T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR PROBİYOTİK OLAN *SACCHAROMYCES CEREVICAE*'NIN *CANDIDA PARAPSILOSIS* BİYOFİLMİNE VE ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNİNE ETKİSİNİN *İN-VİTRO* TESTLERLE ARAŞTIRILMASI VE ANTİFUNGAL TEDAVİYE ETKİNLİĞİNİN DENEYSEL FARE MODELİNDE İNCELENMESİ

Gamze ALÇİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2024

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR PROBİYOTİK OLAN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE'*NIN *CANDIDA PARAPSILOSIS* BİYOFİLMİNE VE ANTİFUNGAL DUYARLILIK PATERNİNE ETKİSİNİN *İN-VİTRO* TESTLERLE ARAŞTIRILMASI VE ANTİFUNGAL TEDAVİYE ETKİNLİĞİNİN DENEYSEL FARE MODELİNDE İNCELENMESİ

Gamze ALÇİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

DESTEKLEYEN KURUM: KOÜ BAPSIS- 3222
ETİK KURUL ONAYI: 26.10.2022/ KOÜ HADYEK 5/2-2022

KOCAELİ
2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Bir probiyotik olan *Saccharomyces cerevisiae'nın Candida parapsilosis* biyofilmine ve antifungal duyarlılık paternine etkisinin *in-vitro* testlerle araştırılması ve antifungal tedaviye etkinliğinin deneysel fare modelinde incelenmesi

Tez Yazarı: Gamze Alçi

Tez Savunma Tarihi: 10.06.2024

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ

ÜNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /2024

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bir probiyotik olan *Saccharomyces cerevisiae*'nın *Candida parapsilosis* biyofilmine ve antifungal duyarlılık paternine etkisinin *in-vitro* testlerle araştırılması ve antifungal tedaviye etkinliğinin deneysel fare modelinde incelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, *Saccharomyces cerevisiae* probiyotiğinin *Candida parapsilosis* biyofilmine ve antifungal duyarlılık paternine olan etkilerini *in-vitro* testlerle araştırmak, ayrıca probiyotiğin antifungal tedaviye olan etkinliğini deneysel fare modelinde incelemektir.

Yöntem: Bu çalışmada, *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve probiyotik olarak *S. cerevisiae ATAFM2021* suşları; antifungal olarak, flukonazol (FLU), kaspofungin (CAS), amfoterisin-B (AMB) kullanılmıştır. İn vitro testlerde biyofilm miktarları, kristal viyole yöntemiyle absorbans değerleri şu gruplarda ölçülmüştür; tek başına *C. parapsilosis'in* oluşturduğu biyofilm; tek başına *S. cerevisiae'nın* oluşturduğu biyofilm; *S. cerevisiae* ve *C. parapsilosis*'nin aynı anda uygulandıktan sonraki biyofilm (grup-1); *S. cerevisiae* inokülasyonundan 60 dak. sonra *C. parapsilosis* 'in uygulandığı biyofilm (grup-2); *C. parapsilosis* inokülasyonundan 60 dak. sonra *S.cerevisiae* 'nin uygulandığı biyofilm (grup-3). Antifungal duyarlılık testleri mikrobroth dilüsyon yöntemi ile CLSI M27-A3 rehberine göre yapılmıştır ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerindeki değişimler incelenmiştir. *C.parapsilosis* biyofilminde antifungallerle birlikte probiyotiğin etkinliği Checkerboard yöntemi ile araştırılmış ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FIC) indeksi hesaplanmıştır. In vivo deneylerde, BALB/C erkek farelerde kuyruk veninden *C. parapsilosis* verilerek kandidiyazis modeli oluşturulmuştur. Enfeksiyondan 24 saat sonra, 5 gün boyunca intraperitoneal yolla antifungal tedavi uygulanmıştır. Probiyotik içme sularına eklenmiştir. Probiyotik uygulaması, iki farklı ana grupta, enfeksiyondan 5 gün sonra ve enfeksiyondan 14 gün önce başlayarak enfeksiyon sonrası 5 gün boyunca verilmiştir. Tedavinin 5. gününde sakrifikasyon yapılarak fare böbreklerinden izole edilen *C. parapsilosis*'in koloni sayıları kob/ml/g cinsinden hesaplanmıştır.

Bulgular: İn vitro testlerde, absorbans değerleri karşılaştırıldığında, *S. cerevisiae*'nin *C. parapsilosis* üremesi üzerine etkisi olmadığı gözlenmiştir. *C.parapsilosis*'nin oluşturduğu biyofilme kıyasla gruplardaki biyofilm miktarları karşılaştırıldığında, grup1 'de %11, grup2'de %15, grup3'te %28 oranında daha az biyofilm miktarı saptanmıştır. *C.parapsilosis'in* tek başına oluşturduğu biyofilmin antifungal SMİK50 değerleri deney gruplarına göre karşılaştırıldığında, AMB'de grup1'de 2 kat, grup 2 ve grup 3'te ise 4 kat düştüğü; CAS'ta tüm gruplarda 2 kat; FLU'da ise grup1 ve grup2'de 4 kat, grup 3'te ise 16 kat düştüğü belirlenmiştir.*C. parapsilosis* biyofilminin probiyotik ile birlikte antifungallere etkinliği test edildiğinde FICi değerlerine göre; AMB ve CAS kullanıldığında tüm deney gruplarında probiyotik ile sinerjik etki gözlenmiştir. FLU kullanıldığında ise grup2 ve grup3'te sinerjik etki gözlenmiştir.

İn vivo deneylerde, böbrek *C. parapsilosis* koloni sayıları, probiyotiğin enfeksiyondan 14 gün önce verildiği ve enfeksiyondan sonra antifungal tedavilerle birlikte probiyotik verildiği gruplarda en yüksekten en düşüğe doğru FLU, AMB, CAS grupları şeklinde sıralanmıştır. Enfekte edilip tedavi uygulanmayan kontrol grubunda ortalama 133,3 kob/ml/g *C. parapsilosis* tespit edilmiştir. Koloni sayıları, enfeksiyon sonrası sadece probiyotik verilen grupta ortalama 110,8, probiyotikle birlikte CAS verilen grupta 32, AMB grubunda 66, FLU grubunda 80 kob/ml/g olarak saptanmıştır. Enfeksiyondan 14 gün önce ve sonrasında probiyotik ile antifungal tedavi uygulanan gruplardaki koloni sayısı; sadece probiyotik verilen grupta ortalama 115, CAS grubunda 48,5; AMB grubunda 46,5; FLU grubunda ise 91,5 kob/ml/g'dır.

Sonuç: İn vitro test sonuçlarına göre, *S. cerevisiae* probiyotiğinin önceden uygulanması *C. parapsilosis* biyofilmini inhibe etmiştir. Ayrıca, *S. cerevicae*, *C. parapsilosis*'in antifungal MİK değerlerinin azalmasına neden olmuştur. *S. cerevicae*'nın CAS ve AMP ile uygulanması ile sinerjik etki saptanmış olup, FLU'de ise bir fark saptanamamıştır. Deneysel kandidiyazis modelinde tüm gruplarda, en etkili antifungalin CAS olduğu gözlenmiştir. Enfeksiyondan 14 gün önce probiyotik verilmesi sadece AMB grubunda tedavi sonucunu olumlu etkilemiş olup, CAS ve FLU etkinliğinde ise anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Sonuç olarak, *S. cerevisiae, C. parapsilosis* enfeksiyonlarının tedavisinde potansiyel bir yardımcı ajan olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Saccharomyces cerevisiae, Candida parapsilosis*, Biyofilm, Sinerji, Antifungal, Probiyotik.

ABSTRACT

Investigating the Effects of the Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on *Candida parapsilosis* Biofilm and Antifungal Susceptibility Patterns with *In-Vitro* Tests and Examining Its Efficacy in Antifungal Treatment in an Experimental Mouse Model

Objective: The aim of this study is to investigate the effects of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* on *Candida parapsilosis* biofilm formation and antifungal susceptibility patterns with *in-vitro* tests. Additionally, the study aims to examine the efficacy of the probiotic in enhancing antifungal treatment in an experimental mouse model.

Methods: In this study, the strains *C. parapsilosis ATCC 22019* and *S. cerevisiae ATAFM2021* (used as a probiotic) were utilized, along with the antifungals fluconazole (FLU), caspofungin (CAS), and amphotericin-B (AMB). *In-vitro* tests measured biofilm quantities by absorbance values using the crystal violet method in the following groups: biofilm formed by *C. parapsilosis* alone; biofilm formed by *S. cerevisiae* alone; biofilm formed after the simultaneous application of *S. cerevisiae* and *C. parapsilosis* (group-1); biofilm formed after the application of *C. parapsilosis* 60 minutes post *S. cerevisiae* inoculation (group-2); and biofilm formed after the application of *S. cerevisiae* 60 minutes post *C. parapsilosis* inoculation (group-3). Antifungal susceptibility tests were conducted using the microbroth dilution method according to CLSI M27-A3 guidelines, and changes in minimum inhibitory concentration (MIC) values were examined. The efficacy of the probiotic in conjunction with antifungals against *C. parapsilosis* biofilm was investigated using the Checkerboard method, and the fractional inhibitory concentration index (FICi) was calculated. In vivo experiments involved creating a candidiasis model in BALB/C male mice by administering *C. parapsilosis* through the tail vein. Antifungal treatment was administered intraperitoneally for 5 days, starting 24 hours after infection. The probiotic was added to their drinking water. Probiotic administration was given in two main groups: starting 5 days post-infection and starting 14 days before infection, continuing for 5 days post-infection. On the 5th day of treatment, mice were sacrificed, and the colony counts of C. parapsilosis isolated from their kidneys were calculated in CFU/ml/gr.

Results: In the *in-vitro* tests, comparing absorbance values, it was observed that *S. cerevisiae* had no effect on the growth of *C. parapsilosis*. When comparing the biofilm amounts in the groups to the biofilm formed by *C. parapsilosis* alone, there was 11% less biofilm in group 1, 15% less in group 2, and 28% less in group 3. When comparing the SMIC50 values of antifungals for the biofilm formed by *C. parapsilosis* alone to the experimental groups, it was found that the values for AMB decreased by 2-fold in group 1 and by 4-fold in groups 2 and 3; for CAS, the values decreased by 2-fold in all groups; and for FLU, the values decreased by 4-fold in groups 1 and 2, and by 16-fold in group 3. When testing the efficacy of antifungals in combination with the probiotic against *C. parapsilosis* biofilm, based on FICi values, a synergistic effect was observed in all experimental groups with AMB and CAS. With FLU, a synergistic effect was observed in groups 2 and 3. In the in vivo experiments, the *C. parapsilosis* colony counts in the kidneys were ranked from highest to lowest as follows: FLU, AMB, and CAS in the groups where the probiotic was administered 14 days before infection and continued post-infection along with antifungal treatments. In the infected control group that received no treatment, an average of 133.3 CFU/ml/gr of *C. parapsilosis* was detected. The colony counts were as follows: in the group given only the probiotic post-infection, an average of 110.8 CFU/ml/gr; in the group given CAS with the probiotic, 32 CFU/ml/gr; in the AMB group, 66 CFU/ml/gr; and in the FLU group, 80 CFU/ml/gr. In the groups where the probiotic and antifungal treatment were administered both 14 days before and post-infection, the colony counts were: in the group given only the probiotic, an average of 115 CFU/ml/gr; in the CAS group, 48.5 CFU/ml/gr; in the AMB group, 46.5 CFU/ml/gr; and in the FLU group, 91.5 CFU/ml/gr.

Conclusion: According to the *in-vitro* test results, the pre-application of the *S. cerevisiae* probiotic inhibited the biofilm of *C. parapsilosis*. Additionally, *S. cerevisiae* caused a reduction in the antifungal MIC values of *C. parapsilosis*. A synergistic effect was detected with the application of *S. cerevisiae* in combination with CAS and AMP, while no difference was observed with FLU. In the experimental candidiasis model, CAS was found to be the most effective antifungal across all groups. Administering the probiotic 14 days before infection positively affected the treatment outcome only in the AMB group, with no significant change in the efficacy of CAS and FLU. In conclusion, *S. cerevisiae* can be considered a potential adjunctive agent in the treatment of *C. parapsilosis* infections.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, Biofilm, Synergy, Antifungal, Probiotic.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hoşgörüsü ve sonsuz sabrı ile daima bana destek olan, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren tez danışmanım Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ'ye teşekkür ediyorum.

Tez izleme komitemde yer alarak araştırmalarımın her aşamasında sağladıkları katkılardan dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Semil Selcen GÖÇMEZ ve Prof. Dr. Devrim DÜNDAR'a teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimini yapmam için bana fırsat veren ve emeği olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Fethiye KOLAYLI, Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Dr. Öğretim Üyesi Erdener BALIKÇI'ya teşekkür ediyorum.

Araştırmalarımı gerçekleştirdiğim Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi (DETAB) Başkanı Prof. Dr. Tijen UTKAN ve görev yapan tüm DETAP çalışanlarına yardımları için teşekkür ediyorum.

Tezimde kullandığım *S. cerevisiae ATAFM-2021* suşu temininde yardımcı olan ve bilimsel yaklaşımları ile her daim destek olan Prof.Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e teşekkür ediyorum.

Hayatımın her anında yanımda olan, başarılı bir bilim insanı olmamda büyük emeği olan değerli Hocam Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN'a içtenlikle teşekkür ediyorum.

Doktora sürecimde sağladıkları destek, sonsuz sabır ve anlayışları için değerli işverenim Sn. Dr. Oğuz AKBAŞ, genel müdürüm Nurşan ÖZAYKUT GÜN ve ekip liderim Can ORTAK'a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca motivasyon kaynağım olan, desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Bu zorlu süreç boyunca, benim yanımda olup desteklerini esirgemeyen, anlayışlarıyla, sevgileriyle, emekleri ve özverileriyle her zaman beni motive eden ve güçlü tutan değerli aileme, annem Ayşe ALÇİ, babam Cevdet ALÇİ, kardeşlerim Gizem ve Zeynep ALÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destekleri (Proje No: KOÜ BAPSIS-3222) için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "*Bir probiyotik olan Saccharomyces cerevisiae'nın Candida parapsilosis biyofilmine ve antifungal duyarlılık paternine etkisinin in-vitro testlerle araştırılması ve antifungal tedaviye etkinliğinin deneysel fare modelinde incelenmesi*" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır.

Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ ix
İÇİNDEKİLER x
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
GRAFİKLER LİSTESİ xv
SİMGELER ve KISALTMALAR xvi
1 GİRİŞ 19
1.1 Candida Türleri 19
1.2 Candida parapsilosis 20
1.3 *C. parapsilosis* 'in Fenotipik Yapısı ve Karakterizasyonu 21
1.4 *C. parapsilosis* Epidemiyoloji 26
1.5 *C. parapsilosis* Patogenez ve Virulans Faktörleri 27
1.5.1 Adezyon ve Slime Üretimi 28
1.5.2 Hidrolitik Enzimlerin Salgılanması 28
1.5.3 *C. parapsilosis* ve Biyofilm 29
1.5.4 *C.parapsilosis* Enfeksiyonları 31
1.5.5 *C. parapsilosis*'in Antifungallere Duyarlılığı 32
1.5.5.1 Polienler 33
1.5.5.2 Ekinokandinler 34
1.5.5.3 Azoller 35
1.6 Probiyotikler 36
1.6.1 Probiyotik *Saccharomyces cerevisiae* 37
1.6.2 Probiyotik *Saccharomyces cerevisiae*'nın *Candida* üzerine etkileri 40
2 AMAÇ 42
3 YÖNTEM 44
3.1 Etik Kurul Onayı 44
3.2 Kullanılan Malzemeler 44
3.2.1 Besiyerleri 44

3.2.2 Kimyasal Maddeler....44
3.2.3 Kullanılan Cihazlar....45
3.2.4 Kullanılan Sarf Malzemeler....45
3.2.5 Çalışmada Kullanılan Suşlar....46
3.3 *İn-Vitro* Yöntem....46
3.3.1 Besiyerleri ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması....46
3.3.1.1 RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) Besiyeri....46
3.3.1.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besiyeri....46
3.3.1.3 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)....47
3.3.1.4 Mısır Unlu-Tween 80 Agar....47
3.3.1.5 Phosphate Buffered Saline (PBS) Hazırlanması....47
3.3.2 Antifungal Stok Çözeltilerinin Hazırlanması....47
3.3.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri....48
3.3.4 Zamana Bağlı Üreme Eğrisi....49
3.3.5 Biyofilm oluşturma ve Biyofilm miktarı belirleme deneyleri....50
3.3.5.1 Suşların Saflaştırılması-Zenginleştirilmesi....50
3.3.5.2 Biyofilmlerin Oluşturulması....51
3.3.5.3 *In-vitro C. parapsilosis* ve *S. cerevisiae* biyofilm deney grupları....52
3.3.5.4 Biyofilmlerin Yıkama İşlemi....52
3.3.5.5 Biyofilmlerin Boyanma ve Miktar Ölçüm İşlemi....53
3.3.5.6 Biyofilm Oluşturulduktan Sonra Antifungal Duyarlılık Testleri....53
3.3.5.7 Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİCi) indeksi hesaplanması....54
3.3.5.8 Biyofilm inhibisyon hesaplanması....54
3.4 İn Vivo Yöntem....55
3.4.1 Deney Grupları....56
3.4.2 Kandidiyazis Deney Modeli Oluşturulması....58
3.4.3 Antifungal Tedavilerin Uygulanması....58
3.4.4 Probiyotik Uygulanması....59
3.4.5 Sakrifikasyon....59
3.4.6 Numunelerin Toplanması ve *C. parapsilosis* İzolasyonu....59
3.4.7 *C.parapsilosis* tanımlanması....61
3.4.7.1 Mısır Unlu-Tween 80 Agar'daki Mikroskobik Morfoloji....61
3.4.7.2 VİTEK 2 YST ID Kart ile Tanımlama....62
3.5 İstatistiksel Analiz....62

4 BULGULAR 63
4.1 İn vitro Bulgular 63
4.1.1 Antifungal Duyarlılık Testleri Sonuçları 63
4.1.2 Zamana Bağlı Üreme Eğrisi 63
4.1.3 Biyofilm Miktar Ölçüm Sonuçları 65
4.1.4 C. *parapsilosis* Probiyotikli Biyofilmlerinde SMİK'in Belirlenmesi 67
4.1.4.1 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Amfoterisin-B etkisi 68
4.1.4.2 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Flukonazolün etkisi 70
4.1.4.3 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Kaspofungin etkisi 71
4.1.5 *C. parapsilosis* Biyofilminde Antifungal ve Probiyotik Kombinasyonuna Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi 72
4.2 İn-Vivo Bulgular 73
5 TARTIŞMA 76
6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER 81
7 KAYNAKLAR 82

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1 *C. parapsilosis* 'in fenotipik özellikleri.....23

Tablo 1.2. *C. parapsilosis*'in karbonhidratları asimilasyon ve fermentasyon yeteneği.....24

Tablo 1.3 Türkiye Probiyotik Rehberi, Önerilen probiyotik *Saccharomyces spp*. ve destek kullanım alanları.....37

Tablo 3.1 Antifungal ajanların stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler..48

Tablo 3.2 Kullanılan antifungal ajanların konsantrasyon aralıkları.....48

Tablo 3.3 İn vivo deney grupları.....57

Tablo 3.4 Antifungallerin veriliş yolu, hacim ve veriliş sıklığı.....59

Tablo 3.5 Anestezik ajanların doz ve veriliş yolları.....59

Tablo 4.1 *C. parapsilosis* ve *S. cerevicae'nın* Amfoterisin-B, Flukonazol ve Kaspofungine karşı MİK sonuçları.....63

Tablo 4.2 *C. parapsilosis* ve probiyotikli ortak kültürlerin absorbans ve p değerleri.....64

Tablo 4.3 Kristal viyole Yöntemi ile belirlenen biyofilm OD değerleri ve p değerleri.....66

Tablo 4.4 *C. parapsilosis* biyofilminde antifungal ve probiyotik ile birlikte %50 SMİK sonuçları.....68

Tablo 4.5 *C. parapsilosis* biyofilminde 2 µg/ml AMB biyofilm inhibisyon oranları.....69

Tablo 4.6 *C. parapsilosis* biyofilminde 2 µg/ml FLU biyofilm inhibisyon oranları.....70

Tablo 4.7 *C. parapsilosis* biyofilminde 0,03 µg/ml CAS biyofilm inhibisyon oranları.....71

Tablo 4.8 *C. parapsilosis* biyofilminde antifungal ve probiyotik kombinasyonuna karşı gösterdikleri etkileşim türleri.....72

Tablo 4.9 İn vivo deney gruplarında saptanan *C. parapsilosis* sayıları (kob/ml/mg).....74

Tablo 4.10 İn vivo deney gruplarında saptanan *C. parapsilosis* sayılarının ortalama değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.....74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 *C. parapsilosis* SDA besiyerindeki koloni görüntüsü 21

Şekil 1.2 *C. parapsilosis* 'a özgü, mısır unlu agarda 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen uç kısımları kıvrık pseudohifa yapıları (Prasanna S ve ark., 2016). 22

Şekil 1.3 Biyofilm oluşum aşamaları 30

Şekil 1.4 Antifungallerin etki mekanizmaları (Murphy SE. ve ark., 2021'den uyarlanmıştır) 33

Şekil 3.1 Biyofilm oluşumu için ELISA plaklarının inkübasyonu 51

Şekil 3.2 Sağlıklı ve rasgele seçilen iki fareden oluşan grupların görüntüsü 55

Şekil 3.3 Kuyruk veninden enjeksiyon işleminin uygulanması 58

Şekil 3.4 Homojenizasyon işlemi 60

Şekil 3.5 Maya kolonilerinin değerlendirilmesi 61

Şekil 4.1 CV Yöntemi ile biyofilm miktar belirleme çalışmasında *C. parapsilosis* 'un tek başına oluşturduğu biyofilm ile probiyotik eklenen gruplardaki biyofilm görüntüsü. 67

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 4.1 *C. parapsilosis* ve probiyotikli ortak kültürlerin büyüme eğrisi.....64

Grafik 4.2 Biyofilm absorbans değerlerinin karşılaştırılması 66

Grafik 4.3 AMB konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları.....69

Grafik 4.4 FLU konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları.....70

Grafik 4.5 CAS konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları.....71

Grafik 4.6 İn vivo deney gruplarında ortalama *C. parapsilosis* sayısı 75

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

ALS : Aglutinin Benzeri Dizi

AmB: Amfoterisin B

ATCC: American Type Culture Collection

BCR: Hücre Duvarı Düzenleyici

°C: Santigrat

CAS: Kaspofungin

CDR Candida ilaç direnci

CFU: Colony Forming Unit

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

cm : Santimetre

Dak : Dakika

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EFG: Gelişmiş Filamentli Büyüme Proteini

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EPS: Ekstraselüler Polisakkarid

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F: Kontrol Grubu (Enfeksiyon Oluşturulmuş, Probiyotik/Tedavi Almayan

FICi: Fractional Inhibitory Concentration index

FKS: Beta-1,3-Glukan Sentaz Katalitik Alt Birimi

FLU: Flukonazol

FP: Sadece Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Oluşturulmuş, Ek Tedavi almayan

FP-AMB Amfoterisin-B ile Probiyotik Alan Grup

FP-CAS: Kaspofungin ile Probiyotik Alan Grup

FP-FLU: Flukonazol ile Probiyotik Alan Grup

FPP: 2 Hafta Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası 5 Gün Daha Probiyotik Alan Grup

FPP-AMP: 2 Hafta Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Amfoterisin-B ile Probiyotik Alan Grup

FPP-CAS: 2 Hafta Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Kaspofungin ile Probiyotik Alan Grup

FPP-FLU: 2 Hafta Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Flukonazol ile Probiyotik Alan Grup

g: Gram

HADYEK: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HCl: Hidroklorik asit

HIV: Human İmmunodeficiency Virus

İBH: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

İBS: İrritabl Barsak Sendromu

K: Kontrol

Kg: Kilogram

Kob: Koloni Oluşturan Birim

KOÜ: Kocaeli Üniversitesi

KP: Sadece Probiyotik Alan Kontrol Grubu (Enfeksiyon Oluşturulmadan

KPP: 2 Hafta Artı 5 Gün (19 Gün Boyunca Sadece Probiyotik Alan

KV: Kristal Viyole

LAmB: Lipozomal Amfoterisin B

LIP: Lipaz

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight

MDR: Çoklu İlaç Direnci

mg: Miligram

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

ml: Mililitre

MOPS: MOPS Buffer Powder

NAC: Non Albicans Candida

NaOH Sodyum hidroksit

Nm: Nanometre

OD: Optik Dansitometre

PBS: Phosphate Buffered Saline

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rpm: Dakikada Devir

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAP: Salgılasal Aspartil Proteaz

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

SDB: Sabouraud Dextrose Broth

SMİK: Sesil Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

YPD: Yeast Pepton Dekstroz

µl: Mikrolitre

1 GİRİŞ

1.1 *Candida* Türleri

Candida cinsi, taksonomik sınıflandırmada Ascomycota filumuna, Saccharomycotina subfilumu içinde yer almakta olup, Saccharomycetes sınıfına aittir. Doğada yaygın olarak bulunan bu maya cinsi, insan mikroflorasında da bulunan bir mikroorganizmadır (McManus BA, Coleman DC, 2014).

