucorales by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4) e1886-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01886-17>.
- Skiada, A., Lass-Floerl, C., Klimko, N., Ibrahim, A., Roilides, E., & Petrikkos, G. (2018). Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Journal of Medical Mycology*, 56(1), 93-101. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx101>.
- Skiada, A., Pagano, L., Groll, A., Zimmerli, S., Dupont, B., Lagrou, K., ... Petrikkos, G. (2011). Zygomycosis in Europe: Analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), 1859-1867. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03456.x>.
- Skiada, A., Pavleas, I., & Drogari-Apiranthitou, M. (2020). Epidemiology and diagnosis of mucormycosis: an update. *Journal of Fungi*, 6(4), 265. <https://doi.org/10.3390/jof6040265>.
- Slavin, M., van Hal, S., Sorrell, T.C., Lee, A., Marriott, D.J., Daveson, K., ... Chen, S.C. (2015). Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: Epidemiology and determinants of mortality. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 490-500. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.021>.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., ... Stajich, J.E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028-1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>.
- Sun, H.Y., Singh, N. (2011). Mucormycosis: its contemporary face and management strategies. *Lancet Infectious Diseases*, 11(4), 301–11. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70316-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70316-9).
- Sundermann, A.J., Clancy, C.J., Pasculle, A.W., Liu, G., Cumbie, R.B., Driscoll, E., ... Nguyen, M.H. (2019). How clean is the linen at my hospital? The Mucorales on unclean linen discovery study of large United States transplant and cancer centers. *Clinical Infectious Diseases*, 68(5), 850-853. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy669>.
- Thieken, A., & Winkelmann, G. (1992). Rhizoferrin: A complexone type siderophore of the Mucorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters*, 73(1-2), 37-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05285.x>.
- Tedder, M., Spratt, J.A., Anstadt, M.P., Hegde, S.S., Tedder, S.D., & Lowe, J.E. (1994). Pulmonary mucormycosis: results of medical and surgical therapy. *The Annals of Thoracic Surgery*, 57(4), 1044-1050. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0003-4975(94)90243-7).
- Topçu, A.W., Söyletir, G., & Doğanay, M. (Ed.). (2002). Mukormikoz etkenleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. içinde (s.1828- 1832). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2020). Outbreaks of Mucorales and the species involved. *Mycopathologia*, 185 (5), 765–781. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00403-1>.

- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4), 106. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>.
- White, T.C., Oliver, B.G., Gräser, Y., & Henn, M.R. (2008). Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *American Society for Microbiology*, 7(8), 1238-1244. <https://doi.org/10.1128/ec.00100-08>.
- Wijayawardene, N.N., Pawłowska, J., Letcher, P.M., Kirk, P.M., Humber, R.A., Schüßler, A., ... Hyde, K.D. (2018). Notes for genera: Basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). *Fungal Diversity*, 92, 43-129. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0409-5>.
- Yang, M., Lee, J.H., Kim, Y.K., Ki, J.S., Huh, H.J., & Lee, N.Y. (2016). Identification of Mucorales from clinical specimens: a 4-year experience in a single institution. *Annals of Laboratory Medicine* 36 (1), 60-63. <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2016.36.1.60>.
- Yılmaz, S., Duyan, S., Artuk, C., & Diktaş, H. (2014). Mikrobiyolojik Tanımlamalarda MALDI-TOF MS Uygulamaları. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 13(5), 421-426.
- Yücel, A. (1999). Medical mycology: yesterday and today. *Cerrahpasa Journal of Medicine*, 2, 191-198.
- Yücel, A. (1988). Tıp Mikolojisinin Dünü ve Bugünü. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları* 4, 424-434.
- Zheng, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7 (1-2): 203–14. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>.
- Zvezdanova, M.E., Aledo, M.G., López-Mirones, J.I., Ortega, J., Canut, A., Castro, C., ..., Rodríguez-Sánchez, B., (2023). Validation of an expanded, in-house library and an optimized preparation method for the identification of fungal isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Medical Mycology* .61 (4), myad038. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad038>.

7. SİMGE ve KISALTMALAR

BAL: Bronkoalveolar lavaj
BDG: β -D-Glukan
BOS: Beyin omurilik sıvısı
BT: Bilgisayarlı tomografi
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB: Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
ddNTP: Dideoksinükletit trifosfat
DKA: Diyabetik ketoasidoz
DM: Diyabetes mellitus
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo nükleik asit
dNTP: Deoksi nükleotit fosfatlar
DTCS: Dye Terminator Cycle Sequencing
ECMM: European Confederation of Medical Mycology (Avrupa Tıbbi Mikoloji Konfederasyonu)
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
EED: Epidemiyolojik eşik değer
ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği)
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test
FDA: Food and Drug Administration
GİS: Gastrointestinal Sistem
GM: Galaktomannan
GRP78: Glikozu regüle eden protein
HCCA: μ -siyano-4-hidroksisinamik asit
ISHAM: The International Society for Human & Animal Mycology
ITS: Internal Transcribed Spacer
HE: Hematoksilen-eozin
KOH: Potasyum hidroksit
KSD: Klinik sınır değerler
L-AmB: Lipozomal Amfoterisin B
LSV: Log Skor Değeri
M: Molar
MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi)
MEK: Minimum Efektif Konsantrasyon
MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MOPS: 3-N-morpholine-propane sulfonic acid
NWT: Non-Wild Type
PAS: Periyodik asit-Schiff
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA: Patates Dekstroza Agar
PDB: Pepton Glikoz Broth
PET: Pozitron emisyon tomografisi
pH: Power of Hydrogen