Candida türleri, 1-3x4-6 µm ölçülerinde, tek hücreli, oval şekilli, maya formunda mikroorganizmalardır. Aseksüel olarak lateral tomurcuklanma ile çoğalırlar. Gram pozitif boyanan, kapsülsüz ve fakültatif aerobik mayalardır. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinde 25 °C-37 °C arası sıcaklıkta 48-72 saat içinde beyaz veya kremsi, kabarık, düzgün yüzeyli ve 2-3 mm çapında koloniler oluştururlar (Trofa, Gácser, & Nosanchuk, 2008).

Konak koşullarına bağlı olarak, bu mikroorganizma, değişen çevresel koşullar nedeniyle fırsatçı patojenlere dönüşebilir. *Candida* türleri, bağışıklığı baskılanmış bireylerde kutanöz (deri ve ekleri), mukozal (orofaringeal, özofageal ve vulvovajinal) ve sistemik (kan dolaşımı enfeksiyonları) enfeksiyonlara neden olabilir. AIDS'li hastalarda kutanöz ve mukozal enfeksiyonlar, yenidoğanlarda orofaringeal pamukçuk, yetişkin kadınlarda vajinit, kemoterapi alan kanser hastalarında ve organ transplantasyon yapılan immünsüprese bireylerde ise kandidemi veya invazif kandidiyazis daha sık görülmektedir (Pfaller MA, 2007).

Candida türlerinin bugüne kadar tanımlanmış 150'den fazla türü bulunmakta olup, bu türlerden yaklaşık 15'i insanlarda enfeksiyona neden olabilir. Bu türler, *Candida albicans* ve albicans dışı *Candida*'lar olarak iki farklı grupta incelenmektedir. Non-albicans Candida (NAC)'ın sıklıkla izole edilen türleri arasında; *C. parapsilosis, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. dubliniensis, C. pelliculosa, C. kefyr, C. lipolytica, C. famata, C. inconspicua, C. rugosa, C. norvegensis* ve *C. zeylanoides* yer almaktadır (Pfaller MA, 2007).

Son yıllarda NAC türlerinin izolasyonunun arttığı bildirilmektedir (Paramythiotou ve ark 2014, Tóth ve ark., 2019). NAC türlerinin dünya çapındaki dağılımına ilişkin yapılan bir çalışmada klinik örneklerde *C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis ve C. krusei*'nin de sıklıkla izole edildiğini göstermiştir (Arastehfar ve ark., 2020).

1.2 *Candida parapsilosis*

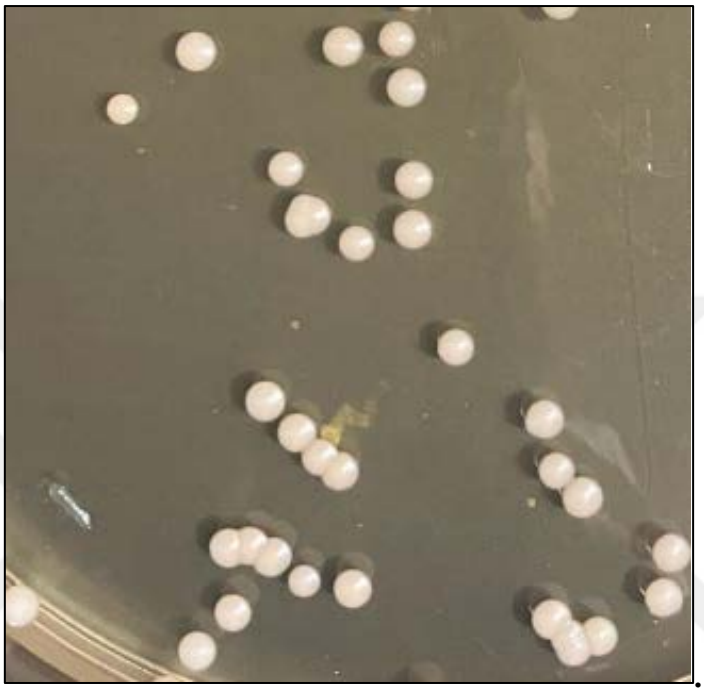
C.parapsilosis de içinde üç farklı grup olan bir tür kompleksi olarak kabul edilmekte iken, Tavanti ve ark. genotipik yöntemlerle yaptıkları çalışmada bu tür kompleksini oluşturan grupların bağımsız birer tür olarak kabul edilebilecek kadar birbirinden farklı olduklarını göstermişlerdir. Böylece yeni kabul edilen türler grup I için *C. parapsilosis* (sensu stricto), grup II için *C. orthopsilosis*, grup III için *C. metapsilosis* olarak adlandırılmışlardır (Tavanti, Davidson, Gow, Maiden, Odds, 2005)

C. parapsilosis doğada yaygın olarak bulunan, insan derisi ve mukozal membranlarda da kommensal bir şekilde bulunan maya türüdür (Van Asbeck, Clemons, Stevens, 2009; Lupetti ve ark., 2002). Ancak ortam koşulları bozulduğunda fırsatçı patojen haline gelebilir ve enfeksiyonlara neden olabilirler. Özellikle sağlık çalışanlarının elleri aracılığıyla bulaşan *C. parapsilosis*, hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Bonassoli, Bertoli, Svidzinski, 2005; Van Asbeck ve ark., 2009)

C. parapsilosis, özellikle yenidoğan, HIV hastaları, cerrahi müdahale görmüş hastalar ve organ transplantasyonu geçirmiş hastalarda enfeksiyon oluşturur. *C. parapsilosis'*in protez yüzeylere ve implante edilmiş tıbbi cihazlara yapışma yeteneği nedeniyle, mekanik ventilatör, kateter veya diğer uzun süreli kullanım gerektiren kalıcı cihazların kullanıldığı hastalarda enfeksiyon riskini arttırdığı gösterilmiştir (Cuéllar. López, Villagómez, Ruiz 2012; Nemeth T ve ark., 2013; Ramage, Martínez, López-Ribot, 2006). *C. parapsilosis' in* neonatal *Candida* enfeksiyonlarının üçte birinden sorumlu olduğu ve ölüm oranının yaklaşık %10 olduğu göz önüne alındığında, özellikle düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlar yüksek risk altındadır (Harrington ve ark.,2017; Pammi ve ark.,2013).

1.3 *C. parapsilosis* 'in Fenotipik Yapısı ve Karakterizasyonu

C. parapsilosis hücreleri, genellikle oval, yuvarlak veya silindirik bir morfoloji sergiler. Koloni morfolojisi besiyerinde pürüzsüz, beyaz veya krem renkte düzgün sınırlara sahip yuvarlak veya ovaldir (Laffey, Butler, 2005), (Şekil 1.1).



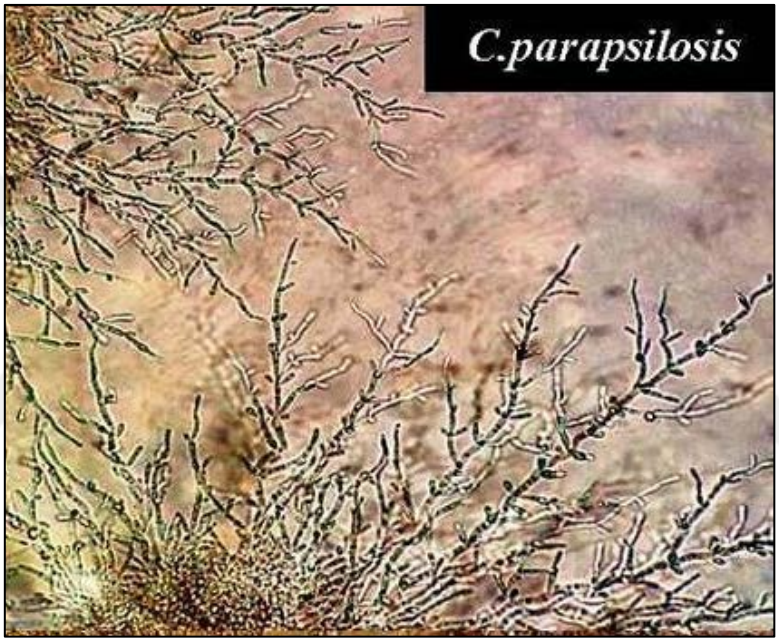
Şekil 1.1 *C. parapsilosis* SDA besiyerindeki koloni görüntüsü

Candida türlerinin biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde konvansiyonel yöntemler veya otomatize sistemler kullanılır. Bu yöntemler arasında germ tüp testi, kromojenik besiyerleri kullanımı, biyokimyasal/asimilasyon testleri, mısır unlu agarda üreme sonrası morfolojik değerlendirme, hızlı tanı yöntemleri (enzimatik testler), moleküler ve kütle spektrometre yöntemleri gibi çeşitli teknikler bulunmaktadır (Pfaller MA, 2007; Alam M, 2014).

C. parapsilosis hücreleri tomurcuklanarak ürerler ve oluşan tomurcuk yapıya blastokonidiya veya blastospor denir. Blastosporlar, birbirlerinden ayrılmadan boğumlanma yaparak hücre zincirleri oluşturur ve bu uzama süreci sonucunda meydana gelen yapıya pseudohifa (yalancı hifa) denir. Gerçek hifalar ise boğumlanma yapmazlar; bir maya

hücresinin veya hifasının bir kenarından oluşurlar ve duvarları birbirine paralel, aralarında belirgin çizgi şeklinde septum olacak şekilde uzanırlar.

Candida türleri, mısır unlu agarda oluşan klamidospor, blastospor, hif, pseudohif gibi yapıların değerlendirilmesiyle morfolojik olarak tanımlanabilir. *C. parapsilosis*, mısır unlu besiyerinde oda sıcaklığında 72 saat (üç gün) içinde blastokonidiyumlarını tek ya da küçük gruplar halinde pseudohifler boyunca oluşturabilir. Mikroskopide incelendiğinde çalı görünümüne benzeyen, ekim çizgilerine bitişik çok sayıda fokal alan içeren satellit üreme paterni gözlemlenir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 *C. parapsilosis* 'a özgü, mısır unlu agarda 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen uç kısımları kıvrık pseudohifa yapıları (Prasanna S ve ark., 2016).

Karışık enfeksiyonların, özellikle steril olmayan bölgelerden türlerin hızlı tanımlanması ve tespiti için kromojenik besiyerleri tercih edilebilmektedir. Koloni tanımlaması, ekzoenzim aktivitesini takiben çeşitli substratlardan kromojenik parçalanma ürünlerinin salınımına dayanmakta ve farklı renklerde koloni yapıları gözlemlenmektedir. Örneğin, CHROMagar Candida (CHROMagar Paris, Fransa) besiyeri kullanıldığında, *C. glabrata* kolonileri mavi-yeşil, *C. albicans* kolonileri pembe veya mor, *C. parapsilosis* kolonileri beyaz ve *C. tropicalis* kolonileri koyu mavi renkte görünmektedir (Tamura, Alshahni, Makimura, 2022).

C. parapsilosis tanısında klinik rutin laboratuvarlarda yaygın olarak karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon temeline dayalı API 20C-AUX (bioMerieux, France), ID 32C (bioMerieux, France) kullanılmaktadır (Ramani R 1998, Neppelenbroek 2014). VITEK 2/YST (bioMerieux, France) sistemi ise tam otomatize bir sistemdir ve 53 farklı maya türünü, karbonhidrat ve organik asit asimilasyon profilleri ile oksidaz ve arilamidaz aktivitelerini ölçerek tanımlar ve 15 saatlik inkübasyon sonunda ölçülen değerleri kendi kütüphanesiyle karşılaştırarak sonuçlandırabilir (Graf,Adam, Zill, Göbel, 2000).

C. parapsilosis tanısında kullanılan bir diğer ticari yöntem Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI-TOF MS).dir. MALDI_TOF MS mikroorganizmaları türe özgül peptit ve protein kütle kalıplarını kullanarak tanımlayan bir yöntemdir. Proteinin molekül ağırlığına göre referans veri tabanı ile karşılaştırarak tür tayini gerçekleştirir (Yaman, Akyar, Can, 2012).

C. parapsilosis'e ait fenotipik özellikler Tablo 1.1 'de, biyokimyasal karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon yeteneği Tablo 1.2' de gösterilmiştir (Ellis ve ark.,2007; Howell, Hazen, 2011).

Tablo 1.1 *C. parapsilosis* 'in fenotipik özellikleri

Fenotipik Özellikler	
37ºC'de üreme	+
Germ tüp oluşumu	-
Kapsül, çini mürekkebi ile boyanma	-
Klamidospor oluşumu	-
Yalancı veya gerçek hif oluşturma	+
Üreaz enzimi	-
Fenol oksidaz enzimi	-
Blastospor oluşumu	+
Psödohifa oluşturma	+

+: Pozitif;- :Negatif;

Tablo 1.2. *C. parapsilosis*'in karbonhidratları asimilasyon ve fermentasyon yeteneği

Asimilasyon			
Glukoz	+	Eritritol	-
Maltoz	+	Ribitol	+,y
Sukroz	+	Galaktitol	-
Laktoz	-	D-Mannitol	+
D-Glukonat	+,y	D-Glucitol	+
DL-Laktat	-	Sorboz	+,y
2-K-D -Glukonat	+	Melezitoz	+
D-Glukuronat	-	L-Arabinoz	+
Galaktoz	+	D-Arabinoz	-
Melibiyoz	-	D-Riboz	d
Sellobiyoz	-	L-Ramnoz	-
N-A-D-Glukozamin	+	Çözünebilen nişasta	-
α-M-D-Glukozid	+	Raffinoz	-
Inositol	-	Trehaloz	+
D-Ksiloz	+	D-Glukozamin	d
Dulcitol	-	Gliserol	+
Fermentasyon			
Glukoz	+		
Maltoz	-		
Sukroz	-		
Laktoz	-		
Galaktoz	-		
Trehaloz	-		
Laktoz	-		
Galaktoz	-		
Trehaloz	-		

+: Pozitif; - :Negatif; d: Değişken; y: Yavaş

Maya türlerinin tanımlanmasında moleküler tanımlama yöntemleri de kullanılabilmektedir (Xu ve ark., 2002; Xafranski ve ark., 2012). Moleküler yöntemler, tanı ve aynı zamanda antimikrobiyal ilaç direncini tespit etme, epidemiyolojik tiplendirme amacıyla da kullanılabilir. Ancak, özel laboratuvar koşulları ve yüksek maliyet nedeniyle, bu yöntemlerin rutin kullanımı sınırlıdır. Bu yöntemler genellikle araştırma amaçlı kullanılmaktadır (Taira ve ark.,2014; Yeo, Wong,2002).

Moleküler tanımlama yöntemlerinde, "in-house" (yerinde) ve ticari kitler mevcuttur. Bunlar arasında, sık rastlanan bakteriyemi etkenlerini de içeren çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testleri bulunmaktadır. İnvaziv mantar enfeksiyonlarında, genellikle birkaç tür etken olarak belirlenmesine rağmen, nadir görülen patojenlerin sıklığı da giderek artmaktadır. Bu nedenle, etkene özgü PZR yöntemlerinin kısıtlılığını aşmak amacıyla, çoklu (multiplex) ve "panfungal" teknikler geliştirilmektedir. Bu teknikler sayesinde, invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısı konabilir, kültürde üretilemeyen etkenlerin cins ve tür düzeyinde tanımlanması ve antifungal duyarlılıkla ilgili bilgi elde edilebilir. Çoklu PZR yöntemlerinde, birden fazla patojen için özgül primerler kullanılarak, etkenler amplikon uzunluğu veya erime eğrisi analizi ile ayrılabilir. "Panfungal" testlerde, tüm mantar kaynaklı nükleik asitleri amplifiye etmek için primerler kullanılır. Amplikon elde edildiğinde saflaştırılarak dizi analizi yapılır ve etken tanımlanır. Bu şekilde, nadir rastlanan patojenlerin cins/tür düzeyinde tanımlanabildiği gözlenmiştir (Ullmann ve ark., 2017).

Gerçek zamanlı PZR yönteminde, "panfungal" primerlere etkene özgü tasarlanmış problar eklenmesi mümkündür. Bu sayede, problar sık rastlanan patojenlerin erime eğrisi analizi ile tanımlanmasını sağlar ve diğer patojenler amplikon dizisinin analizi ile tanımlanabilir (Valero ve ark., 2016).

PZR ve manyetik rezonans testlerini birleştiren "T2 Candida Magnetic Resonance Assay"'de, tanı yöntemleri arasında yer almaktadır. Bu test, tam kan örneğinden sık görülen beş *Candida* türünü (C. *albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. krusei*) 5 saat içinde saptayarak tür bazında raporlayabilir. Ancak, testin uygulanabilmesi için özel bir cihaz olan T2DX'e ihtiyaç duyulmaktadır ve testin FDA onayı bulunmaktadır (Clancy, Nguyen, 2018).

Candida enfeksiyonlarının tanısında farklı yöntem temelli testler, geliştirilmeye devam etmektedir. Bu testler arasında, "İn-Situ Hibridizasyon", "Microarray" ve proteom temelli testler bulunmaktadır (Massire ve ark., 2013; Pitarch ve ark., 2018). Geniş spektrumlu PZR reaksiyonu ürünlerini iyonizasyon-kütle spektrometrisi ile birleştiren bir yöntem de tanımlanmıştır (Walsh, Hayden, Larone, Larone's,2018; Pitarch, Nombela, Gil, 2018). Serolojik proteom analizi, rekombinant cDNA ekspresyon kütüphaneleri ve antijenik protein "Microarray" gibi deneysel aşamadaki yöntemler, mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek biyobelirteç arayışını sürdürmektedir (Pitarch ve ark., 2018).

1.4 *C. parapsilosis* Epidemiyoloji

Sağlıklı bireylerin normal florasında bulunabilen *C. parapsilosis* ilk kez 1928 yılında tanımlanmıştır. Dünyada sık görülen invazif sistemik mikoz etkenleri arasında yer almaktadır (Azie ve ark., 2012).

Sistemik mikozların önemli bir parçası olan kandidemiler genellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda görülmekle birlikte, sıklıkları kliniklere göre değişmektedir (Ylipalosaari ve ark.,2012). *C. parapsilosis* in etken olduğu kandidemi, pediatrik hastalarda, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde kritik bir öneme sahiptir (Cattana ve ark., 2017; Pammi ve ark., 2013). Özellikle damar içi kateter ve benzeri tıbbi araçlara tutunmayı kolaylaştıran kuvvetli biyofilm oluşturabilme yeteneği sebebiyle, invazif işlem gören hastalarda görülme sıklığı yüksektir (Tóth ve ark.,2019).

Ellerde kolonize olabilmesi nedeniyle sağlık personelinin el hijyeni yetersiz kaldığında *C. parapsilosis*, hastane enfeksiyonu etkeni olabilmektedir (Bonassoli ve ark., 2005; Van Asbeck ve ark., 2009) .

C.parapsilosis dünya çapında kandidemiye neden olan en yaygın *Candida* türleri arasında yer almakta olup, Asya ülkelerinde kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin yaklaşık %20 si , Balkan ülkelerinde ise yaklaşık %30 u oranında etken olarak belirlenmiştir (Daneshnia ve ark., 2023). Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda, *C. parapsilosis* sıklığı %11,8 ile %20 arasında değişmektedir (Eren ve ark.,2022; Kantarcıoğlu ve ark, 2019). Kocaeli Üniversitesi hastanemizde 2017-2021 yılları arasında *C. parapsilosis* oranı Candida türleri arasında erişkin hasta grubunda %12,7, pediatrik hasta grubunda ise %46,9 olarak saptanmıştır (Alçi, Keçeli, Sarıtaş, 2020).

Candida kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılan antifungal ajanlara karşı son yıllarda direnç oranlarının arttığı bildirilmektedir. *C. parapsilosis* ‘in neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan flukonazol, amfoterisin B ve vorikonazol direnç oranları sırasıyla %15,2, %1,3 ve %4,7 olarak bildirilmiştir (Yamin ve ark., 2022).

1.5 *C. parapsilosis* Patogenezi ve Virulans Faktörleri

Candida enfeksiyonlarının gelişiminde etkili faktörler; konak faktörleri, kolonizasyon, uzun süreli antibiyotik kullanımı, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar veya hastalıklar, hematolojik maligniteler, solid organ tümörleri, damar içi cihazların varlığı, total paranteral beslenme, nötropeni, uzun süreli yoğun bakım yatışı, uzun operasyon süreleri, hemodiyaliz ve periton diyalizi, ayrıca neonatal veya ileri yaş gruplarına ait olmak gibi durumlar sırlanabilir. Bu faktörlerin kombinasyonu, *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının ortaya çıkma riskini artırabilir ve klinik tabloların şiddetini etkileyebilir.

C. parapsilosis'in enfeksiyon oluşumuna katkı sağlayan bir diğer özelliği, maya formundan filamentöz hif formuna geçiş yapabilme yeteneğidir. Filamentli formda, psödohif adı verilen zincirlere bağlı kalan uzun hücrelerden oluşurken, filamentsiz formda ise hücre bölünmesinden sonra birbirlerinden ayrılan yuvarlak maya hücrelerinden oluşur. *C. albicans*'ın aksine, *C. parapsilosis*, gerçek hifleri oluşturmak için farklı hücre sınırları olmayan uzun germ tüpleri oluşturmaz. Bunun yerine, hücreler arasında görünür daralmalara sahip olan psödohif oluşturur. Bu dimorfik geçiş, virülans için gereklidir; her hücre tipi enfeksiyona farklı şekilde katkıda bulunur (Rupert, Rusche, 2022).

C.parapsilosis' in virülans faktörlerinden bir diğeri de tıbbi cihazların ve protez materyallerin abiyotik yüzeylerine olan afinitesi ve adezyonudur. Patojenitesi, konağın mukozal epitelyumuna yapışma kapasitesi ve biyofilm oluşturma yeteneğiyle ilişkilidir (Cavalheiro, Teixeira, 2018; Nemeth ve ark., 2013). Adezyon, konak hücre yüzeylerinde ve medikal cihazlarda kolonizasyonun başlamasını tetikleyen önemli bir etken olarak kabul edilmektedir (Ramage ve ark., 2006). Adezyon biyofilm oluşumunu başlatır ve maya hücrelerinin, konak hücrelerinin ekstraselüler matriksinde bulunan fibronektin, vikronektin ve laminin gibi spesifik proteinlere bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu etkileşimler, mikroorganizmanın çevresine bağlanma kapasitesini ve ardından biyofilm oluşumunu tetikleyerek, enfeksiyon sürecinde kilit bir rol oynamaktadır. (Kozik ve ark., 2015).

Fenotipik değişim, hidrolitik enzimlerin salgılanması, besin kazanımlarına yönelik adaptasyonlar, yağ asitleri ve prostaglandinlerin üretimi gibi virülans faktörleri de patojeniteye katkıda bulunmaktadır (Tóth ve ark 2019).

1.5.1 Adezyon ve Slime Üretimi

Adezyon süreci, mantar ve konak (biyotik veya abiyotik) hücreler arasındaki çeşitli faktörlere bağlı, önemli ve çok faktörlü bir süreçtir. Bu süreç, hücre yüzeyi hidrofobikliği, hücre duvarı bileşimi ve büyüme koşulları gibi mantar ve konak hücrelerin özelliklerini içerir (Silva. Negri, Henriques, Oliveira, 2011).

Maya hücrelerinin yapışması, mikroorganizma ve konak yüzeyleri arasındaki hidrofobik etkileşimlere büyük ölçüde bağlıdır. Hücre yüzeyi hidrofobikliği, özellikle polistiren/polieterüretan yüzeylerine ve epitelyal hücrelere yapışma ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. *Candida* türleri genellikle yüksek derecede hücre yüzeyi hidrofobisitesi sergiler (Chandra ve ark. 2005).

Adezyonda anahtar tetikleyici etkileşim, adezinler tarafından sağlanır. Bu süreç, mantar hücrelerinin diğer mikroorganizmalara, konak epiteline ve abiyotik yüzeylere bağlanmasını teşvik eder (Cavalheiro, Teixeira,2018). Adezyon sürecinin yanı sıra, slime üretimi de önemli bir faktördür ve bu süreç, *Candida* türlerinin biyofilm oluşturmasına katkıda bulunabilir. Bu nedenle, yapışma ve slime üretimi, *Candida* enfeksiyonlarının patogenezinde temel rol oynayan karmaşık bir etkileşim ağını oluşturur (Cavalheiro, Teixeira, 2018).

1.5.2 Hidrolitik Enzimlerin Salgılanması

Candida türleri, çeşitli hidrolitik enzimleri, özellikle salgılasal aspartil proteazlar (SAP'ler), lipazlar (LIP'ler) ve fosfolipazlar üretebilir ve salgılayabilir. Bu enzimlerin aktivitesi yapışma, hücre hasarı ve konak dokuların istilasına neden olmaktadır (Cavalheiro, Teixeira, 2018).

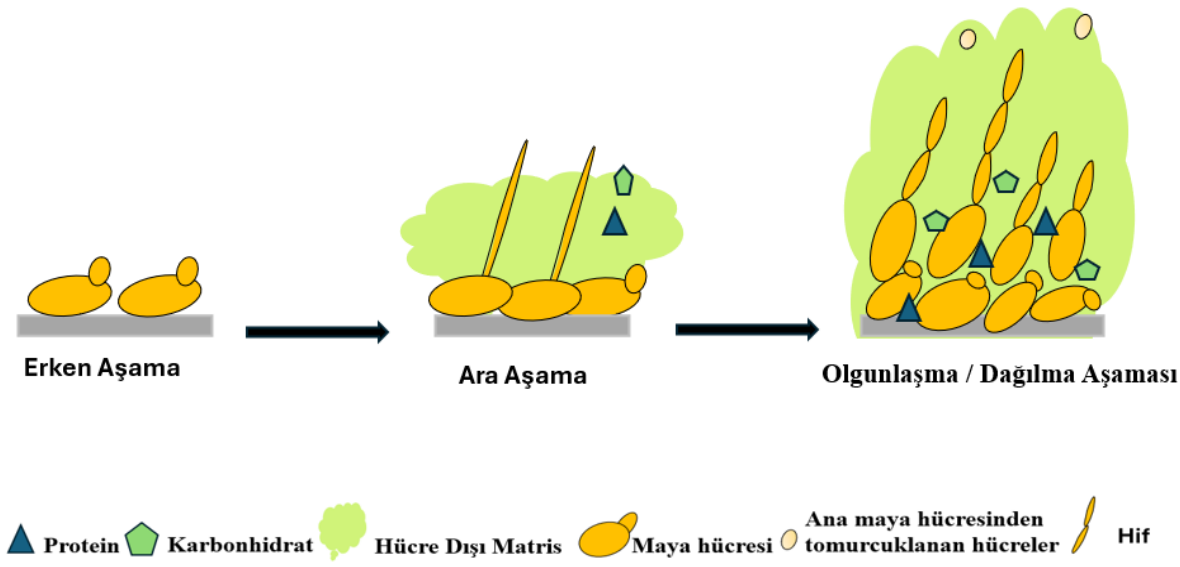
Candida hücreleri tarafından üretilen SAP'ler konak dokunun istilasını kolaylaştırır. *C. parapsilosis, C. albicans* ile karşılaştırıldığında daha düşük SAP aktivitesine sahiptir (Ruchel, Boning, Borg, 1986). Bugüne kadar, *C. parapsilosis*'te üç aspartil proteaz kodlayan genin (SAPP1'den SAPP3'e kadar) farklı izolatlar arasında geniş bir değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Horvath ve ark., 2012).

SAP'larla birlikte, lipazlar olarak sınıflandırılan enzimler de triasilgliserollerin hem hidrolizini hem de sentezini katalize eder. *C. parapsilosis* genomunda tanımlanan lipaz kodlayan DRT genin yalnızca ikisinin (LIP1 ve LIP2) fonksiyonel olarak aktif proteinleri kodlayabildiği doğrulanmıştır. LIP'lerin üretimi *C. parapsilosis* izolatları arasında önemli farklılıklar gösterse de bunların artan patojenitedeki rolleri doğrulanmıştır (Tosun ve ark., 2013). LIP'lerin besin alımı için lipitlerin sindirimi, yapışmanın ve biyofilm oluşumunun arttırılması sağlanmaktadır. Salgılanan fosfolipazlar fosfolipitleri ve yağ asitlerini hidrolize ederek yapışmayı kolaylaştırmaktadır (Gacser ve ark., 2007).

1.5.3 *C. parapsilosis* ve Biyofilm

Biyofilmler, polimerlerin hücre dışı matrikse gömülü yoğun bir mikrobiyal hücre ağından oluşan organize bir topluluk olarak tanımlanmıştır (Trofa ve ark., 2008). Biyofilm oluşumu, birçok *Candida* türü için güçlü bir virülans özelliği olarak kabul edilmektedir. *Candida* türlerinin etken olduğu vakalarda, biyofilm oluşturan türlerin oluşturmayanlara göre daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. (Mukherjee, Chandra, 2004).

Biyofilm gelişimi, erken aşama, ara aşama ve olgunlaşma/dağılma aşaması olmak üzere üç aşamadan oluşan bir süreçtir (Cavalheiro ve ark., 2018). Ara fazda, maya hücreleri başlangıçtaki yapışma sürecini takiben morfolojik bir geçiş geçirir ve bir popülasyon oluşturur (Şekil 1.3). Biyofilm olgunlaşması, polisakkaritler, proteinler, lipitler ve nükleik asitlerden oluşan polisakkarit bakımından zengin hücre dışı matriksin üretilmesi ve salgılanmasıyla başlar (Cavalheiro M ve ark., 2018; Chandre, Mukherje, 2015). *Candida* türlerinin biyofilmleri 38-72 saat içerisinde olgunlaşma evresine ulaşabilmektedir (Malinovská, Čonková, Váczi, 2023)



Şekil 1.3 Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm oluşumunun ilk kritik adımı, yapışmadır. Yapışma, adezinler ve spesifik amino asitlerin, şekerlerle epitel veya abiyotik yüzeylere bağlanmasıyla başlar. Adezinler, glikosil-fosfatidilinositol hücre duvarı proteinleri gibi karbonhidrat veya peptit bağlama alanlarını içeren moleküllerdir ve Aglutinin Benzeri Dizi (ALS) ailesine aittir. Candida türlerinde, biyofilm oluşumunda belirgin bir rol oynayan 8 ALS dizisi bilinmektedir. Yapışmadan sonra, biyofilm gelişimi morfolojik değişikliklerle birlikte hücre sayısında artışla devam eder (Cavalheiro ve ark., 2018). *C.parapsilosis* biyofilminin hücre dışı matrisi, karbonhidratlardan ve düşük seviyelerde proteinden oluşur ve blastokonidya ile psödohifadan meydana gelir. Oluşan biyofilmler, EPS (Ekstraselüler Polisakkarid) üretimine bağlı olarak hücrelerin kısmen hareketsiz olduğu jel benzeri bir yapı oluşturur. EPS, fagositoza karşı savunma, biyofilm bütünlüğü için iskele oluşturma ve ilaç difüzyonunu engelleme gibi çeşitli roller oynar (Silva ve ark., 2009; Kuhn, Chandra, Mukherjee, Ghannoum, 2002).

Biyofilm, gelişimini düzenleyici genler tarafından regüle edilir. Bu süreçte, Biyofilm ve Hücre Duvarı Düzenleyici 1 (BCR1), Beta-1,3-Glukan Sentaz Katalitik Alt Birimi 1 (FKS1) ve Gelişmiş Filamentli Büyüme Proteini 1 (EFG1) gibi genler önemli roller üstlenir. BCR1, *C. parapsilosis*'de biyofilm oluşumunun erken aşamalarında önemli bir rol oynar., EFG1C, biyofilm oluşumu ve hifal büyüme için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (Araújo, Henriques, Silva, 2017).

C. parapsilosis biyofilm gelişimi özellikle intravenöz kateter veya santral venöz kateter takılan hastalarda gözlenir (Shin ve ark., 2002). Biyofilm oluşturma yeteneği, sayesinde antifungal ajanlara karşı direnci artırarak virülans potansiyeli sağlar (Mitchell ve ark., 2015; Silva ve ark., 2017). Aynı zamanda, biyofilm gelişimi makrofaj fagositozunu ve antikor aktivitesini inhibe ederek immün sistemden kaçıcı kolaylaştırır (Mitchell ve ark., 2015).

1.5.4 *C.parapsilosis* Enfeksiyonları

C. parapsilosis, yüzeyel enfeksiyonlardan başlayarak onikomikoz, endokardit gibi invazif sistemik enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede hastalığa neden olabilen mikroorganizmadır. *C.parapsilosis* enfeksiyonları eksojen kaynaklı olup kolonizasyon sonrası enfeksiyon görülmektedir (Van ve ark 2009, Almirante ve ark.,2006; Kukhar ve ark., 2020).

Kandidemi, organ tutulumu olmaksızın enfeksiyon semptomları olan bir hastada en az bir veya daha fazla kan kültüründe *Candida* spp. üremesi olarak tanımlanır. *Candida* enfeksiyonlarının %10-20'sini oluşturmaktadır. Enfeksiyon konak faktörleri özellikle yenidoğan pediatrik hasta grubunda ve bağışıklık baskılanmış kişiler olarak saptanmıştır (González ve ark., 2013, Miranda, Rodrigues, Costa, 2012).

C. parapsilosis, kateterlere yapışarak biyofilm oluşturabildiğinden, özellikle yenidoğanlar ve invazif cihazlara ihtiyaç duyan bağışıklığı baskılanmış hastalarda invazif enfeksiyonlara neden olur. Yoğun bakım ünitesinde kalış, parenteral beslenme kateterle ilişkili enfeksiyon için risk faktörleri arasındadır (Yamin , Husin , Harun,2021).

Candida türleri arasında *C. albicans'*tan sonra endokarditte ikinci etken olarak *C. parapsilosis*'e rastlanmaktadır. Prostetik kalp kapakçıkları, intravenöz madde kullanımı ve intravenöz paranteral beslenme endokardit için risk faktörleridir (Garzoni, Nobre , 2007).

Peritonit, periton diyalizi uygulanan hastalarda sıkça görülen bir durumdur ve bu hastalarda diyaliz kateterlerinde *C. parapsilosis* enfeksiyonuna rastlanabilir. Bu enfeksiyonlar genellikle diyaliz kateterlerinin kullanımıyla ilişkilendirilmiştir (Van ve ark., 2009).

Artrit vakalarında ise, protez uygulaması sonrası *C. parapsilosis* enfeksiyonları sıklıkla görülebilmektedir. Bu enfeksiyonların, protezlerin yüzeylerine *C. parapsilosis* adezyonu sonucu oluşabileceği düşünülmektedir (Trofa ve ark., 2008)

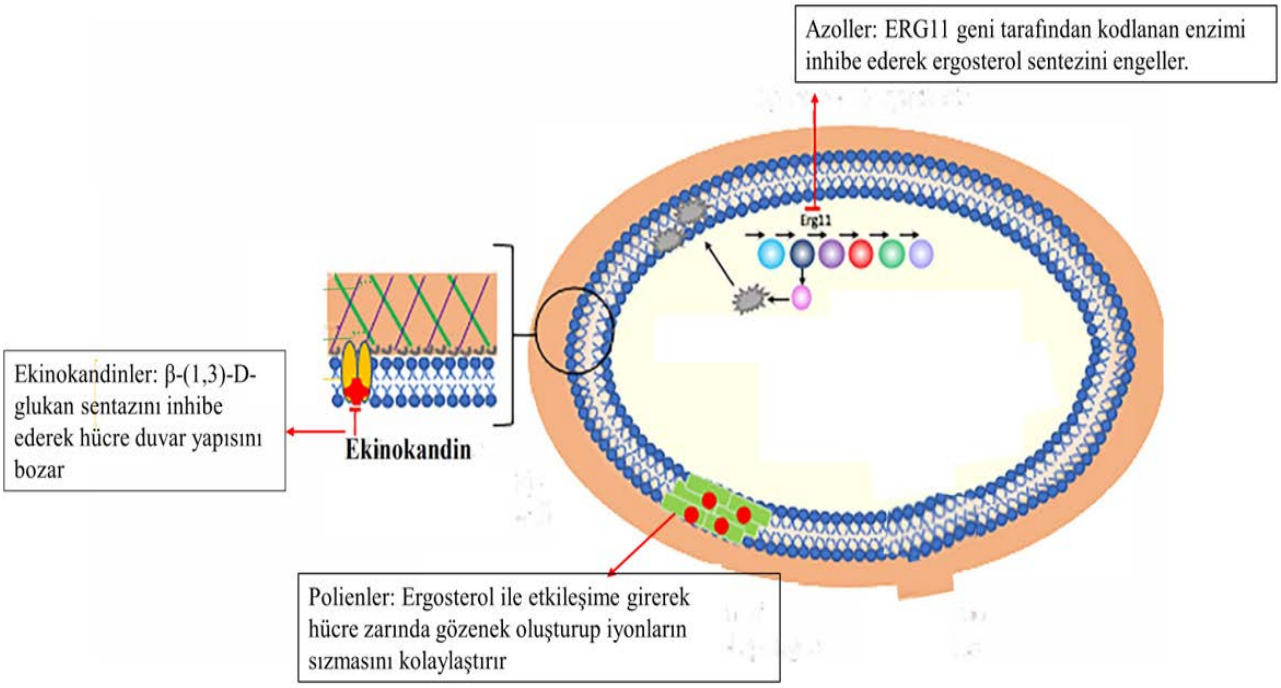
Yüzeyel ve mukozal enfeksiyonlarda, distal tırnak mikozları sıklıkla bu tür enfeksiyonların etkeni olarak tespit edilmiştir. Özellikle geçmişte travmatik yaralanmalar sonucu oluşan distrofik tırnaklar ve toprakla temas gibi risk faktörleri, onikomikoz gelişimi açısından önem arz etmektedir (Gautret P, 2000).)

1.5.5 *C. parapsilosis*'in Antifungallere Duyarlılığı

İnvazif kandidiyazis tedavisinde klinik uygulamada kullanılan sistemik antifungal ilaçlar, üç ana ilaç sınıfını içermektedir: polienler (örneğin amfoterisin-B), ekinokandinler (örneğin kaspofungin), ve azoller (örneğin flukonazol) (Murphy, Bicanic,2021).

Azol grubundaki ajanlar ERG11 geni tarafından kodlanan lanosterol 14α-demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini bozarlar. Bu hücre membranının yapı ve işlevinin bozulmasına yol açar. Ekinokandinler β-(1,3)-D-glukan sentez enzimini inhibe ederek mantar hücre duvar sentezini bozarlar. Amfoterisin B mantar hücre membranındaki sterollere bağlanır ve membranın yapı ve işlevini bozarak hücre ölümüne yol açar (Pappas, ve ark., 2018) (Şekil 1.4; Murphy ve ark., 2021'den uyarlanmıştır).

Mantar izolatlarının antifungal ilaçlara duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (*Clinical & Laboratory Standards Institute; CLS*I) veya Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ; EUCAST) tarafından belirlenen standartlar kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyonun (MIK) belirlenmesiyle ölçülür (Arendrup, Cuenca, Lass, Hope 2012; Cattana ve ark.,2017). Klinisyenlere tedavi seçimi konusunda rehberlik etmek için MIK önceden belirlenmiş klinik sınır değerleri ile karşılaştırılır ve izolat duyarlı, orta/duyarlı, doza bağımlı veya dirençli olarak sınıflandırılır.



Şekil 1.4 Antifungallerin etki mekanizmaları (Murphy SE. ve ark., 2021'den uyarlanmıştır)

1.5.5.1 Polienler

Amfoterisin B (AmB), polienler sınıfının en yaygın kullanılan üyesidir (Ben-Ami ve ark., 2021). AmB'nin güçlü fungisidal aktivitesi, mantar hücrelerinin ergosterol ile etkileşime girerek lipit çift katmanına bağlanması, hücre zarında gözenekler oluşturması ve hücre içi bileşenlerin, özellikle potasyum iyonları (K+), hücre dışına sızmasını kolaylaştırmasıyla ortaya çıkar (Carolus ve ark., 2020). Bu etkileşim, hücre geçirgenliğinde ciddi bir değişikliğe yol açar ve nihayetinde hücre lizisine sebep olur. Bu antifungal, düşük çözünürlüğe sahiptir ve ergosterol ile kolesterol arasındaki yakın yapısal benzerlik nedeniyle konak hücre için oldukça toksiktir. Bu durum, uzun süreli antifungal tedavi kullanımını sınırlamaktadır (Fanos, Cataldi, 2000). Günümüzde, lipozomal amfoterisin B (LAmB) dahil olmak üzere daha az toksik, lipid tabanlı polien formülasyonları geliştirilmiştir. Böylece invazif mantar enfeksiyonlarının birinci basamak tedavisi haline gelmiştir (Groll ve ark., 2019). Polienlere karşı mantar direnci nadir görülür. Çoğu *Candida* türü AmB'ye karşı duyarlıdır (Lockhart ve ark., 2012).

Son zamanlarda yapılan küresel meta-analiz sonuçları *C. parapsilosis'in* AMB direncinin %1,3 olduğunu tahmin etmektedir (Yamin ve ark., 2022). Yapılan çalışmalarda AMB direnci oran %2 ile %2,7 arasında değişmektedir (Chakrabarti ve ark 2015, Adam ve ark 2021, Alhatmi ve ark 2022). Bu oran merkezimizde %2,6'dir (Alci ve ark., 2022).

1.5.5.2 Ekinokandinler

Ekinokandinler: kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin, invazif mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan yeni antifungal ilaç sınıfını oluşturur ve yüksek fungisidal aktiviteyle birlikte daha iyi bir güvenlik profili sunar (Denning 2003; Pappas ve ark., 2016).

Ekinokandin sınıfına ait olan ajanlar, mantar hücre duvarlarının önemli bir yapısal bileşeni olan β-(1,3)-D-glukan sentazını inhibe ederler (Chen . Slavin, Sorrell 2011; Beyda, Lewis,Garey,2012). β-(1,3)-D-glukanın sentezinden sorumlu olan genlerin silinmesi veya mutasyonuyla antifungal ajanın hedef değişikliğine yol açarak direnç gelişmektedir. Ekinokandinler, özellikle FKS1 ve FKS2 genleri tarafından kodlanan β-D-glukan sentazın katalitik alt birimleri FKS1'i hedef alarak çoğu tür için hücre duvarı glukanının bozulmasına, ozmotik dengesizliğe, hücre lizisine neden olurlar (Pfaller ve ark, 2011; Davari ve ark.,2020). Antifungal spektrumları sınırlı olmasına rağmen, ekinokandinler, azol dirençli suşlar ve biyofilm dahil olmak üzere çoğu *Candida* türüne karşı fungisidal etki gösterirler (Perlin, 2011).

Potansiyel tedavi başarısızlığını önlemek için fenotipik antifungal duyarlılık testi rutin olarak yapılır. Standartlaştırılmış koşullar altında, mikrodilüsyon yöntemiyle duyarlılık testi yapılırken, "paradoksal etki" adı verilen şaşırtıcı ekinokandine özgü bir fenomen gözlemlenebilir. Bu paradoksal etki, belirli suşların daha yüksek ekinokandin konsantrasyonları (yaklaşık 4 ila 32 µg/mL) varlığında üreyebilmeleri ve daha düşük konsantrasyonlarda (yaklaşık 0,03 ila 1 µg/mL) tamamen duyarlı olmaları ile karakterizedir. Çok yüksek konsantrasyonların varlığında (yaklaşık >64 µg/mL), paradoksal etki gösteren mantar türleri yeniden duyarlı hale gelebilir. Paradoksal etkileri açıklayan kesin mekanizmalar henüz bilinmemektedir ancak bu etkinin FKS gen mutasyonlarıyla ilişkili olmadığı aksine hücre duvarının bir başka bileşeni olan kitin sentezindeki artışlarla

etkileşimli mekanizmalara bağlı olduğu bildirilmiştir (Wagener ve ark., 2017, Chamilos ve ark., 2007, Stevens ve ark., 2006).