POS: Posakonazol

PRISMA: Sistematik İncelemeler ve Meta-Analizler için Tercih Edilen Raporlama Ögeleri

rDNA: Ribozomal DNA

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDA: Sabourraud Dextrose Agar

SOT: Solid organ transplantasyonu

SUAM: Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

TBE: Tris- Borat-EDTA

WT: Wild type

8. EKLER

EK 1



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

Sayı : 2011-KAEK-26/380
Konu : Etik kurul kararı

16.05 / 2022

Sayın Prof.Dr.Beyza ENER
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız ve sorumlu araştırmacısı olduğunuz "*Klinik örneklerden izole edilen mucorales takımı mantarların tür dağılımı ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak belirlenmesi*" başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 11 Mayıs 2022 tarih, 2022-10/13 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Araştırmanın tamamlanma bildiriminin ve özet sonuç raporunun kurulumuza iletilmesi için bilgilerinize sunulur.

EK:
-Karar (2 adet)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/BURSA
Tel: 0-224-2950020 Fax: 0-224-2950029
e-posta: uukaek@uludag.edu.tr Elektronik Ağ: www.tip.uludag.edu.tr

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik Örneklerden İzole Edilen Mucorales Takımı Mantarların Tür Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Belirlenmesi
------------------------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat. I Göktürk Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224. 295 00 20
	FAKS	0.224. 295 00 29
	E-POSTA	uukaek@uludag.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Beyza Ener
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek lisans öğrencisi Ayşen İkkan, Araş.Gör.Dr.Osman Merdan, Araş.Gör.Dr.Zeynep Chavouaz Ametoglou -Doç.Dr.Esra Kazak -Uzm.Dr.Beyhan Bulbül (yandal araş.gör.)
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	-Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enf.Hast. ve Klinik Mikr.AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağ.ve Hast. AD Çocuk Enfeksiyon Hast. BD
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilişsel Araştırma Projeleri Birimi
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Retrospektif araştırma
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Akademik amaçlı araştırma
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	01.09.2022 / 10 ay
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	100 hastaya ait suş
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Dili
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	21.04.2022	Türkçe

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☒ Tarih:21.04.2022
	ARAŞTIRUCULAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☒ Tarih:21.04.2022
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☐
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☐
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐
	DİĞER:	☒ Araştırma etik başvuru ön yazısı (Tarih:21.04.2022), hasta listesi, sorumlu araştırmacı özgeçmişi, tüm araştırmacılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klinik Örneklerden İzole Edilen Mucorales Takımı Mantarların Tür Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Retrospektif Olarak Belirlenmesi
------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022-10/13 Tarih: 11 Mayıs 2022 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelendi. 1-Araştırmanın başvurusu dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna, 2-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurumumuza iletilmesine, 3-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırmacılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.
------------------------	--

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURU

ÇALIŞMA ESASI İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyisi Klinik

BASKANIN UNVANI/ADI SOYADI Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

Üyeler	Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Katılım *
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU	Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Prof.Dr.SERBAŞAĞAN MOĞOL	Başkone Yürütme	Anesteziyoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒
Prof.Dr.M. Seray YILMAZ	Üye	Farmakoloji	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Prof.Dr. Hilal ÖZKAN	Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan BD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Prof.Dr. Hasan ARI	Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒
Doç.Dr. Ayşe TÜRKEKAN	Üye	Halk Sağlığı	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Doç.Dr. Kağan HUYSAI	Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒
Doç.Dr. Ömer ÖZ ÖZÜ	Üye	İç Hastalıkları Endokrin ve Metab.	BÜÜ.Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji ve Metabolizma BD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞIRLIK	Üye	Biyofizik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAYA	Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Bursa UÜ.Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Av. Ahmet BAYRAM		Hukuk	Bursa UÜ. Rektörlüğü Hukuk Bürosu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐
Tolga MUHTAR	Üye	Sağlık mesleği olmayan üye	Serbest Meslek	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐

* Toplamda Bulunma

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda kendisinden çok şey öğrendiğim, deneyim ve bilgileri ile her zaman yanımda olan, projenin her aşaması ile birebir ilgilenen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve örnek aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Beyza ENER,

Yüksek lisans eğitimim boyunca eğitimime katkıda bulunan bölümümüz hocalarıma,

Projemin her aşamasında bana yardımcı olan, motive eden, yanımda olan ve emeği geçen asistan doktorlara,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimlerini aktaran, deneyimlerinden yararlandığım ve yardımlarını esirgemeyen bölümümüz teknikerlerine,

Bütün eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman daha iyisi için motive eden aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TGA-2023-1313 no'lu proje kapsamında Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve lise eğitimimi Bursa’da tamamladım. 2015 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladım. 2020 yılında bu bölümden mezun oldum. Aynı yıl Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp-Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.