Ekinokandinler arasında kaspofungin paradoksal etkisi *Candida* türleri arasında %16 olarak gözlendiği bildirilmiştir (Marcos-Zambrano ve ark., 2016). Bu nedenle, antifungal tedavi seçeneklerini ve antifungal duyarlılık sonuçlarını değerlendirirken paradoksal etki dikkate alınmalıdır.

Ekinokandin sınıfı antifungallerin yaygın kullanımıyla birlikte *Candida* türleri arasında ekinokandine direnç gelişme eğilimi gösterilmiştir. Ekinokandine dirençli ve çoklu ilaç direnci gösteren *C. parapsilosis* suşları 2020 yılından bu yana yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir, (Liang ve ark., 2022; Arastehfar ve ark., 2021; Ning, Xiao, Perlin 2023). Bir çalışmada ekinokandin sınıfından en sık kullanılan kaspofungine karşı direnç oranı %6 rapor edilmiştir (Chen XC ve ark 2020). Bu oran, merkezimizde %5,2 olarak belirlenmiştir (Alci ve ark., 2022).

1.5.5.3 Azoller

Azoller, klinik kullanımda geniş spektrumları, güvenlik profilleri ve biyoyararlanımları nedeniyle büyük bir öneme sahiptir (Ben-Ami, Kontoyiannis, 2021; Pristoy ve ark., 2019). Flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itrakonazol ve izavukonazol, klinik olarak onaylanmış azoller arasında yer almaktadır. Azoller fungistatik aktivite gösterirler (Robbins,Captan,Cowen., 2017). Azoller ergosterol biyosentezinde kilit bir rol oynayan lanosterol 14a-demetilaz enzimini (mayalarda ERG11 geni tarafından kodlanan) inhibe ederek, mantar hücre zarının önemli bir bileşeni olan ergosterolün sentezini engellerler (Cowen ve ark., 2014; Castanheira ve ark.,2020). Ergosterol sentezinin engellenmesiyle toksik 14α-metil sterol birikimine neden olur, bu da membran bütünlüğünü bozar ve ayrıca hücre duvarı sentezinde rol oynayan membrana bağlı bazı proteinlerin işlevini etkiler (Odds, Brown, Gow 2003).

Candida türlerinde azol direnci, tedavi açısından önemli bir zorluk oluşturur. Azol direnci, ERG11 kodlayan gen mutasyonları, ERG3'teki işlev kaybı noktası mutasyonları, CDR1, CDR2 (*Candida* ilaç direnci) ve MDR1 (çoklu ilaç direnci) genlerinin

ekspresyonunun artması gibi farklı moleküler mekanizmalarla ilişkilidir (Grossman ve ark.,2015; Sanglard, Odds, 2002; Pfaller ve ark., 2012).

Son yıllarda, flukonazole dirençli *C. parapsilosis* 'in oranlarında artışı bildirilmiştir (Arastehfar ve ark., 2020). Flukonazol dirençli *C. parapsilosis* prevalansı son yıllarda bazı Avrupa ülkelerinde % 22 ile %37 (Lass, Krause, Willinger,2020; Mesini ve ark.; 2020, Routsi ve ark., 2022) oranlarında değişirken ülkemizde bildirilen oranlar %13,3 ile %50 arasındadır (Demirci ve ark., 2021; Mete ve ark 2021). Bu oran 2017-2021 yılları arasında merkezimizde %25,4'tür (Alci ve ark., 2022).

1.6 Probiyotikler

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) probiyotikleri konağa sağlık açısından faydalı etkiler sağlayan aktif mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Hill ve ark., 2014). Esas olarak bakterilerden oluşan ancak aynı zamanda mayaları da içeren bu mikroorganizmalar, fermente gıdalarda doğal olarak bulunur, diğer gıda ürünlerine eklenebilmekte ve besin takviyesi olarak temin edilebilmektedir. Probiyotik ürünlerde en sık kullanılan mikroorganizmaların yedi temel cinsi *Lactobacillus, Bifidobacterium, Saccharomyces, Streptococcus, Enterococcus, Escherichia* ve *Bacillus'tur* (Hill ve ark., 2014).

Probiyotikler aynı zamanda spesifik olmayan, türe özgü ve suşa özgü sağlık etkileri gösterir *(*Hill C ve ark., 2014). Bu etkiler, gastrointestinal sistemde patojenik mikroorganizmaların çoğalmasının engellenmesini (kolonizasyon direncini teşvik ederek, bağırsak geçişini iyileştirerek veya bozulmuş bir mikrobiyotayı normalleştirmeye yardımcı olarak), biyoaktif metabolitlerin üretimini (örneğin, kısa zincirli yağ asitleri) ve luminal içeriğin azaltılmasını içerir. Tüm bu etkileri sayesinde probiyotiklerin insan sağlığı ve hastalıkları üzerinde geniş kapsamlı etkileri olabilir (DSÖ, Probiyotik ve Prebiyotikler, Erişim Tarihi: 04.04.2024).

Bu mikroorganizmalar, anti-kanserojen, antioksidan ve anti-mutajenik maddeler üretebilme kapasiteleri ile çeşitli enfeksiyonlara, örneğin diyare ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı koruyucu olabilirler. Probiyotikler, tedavinin etkinliğini artırmak ve sağlık açısından önemli faydalar sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Hill ve ark., 2014).

Uzman kuruluşlar, sağlıklı bireylerin probiyotik kullanımına ilişkin net bir tavsiyede bulunmamaktadır. DSÖ, optimal probiyotik dozunun türe ve ürüne bağlı olduğunu belirtmektedir. (DSÖ, Probiyotik ve Prebiyotikler, Erişim Tarihi: 04.04.2024).

Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Birliği, üreticilere, her bir suş için ideal olan toplam koloni oluşturan birim (kob) sayısını, ürün etiketinde son kullanma tarihi veya son kullanım tarihinde belirtmelerini tavsiye etmektedir (Marco ve ark., 2021).

1.6.1 Probiyotik *Saccharomyces cerevisiae*

Probiyotik ürünlerde bulunan mikroorganizmaların çoğu bakteriyel kökenlidir; maya türlerinden *Saccharomyces* mayası bulunmaktadır. Bakteriyel probiyotiklerle ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, maya kökenli probiyotiklerle ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Bakteriyel probiyotiklerle ilgili artan endişelerden biri, bu organizmaların direnç genlerini patojenik bakterilere aktarabilme yetenekleridir (Shruthi ve ark., 2022). Bu endişe nedeniyle son yıllarda, *Saccharomyce*s ve diğer mayalar umut verici probiyotik adayları haline gelmiştir. Bu yeni mikroorganizmalar genellikle geleneksel fermente gıdalardan, içeceklerden ve diğer kaynaklardan izole edilmektedir. *Saccharomyces* kültürleri ve türleri genellikle sağlık riski oluşturmazlar ve bu nedenle genel olarak güvenli organizmalar olarak kabul edilirler (Fernández ve ark., 2021). Türkiye Probiyotik Rehberi'nde, *Saccharomyces* spp. nin çeşitli suşları, özellikle İrritabl Barsak Sendromu (İBS) ve çeşitli hastalıklar için önerilmektedir (Türkiye Probiyotik Rehberi, Ürünler, Erişim tarihi 20 Nisan 2024) (Tablo 1.3).

Tablo 1.3 Türkiye Probiyotik Rehberi, Önerilen probiyotik *Saccharomyces spp.* ve destek kullanım alanları

Suş Adı ve No	**Destek Kullanım Alanı**
Saccharomyces boulardii CNCM I-3799	-İBH (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı) -İBS (İritable Barsak Sendromu) -İmmün sistemi desteklemek -Sindirim sistemini düzenlemek -Akut Diyare
Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856	-Gastrointestinal sistem desteği -İBS

Suş Adı ve No	**Destek Kullanım Alanı**
Saccharomyces boulardii CNCM I-745	-Antibiyotik kullanımından kaynaklanan diyare gibi sindirim sistemi bozukluklarının önlenemesi ve tedavisi -Enfeksiyöz ve non-spesifik diyarenin tedavisi -Seyahate bağlı turist diyaresinin önlenmesi ve tedavisi - *Clostridium difficile* hastalığının reküransının önlenmesi

S. cerevisiae, probiyotik maya türleri arasında öne çıkan bir ökaryotik organizmadır uygun maliyetli ve besin katkı maddesi olarak kullanılan bir maya türüdür (McFarland ve ark., 2010).

S. cerevisiae, çeşitli biyoaktif bileşiklerin üretimi nedeniyle önem kazanmıştır (Lazo-Vélez ve ark., 2018). Ayrıca, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan önemli bir antioksidan olan glutatyonun oluşumundan da sorumludur (Badr H., 2021). *S. cerevisiae'*nin inaktive edilmiş hücreleri, probiyotik yem takviyelerinde zengin bir protein kaynağı olarak kullanılmaktadır.

S. cerevisiae, hücresi oval, 2,5–10,5 µm uzunluğundır ve tomurcuklanarak eşeysiz veya eşeyli olarak çoğalabilir (Ansari ve ark., 2021). *S. cerevisiae*, hücre duvarı, iç polisakkarit katmanından oluşurken, dış katman manno proteinlerden oluşur. Hücre duvarı glikoz-glikoz etkileşimi, β-1,3 ve β-1,6 bağlantılarını içermektedir (Lee D.H., Erişim: 08.02.24).

S. cerevisiae, zengin besin içeriği ve biyolojik etkileri nedeniyle önemli bir besin kaynağı olarak kabul edilmektedir. İçerdiği mineraller arasında demir, manganez, bakır, ferrik, manganik sülfat ve bakır asetat gibi minerallere bulunmaktadır (Łukaszewicz, 2012). Bu maya, enerji seviyelerini artırma potansiyeline sahip olup, bu özelliğini özellikle içerdiği amino asitler, biyotin, doksin, tiamin, B12 vitamini ve riboflavin gibi B vitaminleri ile sağlamaktadır. Ayrıca, anti-besleyici fitat düzeylerini azaltma ve folat sentezini artırma kapasitesine sahiptir. *S. cerevisiae*'nin glikoz duyarlılığını artırarak tırnak ve saç uzamasını

destekleyebileceği ve enfeksiyonlara karşı koruyucu olabileceği belirtilmiştir (Lazo-Vélez ve ark., 2012).

Son yıllarda, *S. cerevisiae*'nin probiyotik olarak kullanımı özellikle bağırsakla ilişkili hastalıkların tedavisine odaklanmıştır. Klinik çalışmalar, *S. cerevisiae*'nin çeşitli gastrointestinal hastalıkları tedavi edebileceğini göstermektedir. Bu hastalıklar arasında turist ishali, AIDS ile ilişkili ishal, antibiyotikle ilişkili ishal, *Clostridium difficile* ile ilişkili sendrom, İrritabl huzursuz bağırsak sendromu ve Crohn hastalığı bulunmaktadır. *S. cerevisiae* hücreleri, mide ve bağırsak duvarlarına yapışma yeteneğine sahiptir (Tung ve ark., 2009; Tomičić ve ark., 2016; Simren ve ark., 2010). *S. cerevisiae*'nin antineoplastik etkileri de rapor edilmiştir. Ağız yoluyla uygulanan bu maya, EGFR-ERK ve EGFR-AKT yollarını baskılayarak tümör hücrelerinde apoptozu artırabilir ve bağırsak neoplazisinin önlenmesine katkıda bulunabilir (Chen ve ark., 2009). Antibiyotiklere bağlı ishalde *S. cerevisiae*'nin etkili olabileceği ve Crohn hastalığı olan hastalarda kronik geçirgenliğe karşı etkili olabileceği bildirilmiştir (Garcia ve ark., 2008; Kelesidis, Pothoulakis 2012).

S. cerevisiae 'nin çeşitli endüstriyel süreçlerde önemli rol oynayan çeşitli enzimleri üretebilmektedir. Özellikle maltaz ve invertaz gibi bazı aktif enzimler, gıda endüstrisinde fermente ürünlerin lezzetini artırma potansiyeline sahiptir. *S. cerevisiae*, bağırsak enzimleri arasında amilaz, proteaz, selülaz ve lipaz üretebilir, ancak galaktosidaz, DNAz ve jelatinaz sentezleme yeteneğine sahip değildir. Hücre dışı proteaz enzimleri içermesi ve hücre yüzeyinin hidrofobik olması nedeniyle antibakteriyel özelliklere sahiptir (Cosme, Inês, Vilela. 2022).

S. cerevisiae, bağırsak hücrelerini tetikleyen poliamin üretimini arttırdığı belirtilmiştir. Hücre yüzeyi hidrofobikliği sayesinde *S. cerevisiae* insan bağırsağının hücre duvarına bağlanmayı sağlar. Etanol üretebilme yeteneği sayesinde patojenik bakteri suşlarını konağın vücudundan dışkı yoluyla uzaklaştırabilir (Tomičić ve ark., 2016).

Saccharomyces spp.'nin farklı suşları, *S. boulardii, S. cerevisiae* ve *S. unisporus*, antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahiptir. Bu suşlar, farklı gıda takviyelerinin probiyotik potansiyelini artırmak için kullanılmıştır (Staniszewski ve ark., 2021).

Son zamanlarda, antimikrobiyal dirençteki artış nedeniyle probiyotiklerin, özellikle *S. cerevisiae* 'nin bakteriyel ve fungal enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir yöntem olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır. Bu mayaların probiyotik potansiyelini daha iyi anlamak için kapsamlı incelemelere ihtiyaç vardır.

1.6.2 Probiyotik *Saccharomyces cerevisiae*'nın *Candida* üzerine etkileri

Fermente gıdalar, insan sağlığına fayda sağlayan mikroorganizmalar açısından zengin kaynaklardır ve güvenlilikleri, yüzyıllar boyunca fermente edilmiş yiyecek ve içeceklerin tüketilmesiyle kanıtlanmıştır. Fermente gıdalardaki probiyotik mikroorganizmaların, biyoyararlılığı artırma, raf ömrünü iyileştirme, antioksidan, anti tümöral ve antimikrobiyal bileşikleri zenginleştirme potansiyeli, son yıllarda probiyotik mikroorganizmanın patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon tedavilerinde terapötik ajan olarak kullanılma olasılığını ortaya çıkaran yeni bir araştırma konusu olmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotiklerin enfeksiyona yol açan patojenlerin metabolik süreçlerini etkileyebildiğini ve dolayısıyla hastalığa karşı bir tür koruma sağlayabildiğini göstermektedir (Ravel ve ark.,2011; Sivignon ve ark.,2014). Ek olarak probiyotiklerin uygulanması, inflamasyonun kontrolü ve epitel bariyerinin korunmasında önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (Sivignon ve ark.,2014).

İnvazif *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde polienler, ekinokandinler ve azoller gibi az sayıda antifungal sınıf kullanılmaktadır. Son yıllarda, tedavi için sınırlı sayıda kullanılan bu antifungallere karşı direnç gelişmekte ve bu durum halk sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır. Uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süre hastanede yatış ve konağa bağlı diğer faktörler, mikrobiyotanın bozulmasına ve *Candida* türlerinin aşırı çoğalmasına yol açabilmektedir (Daneshnia ve ark., 2023).

Antifungal ajanlara karşı direncin artışı ve bu ajanların yan etkilerinden kaynaklanan komplikasyonlar, araştırmacıları tedaviye yardımcı ve alternatif yaklaşımlar arayışına yöneltmiştir. Yapılan çalışmalar probiyotiklerin gastrointestinal sistem bozukluklarına (*E. coli* kaynaklı turist ishali, *C. difficile* enfeksiyonları, *Helicobacter pylori*, vb.) karşı potansiyel tedavi etkilerini ortaya koymaktadır. Yapılan araştırmalar, probiyotik mayaların *Candida* enfeksiyonu ile ilişkili komplikasyonları iyileştirebileceğini göstermektedir (Thyab

ve ark.,2020; McFarland ve ark. 2006; Kaźmierczak ve ark., 2020) Ancak, bu probiyotik mayaların özellikle canlı konak bağlamında *Candida* türleri ile etkileşimleri hakkında yeterli literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Kunyeit ve ark. (2020), *C. albicans* ve NAC türleri için *S. cerevisiae*'nin tedavi etkinliğini araştırdığı bir çalışmada, *C. parapsilosis* adezyonunda %34'lük bir azalma bildirmişlerdir. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda, gıda kaynaklı mayaların patojenik *Candida* türlerine karşı etkili probiyotikler olarak işlev gördüğünü, probiyotik mayaların yapışmayı engellediğini, biyofilm metabolik aktivitesini azalttığını ve bu şekilde kolonizasyonu kontrol ettiğini belirtmişlerdir. (Kunyeit ve ark., 2020)

Pericolini ve ark. 2017 yılında yayınlanan çalışmalarında *in-vivo* vajinal kandidiyazis fare modellerinde *S. cerevisiae'* nin etkisini araştırmışlardır. *S. cerevisiae* 'nin vajinal kandidiyazis tedavisinde mantarın vajinadan temizlenmesini hızlandırdığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *S. cerevisiae* terapötik bir seçenek olarak önerilmiştir (Pericolini ve ark., 2017).

Sabbatini ve ark. 2020 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise bakteriyal vaijnoz tedavisinde *S. cerevisiae*' nin patojenin vajinal epitele yapışmasını engelleyebildiğini ve patojen yükünü azaltarak biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. (Sabbatini ve ark., 2020)

İnvazif *Candida* enfeksiyonlarında, özellikle biyofilm ilişkili enfeksiyonda probiyotik mayaların etkilerine ilişkin fazla araştırılmaya ihtiyaç vardır. Yapılan araştırmalar, probiyotiklerin metabolitlerinin insan sağlığı ve hastalıklarında önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Ancak bu metabolitlerin kökeni tam olarak tanımlanmamıştır, Candida kaynaklı enfeksiyonunun klinik belirtileri üzerindeki etkilerinin incelenmesi konusundaki çalışmalar devam etmektedir.

2 AMAÇ

Candida türleri yoğun bakım üniteleri ve diğer kliniklerde en sık rastlanan mantar enfeksiyonu etkenidir. *C. albicans* genellikle tüm merkezlerde en sık izole edilen *Candida* türüdür. Son yıllarda *C. albicans'a* göre NAC türlerinin izolasyonunun arttığı bildirilmektedir (Paramythiotou ve ark 2014, Toth R ve ark 2019) NAC türlerinin sıklığı merkezler arası farklılık göstermekle birlikte, hastanemizde izole edilen maya türleri arasında *C. albicans* 'tan sonra ikinci sıklıkta enfeksiyon etkeni olarak *C. parapsilosis* saptanmıştır (Alci ve ark., 2020) .

C.parapsilosis kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonları (kandidemi) hastanede yatış süresini uzatır, yüksek maaliyete ve mortalite oranının artmasına neden olmaktadır. Kandidemi tedavisinde kullanılan antifungal ajanlara karşı artan direnç, mantar enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif yöntemler arayan araştırmaların artışına yol açmıştır (Rossoni ve ark., 2014; Ribeiro ve ark., 2017; Caldara ve ark., 2018). Son yıllarda *Candida* enfeksiyonlarında alternatif tedavi yaklaşımı olarak probiyotiklerin kullanımı gündeme gelmiştir. Probiyotiklerin patojenik mikroorganizmaların enfeksiyonunu inhibe ettiğine dair çalışmalar bildirilmiştir (Spurbeck ve ark 2010, Carmo ve ark 2016). Türk Probiyotik rehberinde *S. cerevisiae* suşu birçok hastalık için önerilmekte ve ticari firmalarca satılmaktadır (Türkiye Probiyotik Rehberi).

Probiyotik mayaların*, C. albicans* ve albicans dışı *Candida* türlerinden oluşan mantar biyofilmlerine karşı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar maya metabolitlerinin *in-vitro* adezyon ve/veya morfolojik geçişi inhibe etmede rol oynadığını göstermiştir (Kunyeit ve ark., 2019; Kunyeit ve ark., 2020). Bu çalışmalar ışığında *S. cerevisiae'nın*, uygulanan tedavi protokollerine dahil edilerek enfeksiyon seyrini değiştirebileceği gösterilmiştir.

S. cerevisiae'nin C. parapsilosis in vivo kandidemi tedavisi üzerindeki etkisi ve *in-vitro* biyofilme olan etkisinin sonuçlarını içeren çalışma bulunmamaktadır. Günümüzde, önemli bir hastane enfeksiyon etkeni olan *C. parapsilosis*' e direnç oranları artması nedeniyle yeni tedavi stratejilerinin ve yeni antifungallerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle antifungal etkiyi arttırabilecek veya sinerjik etki oluşturabilecek alternatif yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır. *C.parapsilosis* biyofilmi veya *C. parapsilosis* kaynaklı

kandidemi tedavisine yönelik yapılan araştırmalarda çeşitli probiyotikler denenmesine rağmen, *S. cerevisiae* antifungal kombinasyonu kullanılarak yapılan bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada bir probiyotik olan *S. cerevisiae*'nın *C. parapsilosis* kandidemisine olan etkisinin *in-vivo* deneysel fare modelinde ve *C. parapsilosis* biyofilmi üzerinde etkisinin *in-vitro* testlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu hipoteze yönelik aşağıdaki soruların cevabını araştırmak hedeflenmiştir:

1. *S. cerevisiae'* nın *C. parapsilosis* biyofilmine inhibisyon etkisi var mıdır?

2. *S. cerevisiae'*nin *C parapsilosis* biyofilmine inhibisyon etkisi var ise, bu inhibisyonun farklı zamanlardaki etkisi nedir?

3. *S. cerevisiae'* nın antifungal ile birlikte uygulandığında *C. parapsilosis* biyofilmine etkisi nedir?

4. Deneysel *C. parapsilosis* kandidemi fare modelinde, *S. cerevisiae*'nın enfeksiyon oluşturulmadan önce veya antifungal tedavi ile aynı anda farelere uygulanması antifungal tedavi sonucunu nasıl etkilemektedir?

3 YÖNTEM

3.1 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açıcından incelenmiş olup KOÜ HADYEK 5/2-2022 karar numarasıyla 26.10.2022 tarihinde araştırmanın yürütülmesi etik açıdan uygun bulunmuştur. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından KOÜ BAPSIS- 3222 numaralı proje koduyla desteklenmiştir.

3.2 Kullanılan Malzemeler

3.2.1 Besiyerleri

- RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- Yeast Peptone Dextrose Agar (Becton Dickinson, Almanya)
- Sabouraud Dextrose Agar SDA (Oxoid, İngiltere)
- Mısır Unlu Agar (Oxoid, İngiltere)

3.2.2 Kimyasal Maddeler

- MOPS (Sigma -Aldrich, USA)
- Kristal Viyole (Merck, Almanya)
- PBS (Sigma -Aldrich, Almanya)
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- Hidroklorik asit (HCl)
- Flukonazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amfoterisin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Caspofungin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ketamin (Richterpharma, Austurya)
- Ksilozin (Richterpharma, Austurya)
- AmBisome- 50 mg (GILEAD, ABD)
- Fungidas- 70 mg (Koçak Farma, Türkiye)
- FLUKOL- 100 mg (Polifarma, Türkiye)

- DMSO (dimetil sülfoksit) (Merck, ABD)
- Tween 80 (Sigma -Aldrich, Almanya)

3.2.3 Kullanılan Cihazlar

- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe, Türkiye)
- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Etüv (Memmert, Almanya)
- Çalkalayıcı etüv (Labnet, ABD)
- Otoklav (Nüve- OT 020, Türkiye)
- Vorteks (Ika, Almanya)
- Hassas Terazi (Sartorius, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Nüve NS 108, Türkiye)
- Santrifüj (Eppendorf, Almanya)
- ELISA plak okuyucu (Alisei, İtalya)

3.2.4 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Steril 0.22 um şırınga ucu filtre
- Enjektör 1cc (insulin enjektörü)
- Enjektör 50 ml
- Bistüri ucu (no 21 ve 23)
- Pipet (100, 200 ve 1000 ul)
- Pipet ucu- filtreli- şeffaf- 1000 ul -
- Pipet ucu- filtreli- şeffaf 200 ul
- Pipet ucu- filtreli- şeffaf 10 ul
- Eppendorf tüpü, 2ml
- 10 ul plastik mavi kalibre öze
- Halka Öze (Metal)
- Parafilm
- Steril besiyeri
- 50 ml falkon
- 10 ml falkon

- Hücre filtresi.
- Steril petri,
- 96 kuyucuklu ELISA plakları

3.2.5 Çalışmada Kullanılan Suşlar

Çalışmamızda *American Type Culture Collection (ATCC*) standart suş *Candida parapsilosis ATCC 22019* ve probiyotik olarak *Saccharomyces cerevisiae ATAFM-2021* suşları kullanılmıştır.

3.3 *İn-Vitro* Yöntem

3.3.1 Besiyerleri ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1.1 RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) Besiyeri

Çalışmamızda biyofilm deneylerinde L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız ve fenol kırmızısı içermeyen toz halinde RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Sigma - Aldrich, Almanya) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri pH derecesinin 7,0 olarak ayarlanmasında 1 M NaOH çözeltisi ve 1N HCl kullanılmıştır. Daha sonra, 0,22 μm'lik filtreden geçirilip sterilize edilmiştir.

Formül (200 ml için)

RPMI toz	2,2 gr
Tampon Çözeltisi MOPS (Sigma -Aldrich, ABD)	6,9 gr

3.3.1.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) Besiyeri

Çalışmamızda *C. parapsilosis*'ın üremesi ve saflaştırılmasında uygun besiyerlerinden biri olan Yeast Peptone Dextrose (YPD) besiyeri kullanılmıştır. YPD broth (Becton Dickinson, Almanya) üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır

Formül (1000 ml için):

Maya Ekstresi	10,0 g
Pepton	20,0 g
Dekstroz	20,0 g

3.3.1.3 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Çalışmamızda in vivo aşamasında, örneklerin kültüründe *C. parapsilosis*'ın üremesi için antibiyotikli (%0,0001gentamisin, %0,01 kloramfenikol) Sabouraud Dextrose Agar (SDA), (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır ve üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Formül (1000 ml için):

SDA Toz	65 gr
Distile Su	1000 ml

3.3.1.4 Mısır Unlu-Tween 80 Agar

Mısır Unlu Agar, (Oxoid, İngiltere)i 8,5 gr 495 ml distile su ile karıştırılarak ,121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Besiyeri, 50-55 °C'ye kadar soğutulmuş ve ardından %1 oranında (5 ml) Tween 80 (Sigma -Aldrich, Almanya) eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri, 9 cm çapındaki steril petrilere dökülmüş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

3.3.1.5 Phosphate Buffered Saline (PBS) Hazırlanması

Çalışmamızda Phospate Buffered Saline (Sigma -Aldrich, Almanya) tablet olarak kullanılmıştır. Fosfat tampon elde etmek için 1 tablet 200 ml steril distile su içinde çözülmüştür. Hazırlanan PBS tampon +4 ºC'de saklanmıştır.

3.3.2 Antifungal Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmamızda antifungallerin standart toz formları Flukonazol (Sigma-Aldrich, USA), Amfoterisin B (Sigma-Aldrich, USA), Kaspofungin (Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır. Antifungallerin standart toz formlarından 10 mg/ml'lik stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyonların hazırlanmasında Tablo 3.1'deki çözücüler kullanılmıştır.

Tablo 3.1 Antifungal ajanların stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler

Antifungal	**Çözücü**
Flukonazol	Metanol
Amfoterisin B	DMSO
Kaspofungin	DMSO

Stok çözeltilerinin hazırlanması için kullanılacak antifungal miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

Ağırlık (mg) = (hacim (ml) x konsantrasyon (µg/ml))/potens (µg/mg)

Antifungallerin konsantrasyon ve duyarlılık aralıkları CLSI tarafından önerilen M27-A3 rehberi kullanılarak belirlenmiştir (Rex JH, 2008). Antifungal ajanların konsantrasyon aralıkları aşağıdaki Tablo 3.2' te belirtilen konsantrasyon aralıkları çalışılmıştır.

Tablo 3.2 Kullanılan antifungal ajanların konsantrasyon aralıkları

Antifungal	**Konsantrasyon aralığı (µg/ml)**
Flukonazol	0,125-64
Amfoterisin B	0,03-16
Kaspofungin	0,0015-8

3.3.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antifungal duyarlılık testinde, 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikroplaklar kullanılmıştır (Lp Italıana, İtalya). CLSI tarafından önerilen M27-A3 kılavuzuna göre mikrodilüsyon yöntemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile öncelikle biyofilm oluşmadan önceki (planktonik) minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) saptanmıştır. Mikroplak kuyucuklarında, kontrol kuyucuğu ile kıyaslandığında, %50 oranında azalma gösteren MİK değeri MİK50 olarak belirlenmiştir, amfoterisin B için üremenin %100 oranda inhibe olduğu kuyucuk MİK olarak belirlenmiştir (Rex JH, 2008).

Mikroorganizmaların 0,5 McFarland ($1x10^6$-$5x10^6$ kob/mL) bulanıklığındaki süspansiyonundan, RPMI besiyeri içerisinde önce 1/50 ardından 1/20 oranında tekrar dilüe edilerek son inokülüm oranı. $1x10^3$-$5x10^3$ kob/mL olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan antifungal içeren kuyucuklara 100'er µl konulmuştur, aynı süspansiyondan pozitif kontrol için antifungal içermeyen kuyucuk, negatif kontrol olarak da RPMI besiyeri kullanılmıştır. Plaklar 37 °C'de, amfoterisin B, flukonazol için 48 saat, kaspofungin için 24 saat inkübasyon sonrası sonuçlar sübjektif olarak deneyimli bir göz ile değerlendirilmiştir.

3.3.4 Zamana Bağlı Üreme Eğrisi

Probiyotiğin *C. parapsilosis* üremesine olan etkisi araştırmak için zamana bağlı üreme eğrisi çalışılmıştır *S. cerevisiae* ve *C. parapsilosis* suşları, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerinde falkon tüpleri kullanılarak hazırlanmıştır. Falkon tüplerindeki mikroorganizma son konsantrasyonları *C. parapsilosis* için 1,0 x 10^6 kob/ml, *S. cerevisiae* için 1,0 x 10^8 kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deney grupları aşağıdaki gibi tasarlanmıştır:

a) Grup-1 (aynı anda): *S. cerevisiae (SC)* ve *C. parapsilosis (CP)* aynı anda falkonlara eklenerek inkübe edilmiştir.

b) Grup-2 (önce CP): *C. parapsilosis* 'in 60 dak. süren inkübasyonunun ardından, *S. cerevisiae* eklenmiştir.

c) Grup-3 (önce SC): *S. cerevisiae* 'nin 60 dak. süren inkübasyonunun ardından, *C. parapsilosis* eklenmiştir.

d) Kontrol -1: *C. parapsilosis* falkonlara eklenerek inkübe edilmiştir.

d) Kontrol -2: *S. cerevisiae* falkonlara eklenerek inkübe edilmiştir.

Örnekler 48 saat boyunca 37 °C inkübe edilmiştir. Kültür süspansiyonlarının 6, 12, 24 ve 48. saat inkübasyon süresinin ardından yoğunlukları 590 nm'de okutularak absorbans ölçümü yapılmıştır (Kim J ve ark., 2020).

3.3.5 Biyofilm oluşturma ve Biyofilm miktarı belirleme deneyleri

3.3.5.1 Suşların Saflaştırılması-Zenginleştirilmesi

Standart *C. parapsilosis* ve *S. cerevisiae* suşları stoktan çıkarıldıktan sonra SDA besiyerlerine pasajlanmıştır ve inkübasyon sonrası üreyen *C. parapsilosis* kolonileri biyofilm oluşumunu arttırmak için YPB'a inoküle edilmiştir.

Katı besiyerinde üremiş *C. parapsilosis* suşlarından bir öze dolusu alınarak 20 ml YPD içeren cam flasklara konulmuştur. Daha sonra, flasklar, 24 saat, 37°C'de, 175 rpm orbital çalkalıyıcıda (Labnet, USA) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroorganizmalar flasktan alıp 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Santrifuj işlemi başlamadan önce Santrifuj (Eppendorf, Almanya) 3000 rpm x 5 dakika, 4°C olarak ayarlanmıştır. Falkon tüplerindeki kültür süspansiyonu santrifuje yerleştirilip 5 dak. süre ile santrifuj edilmiştir. Tüplerin dip çökeltisi üzerinde bulunan süpernatant sıvı atılıp soğuk halde 20 ml'lik Fosfat Tamponlu Su (PBS) eklendikten sonra vortekslenmiştir (Ika, Almanya) ve daha sonra yıkama işlemine geçilmiştir (Pierce ve ark., 2008).

Yıkama işlemi iki defa tekrarlanmış ve aşağıdaki gibi yapılmıştır:

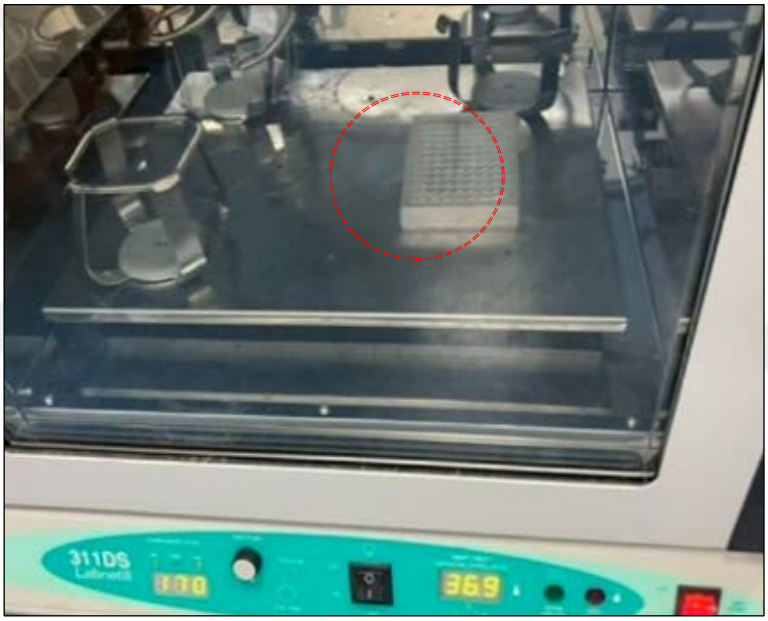
- Santrifuj işleminden sonra çökelti üzerine 20 ml PBS eklenmiştir. Çökelti üzerine birinci ve ikinci yıkama işlemi sırasında 20 ml PBS eklenip homojenizasyon açısından vortekslenmiştir.

- PBS dökülüp çökelti üzerine 20 ml besiyeri eklenerek, homojenizasyon açısından pipetaj yapılmış ve Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanarak her mikroorganizma için gerekli süspansiyon hazırlanmıştır.

3.3.5.2 Biyofilmlerin Oluşturulması

Biyofilm için inokulümde *C. parapsilosis* 1,0 x 10^6 kob/ml ve *S. cerevisiae* 1,0 x 10^8 kob/ml (Kunyenit ve ark., 2019) için RPMI besiyeri içerisinde hazırlanmıştır.

Biyofilm oluşturulması için 96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA (Corning, ABD) plakları kullanılmıştır. Hazırlanan inokülüm süspansiyonlarından biyofilm oluşturmak için her bir mikroorganizmadan 100'er mikrolitre alınarak mikroplaklara konulmuştur. Daha sonra, ELISA plakları orbital çalkalayıcıda 175 rpm de 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Biyofilm oluşumu için ELISA plaklarının inkübasyonu

3.3.5.3 *In-vitro C. parapsilosis* ve *S. cerevisiae* biyofilm deney grupları

Biyofilm oluşumu aşamasında kullanılan deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir (Kunyenit ve ark., 2019):

a) Grup-1 (aynı anda): Bu grupta, biyofilm oluşumu sırasında probiyotik uygulaması yapılmıştır. *S. cerevisiae* ve *C. parapsilosis* aynı anda kuyucuklara eklenerek inkübe edilmiştir.

b) Grup-2 (önce CP): Bu grupta, *C. parapsilosis* biyofilmi oluşturulduktan sonra probiyotik eklenmiştir. *C. parapsilosis*'in 60 dak. süren inkübasyonunun ardından, *S. cerevisiae* eklenmiştir.

c) Grup-3 (önce SC): Bu grupta ise, biyofilm oluşumundan önce *S. cerevisiae* 'in probiyotik inokülasyonu yapıldıktan sonra *C. parapsilosis* eklenmiştir. *S. cerevisiae* 'nin 60 dakika süren inkübasyonunun ardından, *C. parapsilosis* eklenmiştir.

d) Kontrol -1: *C. parapsilosis* biyofilmi oluşturulmuştur

e) Kontrol -2: *S. cerevisiae* biyofilmi oluşturulmuştur

3.3.5.4 Biyofilmlerin Yıkama İşlemi

Kantitatif ölçme işlemine geçilmeden önce, plaklarda meydana gelen biyofilm oluşumlarına yönelik bir yıkama prosedürü uygulanmıştır. Biyofilm oluştuktan sonra, çok kanallı bir pipet kullanılarak her bir kuyucuktaki biyofilm dokunulmadan üst sıvı dikkatlice aspire edilmiştir. Ardından, plaklardaki her bir kuyucuğa 200 µl steril PBS ile üç kez yıkama işlemi uygulanmıştır.

Yıkama işlemleri sırasında ve özellikle son yıkama işlemi tamamlandığında, plaklar ters çevrilerek kalan PBS damlacıklarını gidermek amacıyla kâğıt havlulara vurulmuştur.

3.3.5.5 Biyofilmlerin Boyanma ve Miktar Ölçüm İşlemi

Biyofilm miktarı için kristal viyole (CV) yöntemi kullanılmıştır Yıkama ve kurutma işlemleri tamamlandıktan sonra, plaklara %1'lik Kristal Viyole çözeltisi (Modiri ve ark., 2019) her bir kuyucuğa 100 µl miktarında konulmuştur. Plaklar, bu aşamadan sonra 15 dak. boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinin ardından, kuyucuklar 200 µl distile su ile üç kez yıkanmış, daha sonra ters çevrilerek kurutulmuştur. Kurutulan plaklardaki her bir kuyucuğa, ölçüm için hazırlanmak üzere 100 µl %95'lik etil alkol eklenmiş ve bu çözelti 15 dak. boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından, mikroplaklar ELISA okuyucusunda 590 nm dalga boyunda okutularak optik dansite değerleri kaydedilmiştir. Antifungal içermeyen kuyucuklara ve negatif kontrol kuyucuğuna 100 µl RPMI, pozitif kontrol kuyucuğuna %1'lik Kristal Viyole'den 100 µl konulmuştur. Her bir deney üç kez tekrarlanmış, elde edilen üç sonucun ortalama optik dansite değerleri istatistiksel analize dahil edilmiştir.

3.3.5.6 Biyofilm Oluşturulduktan Sonra Antifungal Duyarlılık Testleri

Belirlenen deney gruplarında biyofilmde MİK belirlemek için biyofilm oluşumunun ardından antifungal duyarlılık testleri Tablo 3-2'te sunulan antifungal ajanlar ve konsantrasyon aralıkları ile çalışılmıştır.

Mikroplaklarda biyofilm oluşumundan sonra, kuyucuklardaki kuyucuklardaki sıvılar alınarak, kuyucuklar 200 µl, PBS ile üç kez yıkanmıştır. Biyofilm içeren kuyucuklara, Tablo 4'te belirtilen antifungal konsantrasyonlarının seri dilüsyon eklenmiştir. Ardından mikroplaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra biyofilm yıkama ve boyanma işlemleri gerçekleştirilmiş 590'nm de okutularak absorbans ölçümü yapılmıştır. Kontrol kuyucuğuna (besiyeri ve mikroorganizma) kıyasla absorpsiyonun %50 azalmasına neden olan en düşük konsantrasyon sesil MİK (SMİK) değeri olarak belirlenmiştir.

3.3.5.7 Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİCi) indeksi hesaplanması

C. parapsilosis biyofilminin antifungallere (AMB, FLU, CAS) duyarlılığına *S. cerevisiae* nın etkisi Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİCi) indeksi aşağıda gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda FİCi ≤0,5 = sinerjik, FİCi= 0,5-1 additif (ek etki), FİCi = 1- 4 fark yok ve FİCi >4 ise antagonistik olarak kabul edilmiştir (An L. ve ark., 2022).

Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi hesaplama formülü:

(FİCi): Kombinasyondaki MIK değeri / tek başına MIK değeri

Örneğin kaspofungin için;

$$F\text{İ}Ci = \frac{C\,.parapsilosis + S\,.cereviase \text{ biyofilminin kaspofungin MİK değeri}}{C.parapsilosis \text{ biyofilminin tek başına kaspofungin MİK değeri}}$$

3.3.5.8 Biyofilm inhibisyon hesaplanması

Biyofilm inhibisyon hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Cepas ve ark., 2019)

Biyofilm inhibisyon oranı= (1 – A /B(pozitif kontrol)) × 100

A=inhibisyon oranının hesaplandığı kuyucuğun OD590 nm değeri
B= Pozitif kontrolün OD590 nm değeri

3.4 *İn-Vivo* Yöntem

İn-vivo aşaması, Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ağırlıkları 22-32 gram arasında değişen toplam 72 adet, 6-8 haftalık erkek BALB/C fareler kullanılmıştır. Fareler, Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Birimi üretim laboratuvarından tedarik edilmiştir. Deney süresince, fareler 12 saatlik aydınlık/karanlık foto periyodu, ısı (22 ± 2˚C), ve nem (%45-50) otomatik olarak ayarlı odalarda tutulmuş ve polikarbonat şeffaf kafeslerde yem ve temiz su ile beslenmiştir. Deney süresince herhangi bir fareye yem ve su kısıtlaması uygulanmamıştır.

Deney hayvanları üzerinde çalışmaların yürütüldüğü laboratuvar ortamına adaptasyon için özel bir uygulama yapılmamıştır. Her kafeste rastgele seçilen iki fareden oluşan gruplar oluşturulmuş ve planlanan tedaviler günde tek doz olarak verilmiştir (Şekil 3.2). Tüy dökülmesi olan, ateş, harekette bozukluk veya fiziksel durumu iyi görünmeyen fareler çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 3.2 Sağlıklı ve rasgele seçilen iki fareden oluşan grupların görüntüsü

3.4.1 Deney Grupları

Çalışmanın deney grupları Leao ve ark., kaynağından modifiye edilerek tasarlanmıştır (Leao ve ark., 2018):

Deney grupları ve tedavi protokolleri aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir

1. ***Kontrol Grubu (Enfeksiyon Gerçekleştirilmemiş, Probiyotik/Tedavi Uygulaması almayan) (K):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan sadece probiyotik veya tedavi almayan fareleri içerir.
2. ***Kontrol Grubu (Enfeksiyon Oluşturulmuş, Probiyotik/Tedavi Almayan) (F):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmuş ancak probiyotik veya tedavi almayan fareleri içerir.
3. ***Sadece Probiyotik Alan Kontrol Grubu (Enfeksiyon Oluşturulmadan) (KP):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan sadece probiyotik alan fareleri içerir.
4. ***Sadece Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Oluşturulmuş, Ek Tedavi almayan) (FP):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmuş ancak ek tedavi almadan sadece probiyotik alan fareleri içerir.
5. ***Kaspofungin ile Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Sonrası) (FP-CAS) :*** Bu grup, enfeksiyon sonrasında kaspofungin ve probiyotik alan fareleri içerir.
6. ***Amfoterisin-B ile Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Sonrası) (FP-AMB):*** Bu grup, enfeksiyon sonrasında amfoterisin-B ve probiyotik alan fareleri içerir.
7. ***Flukonazol ile Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Sonrası) (FP-FLU*)*:*** Bu grup, enfeksiyon sonrasında flukonazol ve probiyotik alan fareleri içerir.
8. ***14 gün önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası 5 Gün Daha Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Oluşturulan) (FPP):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan önce 2 hafta boyunca probiyotik alan ve enfeksiyon sonrasında 5 gün daha probiyotik alan fareleri içerir.
9. ***14 gün Artı 5 Gün (19 Gün) Boyunca Sadece Probiyotik Alan Grup (Enfeksiyon Oluşturulmadan)* (*KPP*):*** Bu grup, 19 gün boyunca sadece probiyotik alan fareleri içerir.
10. ***14 gün Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Kaspofungin ile Probiyotik Alan Grup (FPP-CAS):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan önce 2 hafta boyunca probiyotik alan ve enfeksiyon sonrasında kaspofungin ve probiyotik alan fareleri içerir.

11. ***14 gün Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Amfoterisin-B ile Probiyotik Alan Grup (FPP-AMP):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan önce 2 hafta boyunca probiyotik alan ve enfeksiyon sonrasında amfoterisin-B ve probiyotik alan fareleri içerir.
12. ***14 gün Önce Probiyotik Alan ve Enfeksiyon Sonrası Flukonazol ile Probiyotik Alan Grup (FPP-FLU):*** Bu grup, enfeksiyon oluşturulmadan önce 2 hafta boyunca probiyotik alan ve enfeksiyon oluşturulmadan 2 hafta önce probiyotik almaya başlayan ve enfeksiyon sonrasında flukonazol ile probiyotik alan grup

Tablo 3.3'te deney gruplarının özeti sunulmuştur.

Tablo 3.3 *İn-vivo* deney grupları

Deney Grubu	Sayı	Probiyotik Uygulama	Antifungal Uygulama	Enfeksiyon
K	6	Hayır	Hayır	Hayır
F	6	Hayır	Hayır	Evet
KP	6	Evet	Hayır	Hayır
FP	6	Enfeksiyondan sonra	Hayır	Evet
FP-CAS	6		Kaspofungin	Evet
FP-AMB	6		Amfoterisin-B	Evet
FP-FLU	6		Flukonazol	Evet
FPP	6	Enfeksiyondan 2 hafta önce, + Antifungal Tedavileriyle birlikte	Hayır	Evet
KPP	6		Hayır	Hayır
FPP-CAS	6		Kaspofungin	Evet
FPP-AMB	6		Amfoterisin-B	Evet
FPP-FLU	6		Flukonazol	Evet

3.4.2 Kandidiyazis Deney Modeli Oluşturulması

C. parapsilosis ile oluşturulan kandidiyazis enfeksiyon deney modeli çerçevesinde, çalışmamızda her bir fareye 0.2 cc de 10^8 kob/ml *C. parapsilosis* içeren süspansiyon eterle kısa süreli anestezi altında kuyruk veninden uygulanmıştır (Dimoopoulou ve ark., 2014) (Şekil 3.3). Farelerin günlük olarak hareketleri, tüy dökülme durumları ve fiziksel durumları düzenli bir şekilde kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3 Kuyruk veninden enjeksiyon işleminin uygulanması

3.4.3 Antifungal Tedavilerin Uygulanması

C. parapsilosis ile oluşturulan kandidiyazis enfeksiyon modeli tedavisine, enfeksiyonun oluşturulmasından itibaren 24 saat sonra başlanmıştır. Antifungal tedavi alan gruplarda, tedavi intraperitoneal olarak uygulanmış ve 5 gün boyunca her gün aynı saatte günlük olarak verilmiştir. Antifungal tedavi almayan kontrol gruplarında steril enjeksiyonlu su 0,2 cc, intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uygulanan antifungallerin veriliş yolu, hacim ve veriliş sıklığı Tablo 3.4'te belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Tablo 3.4 Antifungallerin veriliş yolu, hacim ve veriliş sıklığı

Antifungal	Doz	Veriliş yolu	Hacim	Veriliş sıklığı
Kaspofungin	1 mg/kg	İntraperitoneal	0.2 cc	24 saatte bir/5gün
Amfoterisin B	1 mg/kg	İntraperitoneal	0.2 cc	24 saatte bir/5gün
Flukonazol	5 mg/kg	İntraperitoneal	0.2 cc	24 saatte bir/5gün

3.4.4 Probiyotik Uygulanması

Probiyotik uygulamaları için çalışmamızda, *S. cerevisiae* taze kültüründen 10^8 kob/ml'lik bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, enfeksiyondan 24 saat sonra içme sularına eklenmiştir (Leao ve ark, 2018). İçme suları probiyotik uygulaması boyunca değiştirilmemiş olup çalışma sonlandığında kafesteki kalan içme suyu ml cinsinden ölçülmüştür.

3.4.5 Sakrifikasyon

Antifungal tedavilerin 5. günü sonunda fareler intraperitoneal ketamin hidroklorür (0.1 ml/100 g) (Richterpharma, Austurya), Ksilazin hidroklorür (0.1 ml/100 g) (Richterpharma, Austurya), uygulandıktan sonra sakrifiye edilmiştir. Kullanılan doz ve veriliş yolları Tablo 3.5'de özetlenmiştir.

Tablo 3.5 Anestezik ajanların doz ve veriliş yolları

Ajan	Doz	Veriliş yolu	Hacim	Veriliş sıklığı
Ketamin HCl	100 mg/kg	İntraperitoneal	0.1 ml/100 g	Tek doz (1 kez)
Ksilazin HCl	100 mg/kg	İntraperitoneal	0.1 ml/100 g	Tek doz (1 kez)

3.4.6 Numunelerin Toplanması ve *C. parapsilosis* İzolasyonu

Sakrifiye edilen farelerin sağ ve sol böbrekleri toplanarak her bir böbrek hassas terazide tartılmıştır (Conti ve ark.,2014). Homojenizasyon ve izolasyon Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Homojenizasyon işlemi, biyogüvenlik kabini içinde gerçekleştirilmiş olup, her bir böbrek 10 ml RPMI-1640 besiyeri kullanılarak hücre filtresi ile homojenize edilmiştir (Şekil 3.4). Homojenizasyon işlemi tamamlanan örneklerden 100 µl alınarak SDA besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 72-96 saat süren inkübasyonun ardından *C. parapsilosis* karakterizasyonu ve koloni sayımı gerçekleştirilmiştir.



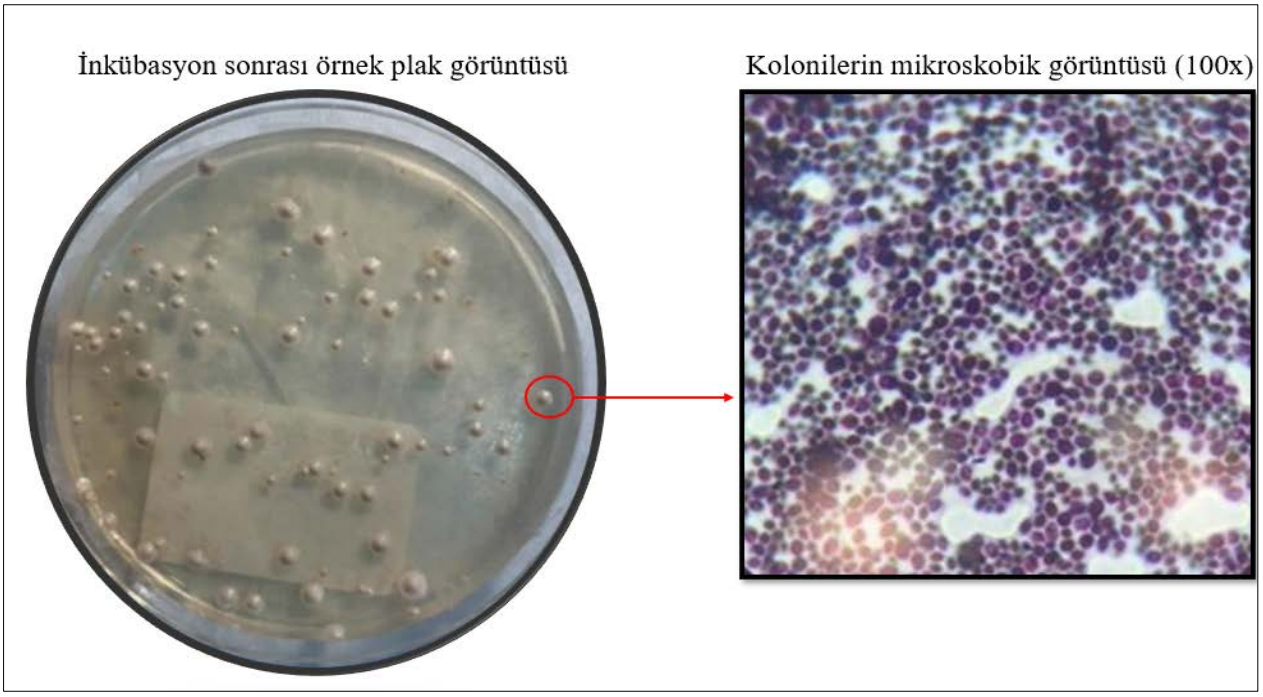
Şekil 3.4 Homojenizasyon işlemi

3.4.7 *C.parapsilosis* tanımlanması

İnkübasyon sonrası koloniler gram boyama yöntemiyle incelendikten sonra (Şekil 3.5) maya kolonilerinden *C. parapsilosis* tanımlaması için aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır:

a. Mısır Unlu-Tween 80 Agar'daki Mikroskobik Morfoloji

b. VİTEK 2 YST ID Kart ile Tanımlama



Şekil 3.5 Maya kolonilerinin değerlendirilmesi

3.4.7.1 Mısır Unlu-Tween 80 Agar'daki Mikroskobik Morfoloji

Saf maya kolonisinden iğne öze yardımıyla bir miktar alınarak dalmau tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır (Chander ve ark., 2009). Ekim alanının üzerine steril lamel kapatılarak besiyeri 25 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ekim alanı besiyeri üzerinden ışık mikroskobunda 40X büyütme ile spor ve hif yapıları incelenmiştir.

3.4.7.2 VİTEK 2 YST ID Kart ile Tanımlama

İnkübasyon süresi sonunda, saf kültürde üremiş *Candida* kolonileri alınarak steril serum fizyolojik içeren tüpte süspansiyon oluşturulmuş, bu süspansiyon vortekslenerek homojenleştirilmiş ve 2 McFarland standardına ayarlanmıştır. Süspansiyon tüpü ve ID kartı kasete yerleştirilmiş, kaset ve YST kartı VİTEK 2 cihazına (Biomerieux, Fransa) tanımlanarak cihaza yüklenmiş ve cihaz okuması otomatik olarak 18 saat sonunda gerçekleştirilmiştir.

3.5 İstatistiksel Analiz

Sürekli verilerin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri sunulmuştur. İstatiksel veri analizleri GraphPad (Prism version 14.0) programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler t-testi kullanılarak doğrulanmıştır. p değeri <0,05 olan sonuçlar, istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4 BULGULAR

4.1 *İn-vitro* Bulgular

4.1.1 Antifungal Duyarlılık Testleri Sonuçları

C. parapsilosis ve *S. cerevisiae* suşları için MİK değerleri, Amfoterisin-B, Flukonazol ve Kaspofungin antifungallerine karşı CLSI referanslarına göre duyarlı olarak saptanmıştır. Tablo 4.1'de her bir antifungale göre saptanan MİK değerleri sunulmuştur.

Tablo 4.1 *C. parapsilosis* ve *S. cerevicae'nın* Amfoterisin-B, Flukonazol ve Kaspofungine karşı MİK sonuçları

	C. parapsilosis	***S. cerevisiae***
Amfoterisin-B ug/ml	0,25	0,06
Flukonazol ug/ml	1	0.125
Kaspofungin ug/ml	1	0,003

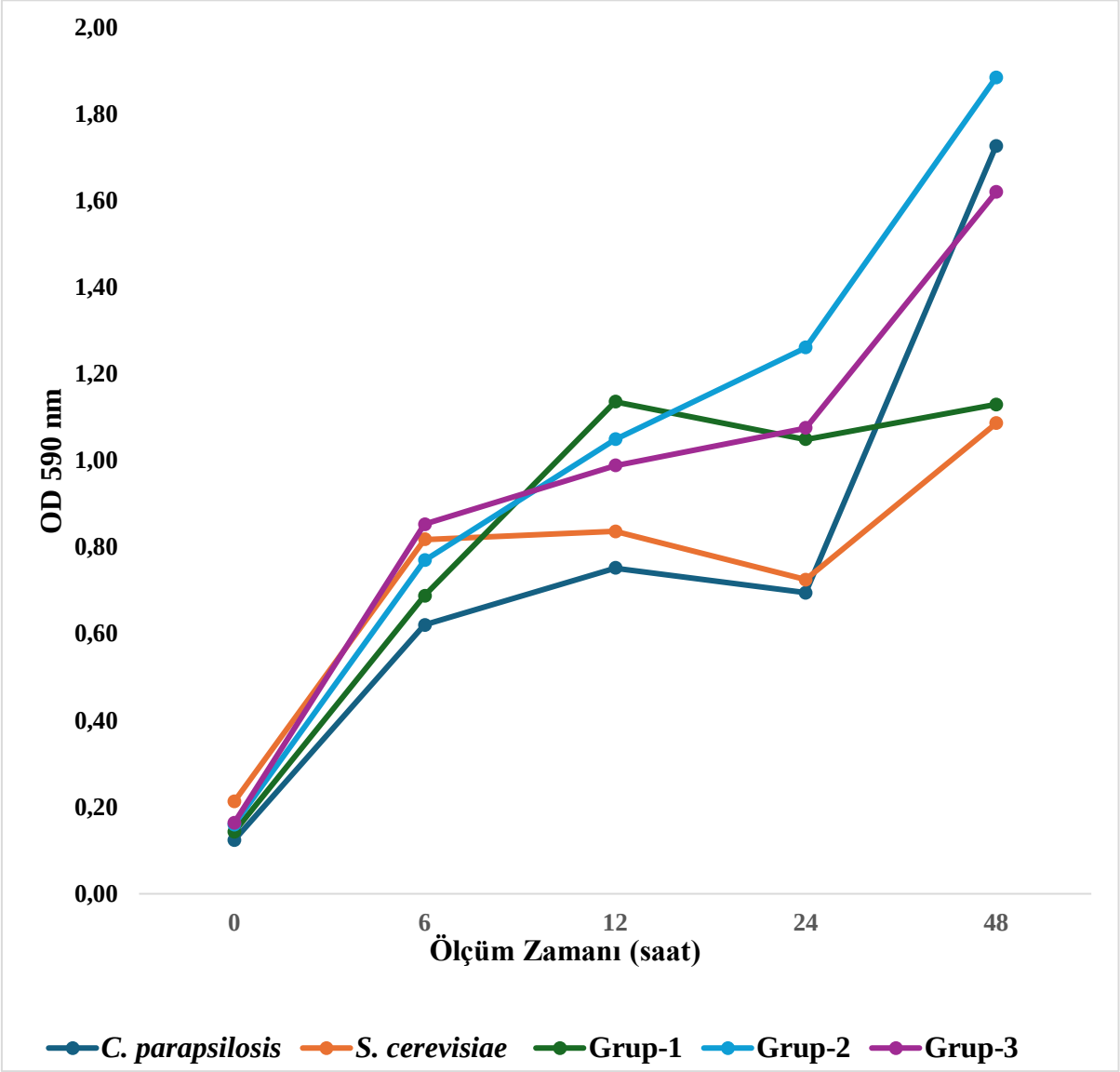
4.1.2 Zamana Bağlı Üreme Eğrisi

Çalışmada *C. parapsilosis* ve probiyotik *S. cerevisiae* ortak kültürlerinin zamana bağlı üreme eğrisi çıkartılmıştır. *C. parapsilosis*'in SDB besiyerinde, ölçüm zamanlarına göre *S. cerevisiae*'ye kıyasla daha hızlı ürediği belirlenmiştir. *C. parapsilosis*'in ortak kültürleriyle karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Tüm deney grupları, üç tekrar üzerinden çalışılmış ve elde edilen ortalama optik dansite (OD) değerleri ile *C. parapsilosis'*in OD değerleri kıyaslanmıştır. Grup 1'de 0.83; grup 2'de 1.02 ve grup 3'te 0.94 olan OD değerleri, *C. parapsilosis* 'in tek başına ölçülen OD değeri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.2, Grafik 4.1).

Tablo 4.2 *C. parapsilosis* ve probiyotikli ortak kültürlerin absorbans ve *p* değerleri

	OD 590 nm	p değerleri*
C. parapsilosis	0,78	-
S. cerevisiae	0,73	0,875
Grup-1	0,83	0,891
Grup-2	1,02	0,548
Grup-3	0,94	0,667

*Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC):. S. cerevisiae biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup. *C. parapsilosis OD değeri ile karşılaştırılmıştır.*



Grafik 4.1 *C. parapsilosis* ve probiyotikli ortak kültürlerin üreme eğrisi

4.1.3 Biyofilm Miktarı Ölçüm Sonuçları

Biyofilm miktarının belirlenmesi kristal viyole yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyin ilk aşamasında, *C. parapsilosis* biyofilmi oluşturulmuş, ardından *S. cerevisiae* ile birlikte oluşturulan biyofilmler incelenmiştir. Tüm deney grupları, üç tekrar olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama optik dansite (OD) değerleri değerlendirilmiştir.

C. parapsilosis 'in tek başına oluşturduğu biyofilm miktarının absorbansı 2,80; *S. cerevisiae'* nin tek başına oluşturduğu biyofilm miktarının absorbansı 0,29 ; negatif kontrol absorbansı ise 0,119 değerinde ölçülmüştür (Tablo 4.3, Grafik 4.2, Şekil 4.1).

Grup 1'de oluşturulan biyofilm miktarının absorbans değeri 2,50; Grup 2'de oluşturulan biyofilm miktarının absorbans değeri 2,39 değerinde ölçülmüştür ve *C. parapsilosis* biyofilm miktarına (OD:2,80 nm) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak, Grup 3'te oluşturulan biyofilm miktarı 2,03 değerinde ölçülmüş olup ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo 4.3, Grafik 4.2).

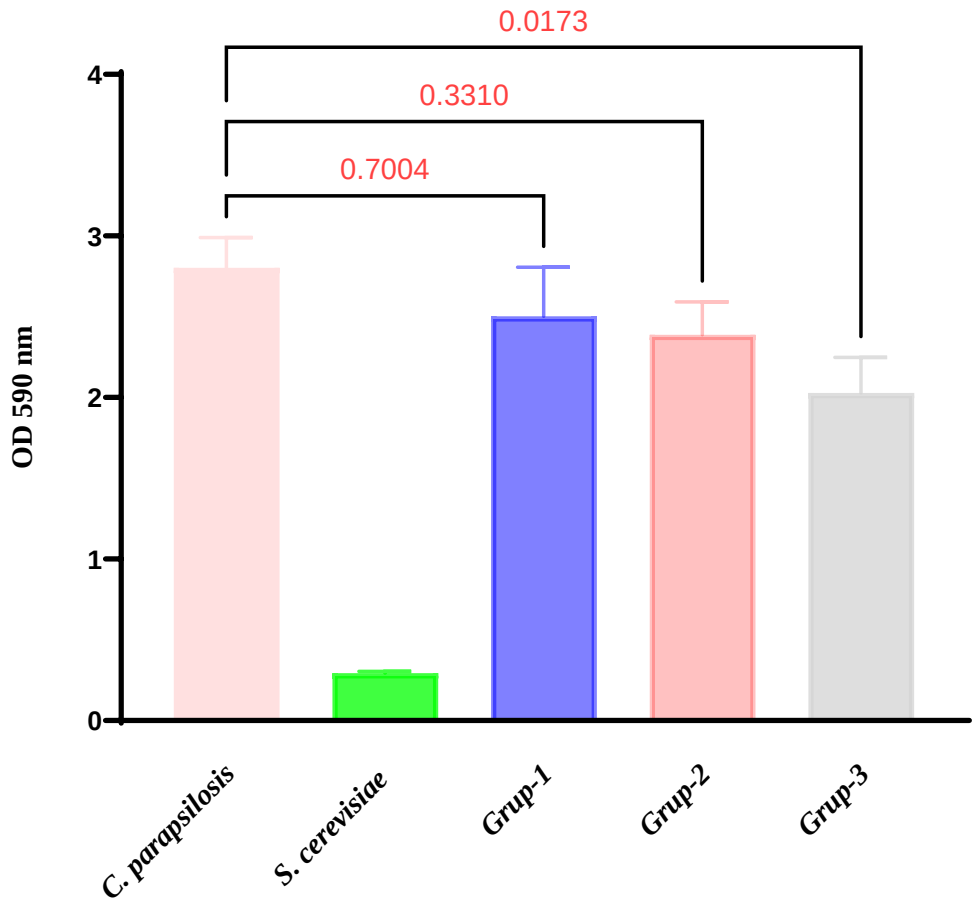
C.parapsilosis' e kıyasla biyofilm kütlesindeki değişim oranları gruplar arasında incelendiğinde, Grup 1'de %11'lik bir azalma, Grup 2'de %15'lik bir azalma, Grup 3'te %28'lik bir azalma kaydedilmiştir (Tablo 4.3). *S. cerevisiae* önce eklendiğinde *C. parapsilosis* biyofilmi miktarında daha fazla azalmaya yol açmıştır.

Tablo 4.3 Kristal viyole Yöntemi ile belirlenen biyofilm OD değerleri ve p değerleri

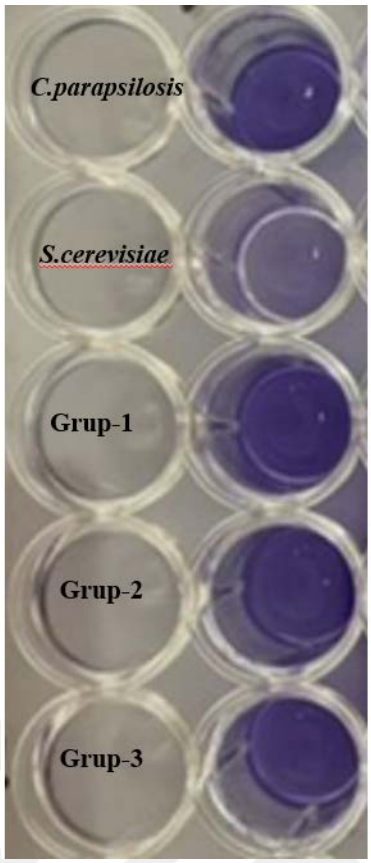
Gruplar	**OD**	**Biyofilm OD değerindeki değişim[1]**	***p* değeri[2]**
C. parapsilosis	2,80	-	-
S. cerevisiae	0,29	-	-
Grup-1	2,50	%11 daha az	0,70
Grup-2	2,39	%15 daha az	0,34
Grup-3	2,03	%28 daha az	*0,02**

[1]C. parapsilosis kıyasla biyofilm kütlesindeki değişim oranları.[2]C. parapsilosis biyofilm miktarına göre karşılaştırıldığında p değerleri.

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC): S. cerevisiae biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup.



Grafik 4.2 Biyofilm absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.1 CV Yöntemi ile biyofilm miktar belirleme çalışmasında *C. parapsilosis* 'un tek başına oluşturduğu biyofilm ile probiyotik eklenen gruplardaki biyofilm görüntüsü.

4.1.4 C. *parapsilosis* Probiyotikli Biyofilmlerinde Sesil MİK'in Belirlenmesi

Biyofilm oluşturulan ve yıkama işlemleri gerçekleştirilen mikroplaklar ELISA okuyucusunda 590'nm da okutularak absorbans ölçümü yapılmıştır. Pozitif kontrol kuyucuğuna (besiyeri ve mikroorganizma) kıyasla absorpsiyonun, biyofilm inhibisyonunun %50 azalmasına neden olan en düşük konsantrasyon sesil MİK (SMİK) değeri olarak belirlenmiştir. Antifungal içermeyen, biyofilmli kuyucuk-pozitif kontrol (OD = 2,80) ve biyofilm olmayan kuyucuk ise negatif kontrol (OD: 0,04) olarak belirlenmiştir. *C. parapsilosis* biyofilmi mikroplakta oluşturulduktan antifungal duyarlılık testi ve hesaplanması standart prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir (Pierce ve ark., 2010). Bu deneylerin sonucunda *C. parapsilosis* biyofilminde probiyotik ile birlikte antifungal duyarlılığın belirlenmesinde Tablo 4.4'deki değerler elde edilmiştir.

Amfoterisin-B de, *C. parapsilosis* %50 SMİK'i 2 µg/ml'de olarak, grup 1'de 1 µg/ml'de grup 2 ve grup 3'te 0.5 µg/ml'de %50 SMİK değeri saptanmıştır(Tablo 4.4).

Flukonazolde, *C. parapsilosis* %50 SMİK 2 µg/ml'de olarak, grup 1'de 0.5 µg/ml'de, grup 2 ve grup 3'te 0.125 µg/ml'de %50 SMİK değeri saptanmıştır(Tablo 4.4).

Kaspofunginde *C. parapsilosis* %50 SMİK 0.03 µg/ml'de olarak, grup 1, grup 2, grup 3'te 0.015 µg/ml %50 SMİK değeri saptanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 *C. parapsilosis* biyofilminde antifungal ve probiyotik ile birlikte %50 SMİK sonuçları

	Amfoterisin-B %50 SMİK	**Flukonazol %50 SMİK**	**Kaspofungin %50 SMİK**
C. parapsilosis	2	2	0,030
Grup-1	1	0,5	0,015
Grup-2	0,5	0,5	0,015
Grup-3	0,5	0,125	0,015

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC): S. cerevisiae'nin 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup

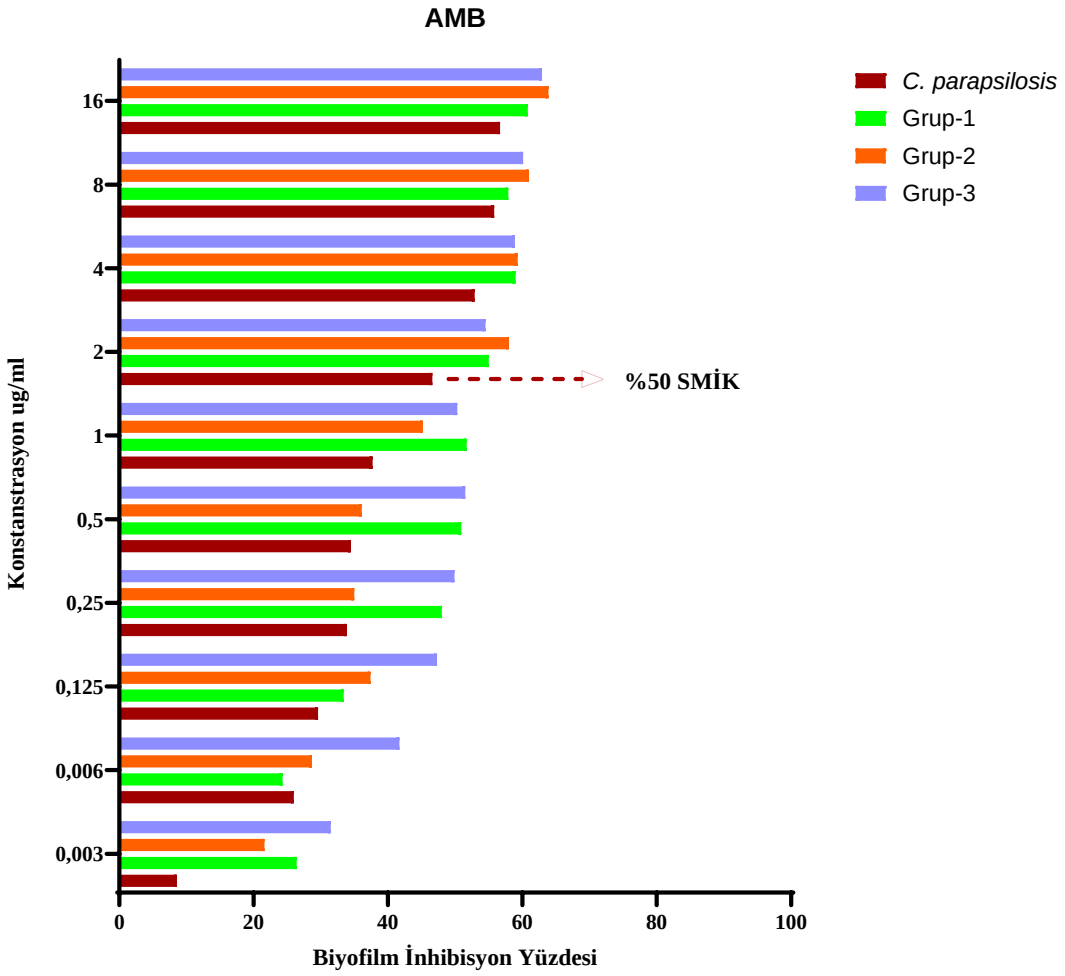
4.1.4.1 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Amfoterisin-B etkisi

Biyofilm inhibisyon oranları hesaplandıktan sonra, AMB konsantrasyon artışına bağlı olarak tüm gruplarda inhibisyon oranlarında bir artış gözlemlenmiştir (Grafik 4.3). *C.parapsilosis* 'in AMB 2 µg/ml'de %50 biyofilm inhibisyon oranına sahipken aynı konsantrasyonda grup 1'de bu oran %55, grup 2 'de bu oran %58,0, grup 3'te %54,5 olarak saptanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 *C. parapsilosis* biyofilminde 2 µg/ml AMB biyofilm inhibisyon oranları

Grup	% inhibisyon oranı
C. parapsilosis	%50,0
Grup-1	%55,0
Grup-2	%58,0
Grup-3	%54,5

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC):. S. cerevisiae' biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği ***grup***



Grafik 4.3 AMB konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları

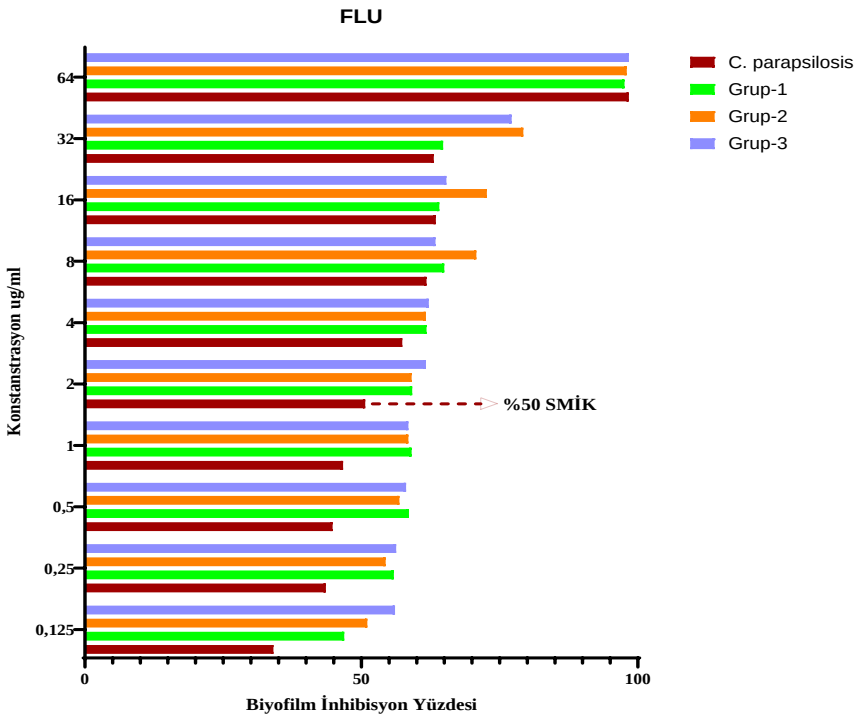
4.1.4.2 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Flukonazolün etkisi

C.parapsilosis biyofilminde probiyotiğin farklı aşamalardaki flukonazol (FLU) konsantrasyonlarının anti biyofilm etkileri değerlendirilmiştir. Biyofilm inhibisyon oranları hesaplandıktan sonra, flukonazolün konsantrasyon artışına bağlı olarak tüm gruplarda inhibisyon oranlarında bir artış gözlemlenmiştir (Grafik 4.4). *C.parapsilosis*'in FLU C. *parapsilosis* 2 µg/ml'de %50 biyofilm inhibisyon oranı saptanırken aynı konsantrasyonda grup 1'de bu oran %59,2, grup 2 'de bu oran %59,1, grup 3'te %61,7 olarak saptanmıştır (Tablo 4.6)

Tablo 4.6 *C. parapsilosis* biyofilminde 2 µg/ml FLU biyofilm inhibisyon oranları

	%
C. parapsilosis	%50,0
Grup-1	%59,2
Grup-2	%59,1
Grup-3	%61,7

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC):. S. cerevisiae'nin 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup



Grafik 4.4 FLU konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları

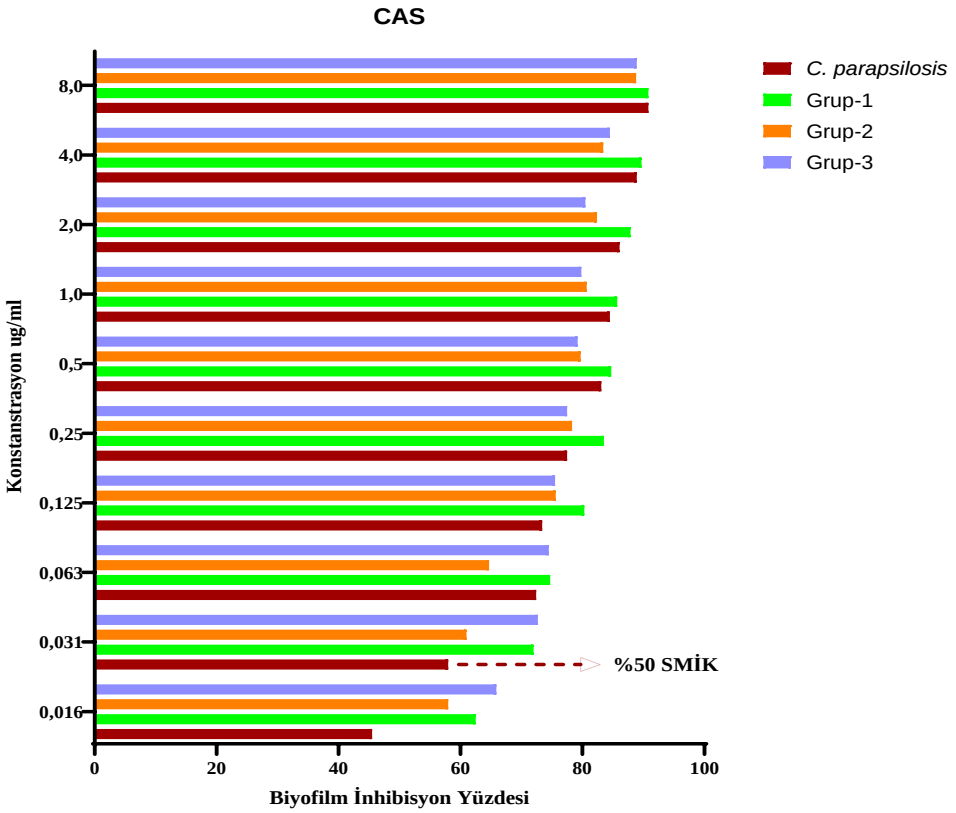
4.1.4.3 *C. parapsilosis* probiyotikli biyofilminde Kaspofungin etkisi

Kaspofungin (CAS) konsantrasyonlarının antibiyofilm etkileri değerlendirilmiştir. Biyofilm inhibisyon oranları hesaplandıktan sonra, CAS konsantrasyon artışına bağlı olarak tüm gruplarda inhibisyon oranlarında bir artış gözlemlenmiştir (Grafik 4.5). *C.parapsilosis*'in CAS 0,03 µg/ml'de %50 biyofilm inhibisyon oranı saptanırken aynı konsantrasyonda grup 1'de bu oran %62,5, grup 2 'de bu oran %61, grup 3'te %72,7 olarak saptanmıştır (Tablo 4.7)

Tablo 4.7 *C. parapsilosis* biyofilminde 0,03 µg/ml CAS biyofilm inhibisyon oranları

	%
C. parapsilosis	%50,0
Grup-1	%62,5
Grup-2	%61,0
Grup-3	%72,7

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC): S. cerevisiae'nin 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup



Grafik 4.5 CAS konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyon oranları

4.1.5 *C. parapsilosis* Biyofilminde Antifungal ve Probiyotik Kombinasyonuna Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

C. parapsilosis biyofilmleri üzerinde *S. cerevisiae* ve antifungallerin kombinasyonuna karşı gösterdikleri etkileşim türleri Tablo 4.8 verilmiştir. FICi, Başlık 3.3.7.7 tanımlandığı şekilde hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara göre, AMB ve CAS kombinasyonlarındaki etkileşim türü tüm gruplarda "sinerjik"; FLU'de ise Grup 1'de "fark yok", grup 2 ve 3'te "sinerjik" etki olarak saptanmıştır (Tablo 4.8)

Tablo 4.8 *C. parapsilosis* biyofilminde antifungal ve probiyotik kombinasyonuna karşı gösterdikleri etkileşim türleri

	MİK	**FICi Formül**	**FICi**	**Etkileşim Türü**
Flukonazol				
C. parapsilosis	4	-	-	-
Grup-1	4	4/4	1	Fark yok
Grup-2	2	2/4	0,5	Sinerjik
Grup-3	2	2/4	0,5	Sinerjik
Amfoterisin-B				
C. parapsilosis	4	-	-	
Grup-1	2	2/4	0,5	Sinerjik
Grup-2	2	2/4	0,5	Sinerjik
Grup-3	2	2/4	0,5	Sinerjik
Kaspofungin				
C. parapsilosis	4	-	-	
Grup-1	2	2/4	0,5	Sinerjik
Grup-2	1	1/4	0,25	Sinerjik
Grup-3	1	1/4	0,25	Sinerjik

Grup-1 (aynı anda): S. cerevisiae ve C. parapsilosis'in aynı anda kuyucuklara eklenerek biyofilm oluşturulduğu grup, Grup-2 (önce CP): C. parapsilosis biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra , S. cerevisiae eklendiği grup; Grup-3 (önceSC):. S. cerevisiae biyofilmi oluşturulduktan 60 dak sonra C. parapsilosis eklendiği grup

4.2 *İn-Vivo* Bulgular

Probiyotik uygulaması, başlık 3.4.4'te belirtildiği şekilde, enfeksiyon oluşturulmadan önce 14 gün boyunca probiyotik alan ve enfeksiyon sonrasında 5 gün daha probiyotik alan grubu içeren iki farklı zamanlamada gerçekleştirilmiştir. Antifungal tedaviler olarak AMB, FLU ve CAS, başlık 3.4.2'de tanımlandığı gibi uygulanmıştır.

Enfekte edilmeden, probiyotik ve antifungal uygulanmayan kontrol grubunda (K), maya kolonisi izole edilmemiştir. Aynı şekilde, sadece probiyotik alan (P ve PP) gruplarında *C. parapsilosis* tespit edilmemiştir.

Enfekte edildikten sonra, probiyotik ve antifungal uygulanmayan kontrol grubu (F)'de ortalama 133,3 kob/ml/mg *C. parapsilosis* tespit edilmiştir. Enfeksiyon sonrasında sadece probiyotik tedavisi alan (FP) grubunda ortalama 110,8 kob/ml/g, probiyotikle birlikte CAS alan grupta (CAS-FP) ortalama 32 kob/ml/g, AMB (AMB-FP) alan grupta ortalama 66 kob/ml/g, FLU (FLU-FP) alan grupta ortalama 80 kob/ml/g *C. parapsilosis* tespit edilmiştir. FP grubundaki *C. parapsilosis* ortalama sayısı 110,8 kob/ml/g olup, F grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0,05$). Ancak, CAS-FP, AMB-FP ve FLU-FP gruplarındaki *C. parapsilosis* ortalama değerleri F grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (Tablo 4.9).

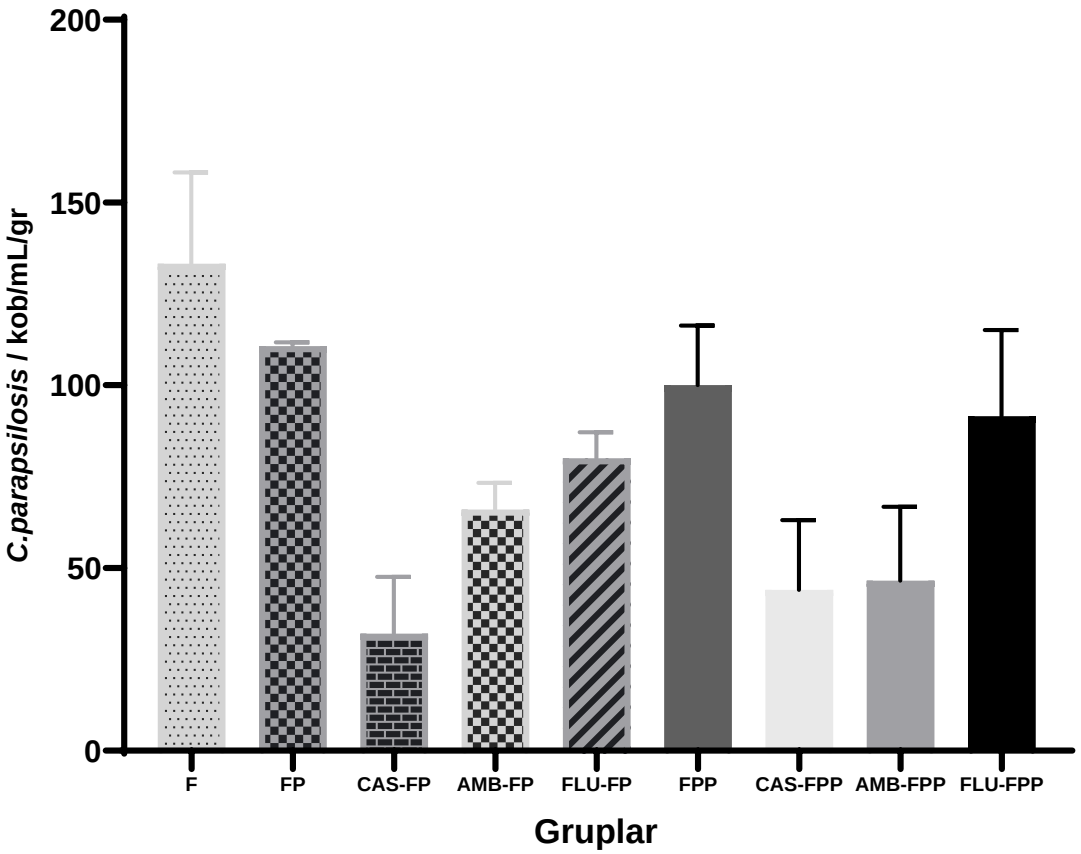
Enfeksiyondan 14 gün önce probiyotik ve enfeksiyon sonrası probiyotik ile beraber antifungal tedavi alan grup içerisinde, sadece probiyotik ile tedavi olan deney (FPP) grubunda ortalama 115 kob/ml/g *C. parapsilosis* tespit edilmiştir. CAS tedavisi alanlarda (CAS-FPP) ortalama 48,5 kob/ml/g, AMB tedavisi alanlarda (AMB-FPP) ortalama 46,5 kob/ml/g, FLU tedavisi alan grupta (FLU-FPP) ise ortalama 91,5 kob/ml/g *C. parapsilosis* izole edilmiştir. Bu gruptaki ortalama değerler F grubu ile kıyaslandığında FPP grubunda istatistiksel olarak fark saptanmamış olup, F grubuna kıyasla; CAS-FPP, AMB-FPP, FLU-FPP gruplarında istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (Tablo 4.9, Tablo 4.10, Grafik 4.6). CAS' ın enfeksiyona karşı en etkili antifungal olduğu Grafik 4.6 da gözlenmektedir.

Tablo 4.9 *İn-vivo* deney gruplarında saptanan *C. parapsilosis* sayıları (kob/ml/g)

Ana grup	Grup adı	En küçük	En büyük	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	**K**	0	0	0	0
	F	100	160	133,3	24,94
Enfeksiyondan sonra antifungal tedavileriyle probiyotik alan gruplar	**P**	0	0	0	0
	FP	110	112	110,8	0,9574
	CAS-FP	12	50	32	15,58
	AMB-FP	58	74	66	7,303
	FLU-FP	74	90	80	7,118
Enfeksiyondan 2 hafta önce+ Antifungal Tedavileriyle birlikte probiyotik alan gruplar	**PP**	0	0	0	0
	FPP	80	120	115	16,33
	CAS-FPP	30	72	48,5	19,11
	AMB-FPP	30	76	46,5	20,22
	FLU-FPP	60	116	91,5	23,57

Tablo 4.10 *İn-vivo* deney gruplarında saptanan *C. parapsilosis* sayılarının ortalama değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan gruplar	P değeri	P değeri yorum
F * FP	0,159	Anlamlı değil
F* CAS-FP	0,001	Anlamlı, P<0,05
F* AMB-FP	0,022	Anlamlı, P<0,05
F* FLU-FP	0,045	Anlamlı, P<0,05
F* FPP	0,204	Anlamlı değil
F* CAS-FPP	0,011	Anlamlı, P<0,05
F* AMB-FPP	0,013	Anlamlı, P<0,05
F* FLU-FPP	0,025	Anlamlı, P<0,05
FP* FPP	0,299	Anlamlı değil
CAS-FP* CAS-FPP	0,217	Anlamlı değil
AMB-FP* AMB-FPP	0,181	Anlamlı değil
FLU-FP* FLU-FPP	0,494	Anlamlı değil



Grafik 4.6 *İn-vivo* deney gruplarında ortalama *C. parapsilosis* sayısı

5 TARTIŞMA

Son yıllarda fungal patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar küresel olarak artış göstermiştir. *Candida* türleri, tüm dünyada nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerin başında gelmektedir. Fungal enfeksiyonlar arasında invazif *Candida* enfeksiyonu (kandidiyazis), en yaygın olarak bildirilen enfeksiyondur (Bongomin, F 2017). *Candida* türleri, son yirmi yıl içinde bağışıklık sistemi baskılanmış, hastanede yatan hastalarda kan dolaşımı enfeksiyonlarının dördüncü en sık nedeni olarak rapor edilmiştir (Bongomin, F 2017, Wisplinghoff, H 2004, Govender, N.P 2016). Kandidemi veya invazif kandidiyazis yüksek ölüm oranlarına ek olarak artan sağlık harcamaları ve uzun süreli hastanede kalma süreleri ile ilişkilidir (Delaloye, Calandara, 2014; Wisplinghoff, 2004, Whaley, 2016). Invazif kandidiyazis risk faktörleri arasında geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı, immün baskılayıcı ajanların kullanımı (glukokortikosteroidler, kemoterapötik ajanlar ve immünomodülatörler), santral venöz kateter kullanımı, nötropeni, total parenteral beslenme, implante edilebilir protez cihazlarının kullanımı ve organ nakilleri bulunmaktadır (Berman, J 2020; Sudbery, 2004; Wartenberg, 2014).

İnvazif *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde polienler, azoller ve ekinokandinler gibi sınırlı sınıfta antifungal ilaç kullanılmaktadır (Berman, 2020). Klinik kullanımda mevcut antifungal ilaçların sınırlı olması, artan ilaç direnci, yüksek mortalite riski, tedavi planlamasında zorluklara neden olmaktadır. Son yıllarda *C. parapsilosis* izolatlarında da artan direnç oranları bildirilmektedir (Asadzadeh ve ark.,2017; Daneshnia ve ark., 2023). Dirençli suşlar, duyarlı *C. parapsilosis* izolatlarının yerini alarak salgınlara neden olabilmektedir (Arastehfar A, 2020; Thomaz DY, 2021; Arastehfar A, 2021).

Küresel ölçekte artan direnç oranları, geleneksel tedavilerin yetersiz kalmasına ve enfeksiyonların tekrarlanmasına yol açarak ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Bu durum, tedavi protokollerinde alternatif yöntemlerin araştırılmasını ve yeni ilaçların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Ancak, yeni antifungal ajanların geliştirilmesi ve bu ajanların etkinlik ve güvenlik profillerinin belirlenmesi oldukça uzun bir süreç gerektirmektedir. Direncin etkisini en aza indirmek ve halk sağlığı tehditlerini önlemek amacıyla farklı yaklaşımlar günümüzde araştırma konusu olmuştur.

Geleneksel yaklaşımların yanı sıra birçok yenilikçi yöntem ortaya çıkmıştır. Bu yenilikçi yaklaşımlar arasında faj uygulamaları, antimikrobiyal peptitler, antisens antimikrobiyal terapötiklerle kombinasyonlar, immünoterapi yaklaşımları (monoklonal antikorlar), gen teknolojileri, fitoterapi, fotodinamik terapi, nanoteknoloji ve sentetik biyoloji gibi yöntemler bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar, gelişen direncin önüne geçmede umut verici stratejiler olarak kabul edilmektedir (Alaoui ve ark., 2022). Bu yenilikçi yaklaşımların yanı sıra, mikrobiyom tabanlı tedavi stratejileri de önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır. Mikrobiyom tabanlı tedavi stratejileri arasında, özellikle probiyotikler ile antifungal tedavi kombinasyonlarının etkisinin araştırılması giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Probiyotikler, antifungal ilaçlarla birlikte kullanıldığında enfeksiyonların tedavisinde ve direncin önlenmesinde potansiyel bir çözüm sunabilir.

Gıda kaynaklı probiyotik maya uygulamalarının *C. albicans* ve albicans dışı *Candida* türlerinin virülansını azalttığına ve enfeksiyon oluşumuna karşı olumlu sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir (Kunyeit L ve ark., 2019). Probiyotiklerin ve antifungal ajanların muhtemel sinerjik etkisi, ilaç direncinin ortaya çıkmasını önleyebilir ve antifungal ilaçlarla kombinasyon tedavisinde kullanılabilir. Daha önce yapılan çalışmalar, probiyotiklerin antimikrobiyal ajanlarla birlikte kullanımının sinerjik etkiler gösterebileceğini ve hatta bazı probiyotik türlerinin doğal antibiyotik olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür (Lee ve ark., 2023, Acharjee ve ark., 2022).

Probiyotik mayaların tedavide kullanımına ilişkin bir çalışmada, *Staphylocccous aureus*'un olduğu enfeksiyonlarda S. *cerevisiae'nın* ürettiği metabolitler sayesinde Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının önlenebileceği bildirilmiştir (Saidi ve ark., 2019). *Saccharomyces boulardii*'nin bebeklere oral uygulanmasının mantar kolonizasyonunu ve invazif mantar enfeksiyonlarını azalttığını bildirilmektedir (Demirel ve ark.,2013). Ergenlik çağındaki çocuklarda yapılan bir başka çalışma, probiyotiklerin *Candida* enfeksiyonuna karşı etkilerine odaklanarak, *Lactobacillus spp.* ve *Saccharomyces spp.* içeren bir probiyotik kokteylin, *C. albicans* kolonizasyonunda azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Kumar ve ark.,2013). Probiyotik maya ile *Candida* enfeksiyon etkileşimlilerine yönelik çalışmalar incelendiğinde, *S. cerevisiae'*nın, *Candid*a'nın epitel hücrelerine yapışmasını engellediği, biyotik yüzeyler üzerinde bir bariyer oluşturduğu gösterilmiştir (Jawhara S ve ark 2012). Başka bir çalışmada, özellikle uzun süreli ve sürekli antibiyotik kullanımına maruz kalan hastalarda, normal gastrointestinal mikrobiyotadaki

dalgalanmalardan kaynaklanan ishalle ilişkili tüm hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, maya probiyotiklerin bakteri probiyotiklerine kıyasla daha uygun ve etkili terapötik ajanlar olduğu bildirilmiştir (Qamar ve ark 2001). Ancak, çalışmamızda *in-vitro* testler sonucunda *S. cerevisiae*'nın *C. parapsilosis* üremesi üzerine etkisi olmadığı ve *in-vivo* deneysel fare modelinde Candida enfeksiyonu sonrasında *C. parapsilosis* koloni sayısında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda, *in-vitro* probiyotik inokülasyonundan sonra *C. parapsilosis'*in inoküle edilmesi durumunda biyofilm miktarında %28'lik bir azalma saptanmıştır. Sonuçlarımıza paralel olarak, yapılan bir çalışmada probiyotik mayalar Candida suşları ile birlikte inkübe edildiğinde, *C. parapsilosis* adezyonunda %34 azalma olduğu bildirilmiştir (Kunyeit L ve ark 2020). Erken biyofilm oluşum aşamasında probiyotik *S. cerevisiae (KTP)* suşunun *C. parapsilosis* biyofilm oluşumunu %50'den daha fazla inhibe ettiği bildirilmiştir (Kunyeit L 2019). Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada, *Lactobacillus spp.* probiyotiklerinin *Candida* türlerinin patojenitesini azalttığı ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon etkisinin, probiyotiğin türüne göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Matsubara ve ark., 2016). Bu veriler dikkate alındığında, S. *cerevisiae'*nın *C. parapsilosis* biyofilm oluşumunda rekabet ve girişim gösterdiği kanıtlanmaktadır. Bu durum, *S. cerevisiae*'nın *C. parapsilosis* biyofilm ilişkili enfeksiyonlarında inhibe edici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Probiyotiklerin tek başına antifungal etkinliğinin gösterilmiş olması, antifungallerle birlikte kullanıldığında sinerjik etkinin olası olduğunu düşündürmüştür. Ancak, yapılan literatür incelemeleri sonucunda, antifungal ilaçlarla birlikte probiyotik kullanımına dair herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızda, *C. parapsilosis* ve *S. cerevisiae'*nin birlikte oluşturduğu biyofilmde antifungal ajanlara karşı duyarlılığın değişimi incelenmiştir. İn vitro deneylerde biyofilm oluşumundan önce ve sonra probiyotiğin uygulanmasıyla, *C. parapsilosis* biyofilm SMİK50 değerleri AMB'de 4 kat, FLU'da 16 kat ve CAS'de 2 kat azalmıştır. Probiyotikle birlikte test edilen antifungallerde, *C. parapsilosis* SMİK'ine sahip olduğu konsantrasyonlarda daha fazla biyofilm inhibisyon oranı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, *S. cerevisiae*'nın antifungallerle birlikte verildiğinde *C. parapsilosis* biyofilm inhibisyonunda artış olduğunu göstermektedir.

İn-vivo deneylerde böbreklerdeki *C. parapsilosis* koloni sayıları dikkate alındığında, probiyotiğin enfeksiyondan 14 gün önce verildiği (FPP) gruplarda ve enfeksiyondan sonra antifungal tedavilerle birlikte probiyotik verildiği (FP) gruplarda gözlemlenen antifungal etkinlik CAS, AMB ve FLU sırasında en yüksekten en düşüğe doğru sıralanmıştır. CAS ile birlikte probiyotik enfeksiyondan sonra antifungal tedaviyle birlikte verildiğinde (CAS-FP), böbreklerden izole edilen *C. parapsilosis* koloni sayısında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, FLU kullanıldığında, enfeksiyondan sonra antifungal tedaviyle birlikte probiyotik verilen grupta, enfeksiyon öncesi probiyotik kullanımına kıyasla daha düşük *C. parapsilosis* koloni sayıları tespit edilmiştir. AMB ile tedavi edildiğinde ise, enfeksiyondan önce probiyotik uygulanması ile enfeksiyon sonrası antifungal tedavi ile birlikte probiyotik uygulandığında (AMB-FPP) daha düşük *C. parapsilosis* koloni sayıları saptanmıştır. Bu bulgular, probiyotik uygulama zamanlamasının kullanılan antifungal ajan sınıfına bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır. Bu farklılıklar, antifungal ilaçların etki mekanizmalarının çeşitliliğiyle ilişkili olabilir.

İn vitro ve in vivo sonuçlar karşılaştırıldığında, özellikle FICI sonuçlarına göre FLU dışında AMB ve CAS'da tüm deney gruplarında probiyotik ile sinerjik etki gözlenmiştir. Sinerjik etkinin gözlenmesinde zaman faktörü etkili olmuştur. İn vitro deneylerde, *C. parapsilosis* biyofilm oluşumundan 60 dak. önce veya 60 dak. sonra probiyotik uygulanmış olup in vivo deneylerde ise bu süreler, enfeksiyondan 14 gün önce ve enfeksiyondan 24 saat sonra olacak şekilde düzenlenmiştir. Her iki deney koşulunda da, *in-vitro* sinerjik etki sonuçları ile uyumlu olarak in vivo deneyler sonucunda enfeksiyondan sonra probiyotik alan CAS tedavi gruplarında *C. parapsilosis* koloni sayılarında daha fazla azalma olmuştur. FLU ile birlikte probiyotik uygulaması, hem *in-vitro* deneylerinde aynı anda yapılan gruplar arasında fark göstermemiştir. FLU ile tedavi edilen in vivo fare deneylerinde, diğer antifungallere kıyasla enfeksiyon sonrası antifungal tedavi ile birlikte probiyotik alan (FLU-FP) FLU gruplarında daha yüksek oranda *C. parapsilosis* saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, probiyotiklerin antifungal tedavide, antifungal sınıfa göre potansiyel yardımcı ajanlar olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Uzun süre yoğun bakımda yatan hastalarda veya nötropeni gelişen hematolojik maliniteli hastalarda gelişen kandidiyazis klinik tablosu, ateş nedeniyle sıklıkla bakteriyel sepsise benzemektedir. Antibakteriyel tedavi uzun bir süre devam ettiğinde ve tedaviye yanıt alınamadığında, fırsatçı mantar etkenleri düşünülmektedir. Bu durumda, tedavi protokolüne antifungal ajanlar eklenerek tedaviye devam edilmektedir. Özellikle invazif kandidiyazis şüphesi olan hastalarda, probiyotik tedavisinin önceden başlanması, uzun süreli antibiyotik kullanımının olumsuz etkilerini hafifletebilir. Ayrıca, probiyotiklerin profilaktik kullanımı, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek ve *Candida* gibi fırsatçı enfeksiyonların önlenmesine yardımcı olarak tedaviyi olumlu etkileyebilir. Antifungal tedavi planlanan hastalarda, *S. cerevisiae*'nin probiyotik olarak kullanılması, *C. parapsilosis* biyofilminin inhibisyon etkisi nedeniyle enfeksiyon şiddetini azaltabilir ve sinerjik etkisiyle antifungal tedavi etkinliğini arttırılabilir. *S. cerevisiae* mikrobiyom tabanlı tedavi stratejilerinde bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*C. parapsilosis'*in artan antifungal direnci ve klinikte birinci basamak ttercih edilen FLU, AMB, CAS'e karşı yüksek MIK değerlerinin tespit edilmesi, *C. parapsilosis* tedavisinde zorluklar yaratmaktadır. Bu nedenle, alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasını gerekmektedir. Yeni antifungal ajanların geliştirilmesinin uzun zaman alabileceği göz önüne alındığında, farklı tedavi stratejilerinin araştırılması ve geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu amaçla, mikrobiyom tabanlı tedavi stratejileri öne çıkmaktadır. Mikrobiyom tabanlı tedaviler, mevcut antimikrobiyallerin etkinliğini arttırarak direnç gelişimini engelleyebilir ve ilaçların toksik etkilerini azaltarak konak organizmanın yaşam süresini uzatabilir. Probiyotikler, immünomodülasyon, epitelyal stabiliteyi koruma, biyofilm inhibitörü olma, iyon geçişini sağlama, hücre içi toksisiteyi azaltma gibi etkilere sahip olduğundan, gelecekte umut vadeden bir tedavi seçeneği olabilirler.

Bu çalışmada, *S. cerevisiae* probiyotiğinin *C. parapsilosis* biyofilm oluşumu ve antifungal tedaviyle etkinliği üzerindeki potansiyel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bulgularımız, probiyotik *S. cerevisiae*'nın *C. parapsilosis* biyofilm oluşumunu azalttığını ve antifungal ajanlarla birlikte uygulandığında *C. parapsilosis*'in antifungal duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, *S. cerevisiae'*nin antifungal tedaviye olan etkinliği deneysel fare modelinde de değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, *S. cerevisiae* probiyotiğinin *C. parapsilosis* enfeksiyon tedavisinde antifungallerin tek başına kullanımına kıyasla, FLU dışında AMB ve CAS ile birlikte kullanımının sinerjik etki gösterdiğini kanıtlanmıştır. *S. cerevisiae*'nin *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının tedavisinde potansiyel bir yardımcı ajan olarak kullanılabileceği, in-vivo deneylerle de desteklenmektedir. Özellikle, *C. parapsilosis* ile enfekte edilen farelerde *S. cerevisiae* uygulandığında; CAS ve AMB antifungallerinin FLU'e kıyasla daha etkili olduğu saptanmış olup, bu nedenle CAS ve AMB'nin *C.parapsilosis* kaynaklı invazif kandidiyazis veya kandidemi tedavisinde öncelikle tercih edilmesi önerilebilir. Bu bağlamda, özellikle immünsüprese hastalarda gelişen invazif kandidiyazis klinik tablosunda *Candida* tür tanımlanması klinisyenin yönlendirilmesi açısından önemlidir. Bulgular, *S. cerevisiae* probiyotiğinin *C. parapsilosis* enfeksiyonları tedavisinde antifungaller ile birlikte uygulanmasının alternatif bir terapötik seçenek olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın bulguları, klinik uygulamalarda yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi adına önemli bir temel sağlamaktadır.

7 KAYNAKLAR

Acharjee, M., Hasan, F., Islam, T., Nur, I. T., Begum, N., Mazumder, C., Lubna, M. A., Zerin, N., Shahriar, A., & Mahmud, M. R. (2022). In-vitro antibacterial activity of commercially available probiotics on food-borne pathogens along with their synergistic effects with synthetic drugs. Metabolism open, 14, 100187. https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100187

Adam, K. M., Osthoff, M., Lamoth, F., Conen, A., Erard, V., Boggian, K., Schreiber, P. W., Zimmerli, S., Bochud, P. Y., Neofytos, D., Fleury, M., Fankhauser, H., Goldenberger, D., Mühlethaler, K., Riat, A., Zbinden, R., Kronenberg, A., Quiblier, C., Marchetti, O., Khanna, N. Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS) (2021). Trends of the Epidemiology of Candidemia in Switzerland: A 15-Year FUNGINOS Survey. Open forum infectious diseases, 8(10), ofab471. https://doi.org/10.1093/ofid/ofab471

Alaoui Mdarhri, H., Benmessaoud, R., Yacoubi, H., Seffar, L., Guennouni Assimi, H., Hamam, M., Boussettine, R., Filali-Ansari, N., Lahlou, F. A., Diawara, I., Ennaji, M. M., & Kettani-Halabi, M. (2022). Alternatives Therapeutic Approaches to Conventional Antibiotics: Advantages, Limitations and Potential Application in Medicine. Antibiotics (Basel, Switzerland), 11(12), 1826. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121826

Alçi, G. , Keçeli, S. A. & Sarıtaş, B. M. (2022). Distribution of Candida Species Isolated from Different Clinical Specimens and Their Antifungal Susceptibility Profile: A 5 Year Retrospective Analysis . Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi , 8 (1) , 92-98 . DOI: 10.30934/kusbed.1037788

Alhatmi, H., Almansour, S., Abanamy, R., Akbar, A., Abalkhail, M., Alharbi, A., Alsaedy, A., Mahmoud, E., Alalwan, B., AlJohani, S., Aldibasi, O. S., Bosaeed, M., & Alothman, A. (2022). Clinical Characteristics and Outcome of Candidemia: Experience from a Tertiary Referral Center in Saudi Arabia. Saudi journal of medicine & medical sciences, 10(2), 125–130. https://doi.org/10.4103/sjmms.sjmms_625_21

Almirante, B., Rodríguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sanchez, F., Ayats, J., Alonso-Tarres, C., Rodriguez-Tudela, J. L., & Pahissa, A. (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of Candida parapsilosis bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. Journal of clinical microbiology, 44(5), 1681–1685. https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1681-1685.2006

An, L., Tan, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., & Yang, L. (2022). Synergistic Effect of the Combination of Deferoxamine and Fluconazole In Vitro and In Vivo against Fluconazole-Resistant Candida Spp. Antimicrobial agents and chemotherapy, 66(11), e0072522. https://doi.org/10.1128/aac.00725-22

Ansari, F., Alian Samakkhah, S., Bahadori, A., Jafari, S. M., Ziaee, M., Khodayari, M. T., & Pourjafar, H. (2023). Health-promoting properties of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii as a probiotic; characteristics, isolation, and applications in dairy products. Critical reviews in food science and nutrition, 63(4), 457–485. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1949577

Arastehfar, A., Daneshnia, F., Hilmioglu-Polat, S., Ilkit, M., Yasar, M., Polat, F., Metin, D. Y., Dokumcu, Ü. Z., Pan, W., Hagen, F., Boekhout, T., Perlin, D. S., & Lass-Flörl, C. (2021). Genetically related micafungin-resistant Candida parapsilosis blood isolates harbouring novel mutation R658G in hotspot 1 of Fks1p: a new challenge?. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 76(2), 418–422. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa419

Arastehfar, A., Lass-Flörl, C., Garcia-Rubio, R., Daneshnia, F., Ilkit, M., Boekhout, T., Gabaldon, T., & Perlin, D. S. (2020). The Quiet and Underappreciated Rise of Drug-Resistant Invasive Fungal Pathogens. Journal of fungi (Basel, Switzerland), 6(3), 138. https://doi.org/10.3390/jof6030138

Araújo, D., Henriques, M., & Silva, S. (2017). Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes. Trends in microbiology, 25(1), 62–75. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.004

Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., & EUCAST-AFST (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18(7), E246–E247. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x

Asadzadeh, M., Ahmad, S., Al-Sweih, N., & Khan, Z. (2017). Epidemiology and Molecular Basis of Resistance to Fluconazole Among Clinical Candida parapsilosis Isolates in Kuwait. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), 23(8), 966–972. https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0336

Azie, N., Neofytos, D., Pfaller, M., Meier-Kriesche, H. U., Quan, S. P., & Horn, D. (2012). The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *73*(4), 293–300. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012.

Badr, H., El-Baz, A., Mohamed, I., Shetaia, Y., El-Sayed, A. S. A., & Sorour, N. (2021). Bioprocess optimization of glutathione production by Saccharomyces boulardii: biochemical characterization of glutathione peroxidase. *Archives of microbiology*, *203*(10), 6183–6196. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02584-0

Ben-Ami R., Kontoyiannis D.P. Resistance to Antifungal Drugs. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2021;35:279–311. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.003.

Berman, J., & Krysan, D. J. (2020). Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature reviews. Microbiology*, *18*(6), 319–331. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2

Beyda, N. D., Lewis, R. E., & Garey, K. W. (2012). Echinocandin resistance in Candida species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *The Annals of pharmacotherapy*, *46*(7-8), 1086–1096. https://doi.org/10.1345/aph.1R020

Bonassoli, L. A., Bertoli, M., & Svidzinski, T. I. (2005). High frequency of Candida parapsilosis on the hands of healthy hosts. The Journal of hospital infection, 59(2), 159–162. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.033

Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *3*(4), 57. https://doi.org/10.3390/jof3040057

Caldara, M. and Marmiroli, N. (2018) Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 52, 500– 505.

Carmo, M.S., Noronha, F.M.F., Arruda, M.O., Costa, Ê.P.S., Bomfim, M.R.Q., Monteiro, A.S., Ferro, T.A.F., Fernandes, E.S. *et al.* (2016) *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays in vitro inhibitory activities against *Candida* spp. *Front Microbiol* 7, 1722.

Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., & Van Dijck, P. (2020). Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *6*(4), 321. https://doi.org/10.3390/jof6040321

Castanheira M, Deshpande LM, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55:105799. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.003

Cattana, M. E., Dudiuk, C., Fernández, M., Rojas, F., Alegre, L., Córdoba, S., Garcia-Effron, G., & Giusiano, G. (2017). Identification of Candida parapsilosis Sensu Lato in Pediatric Patients and Antifungal Susceptibility Testing. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(7), e02754-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02754-16

Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in medicine*, *5*, 28. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028.

Cepas, V., López, Y., Gabasa, Y., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Correia, M. J., Santos, L. M. A., Oliveira, F., Ramos, V., Reis, M., Castelo-Branco, R., Morais, J., Vasconcelos, V., Probert, I., Guilloud, E., Mehiri, M., & Soto, S. M. (2019). Inhibition of Bacterial and Fungal Biofilm Formation by 675 Extracts from Microalgae and Cyanobacteria. Antibiotics (Basel, Switzerland), 8(2), 77. https://doi.org/10.3390/antibiotics8020077

Chakrabarti, A., Sood, P., Rudramurthy, S. M., Chen, S., Kaur, H., Capoor, M., Chhina, D., Rao, R., Eshwara, V. K., Xess, I., Kindo, A. J., Umabala, P., Savio, J., Patel, A., Ray, U., Mohan, S., Iyer, R., Chander, J., Arora, A., Sardana, R., … Mendiratta, D. (2015). Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. Intensive care medicine, 41(2), 285–295. https://doi.org/10.1007/s00134-014-3603-2

Chamilos G, Lewis RE, Albert N, Kontoyiannis DP. Paradoxical effect of Echinocandins across Candida species in vitro: evidence for echinocandin-specific and candida species-related differences. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jun;51(6):2257-9. doi: 10.1128/AAC.00095-07. Epub 2007 Apr 16. PMID: 17438060; PMCID: PMC1891358.

Chander J. Candidiasis. In: Chander J, editor. *Text book of medical mycology.* 3rd ed. New Delhi: Mehta Offset Pvt Ltd; 2009. pp. 266–90.

Chandra, J., & Mukherjee, P. K. (2015). Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiology spectrum, 3(4), 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015

Chandra J., Patel J.D., Li J., Zhou G., Mukherjee P.K., McCormick T.S., Anderson J.M., Ghannoum M.A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of Candida albicans to form biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:8795–8801. doi: 10.1128/AEM.71.12.8795-8801.2005.

Chen, S. C., Slavin, M. A., & Sorrell, T. C. (2011). Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*, *71*(1), 11–41. https://doi.org/10.2165/11585270-000000000-00000

Chen, X. C., Xu, J., & Wu, D. P. (2020). Clinical Characteristics and Outcomes of Breakthrough Candidemia in 71 Hematologic Malignancy Patients and/or Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Single-center Retrospective Study From China, 2011-2018. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *71*(Suppl 4), S394–S399. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1523.

Chen, X., Fruehauf, J., Goldsmith, J. D., Xu, H., Katchar, K. K., Koon, H. W., Zhao, D., Kokkotou, E. G., Pothoulakis, C., & Kelly, C. P. (2009). Saccharomyces boulardii inhibits EGF receptor signaling and intestinal tumor growth in Apc(min) mice. *Gastroenterology*, *137*(3), 914–923. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.050

Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2018). Diagnosing Invasive Candidiasis. *Journal of clinical microbiology*, *56*(5), e01909-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01909-17

Conti, H. R., Huppler, A. R., Whibley, N., & Gaffen, S. L. (2014). Animal models for candidiasis. Current protocols in immunology, 105, 19.6.1–19.6.17. https://doi.org/10.1002/0471142735.im1906s105

Cosme, F., Inês, A., & Vilela, A. (2022). Consumer's acceptability and health consciousness of probiotic and prebiotic of non-dairy products. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, *151*, 110842. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110842

Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2014). Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *5*(7), a019752. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019752

Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J. C., & Ruiz-Baca, E. (2012). Candida species: new insights into biofilm formation. *Future microbiology*, *7*(6), 755–771. https://doi.org/10.2217/fmb.12.48.

Daneshnia F, de Almeida Júnior JN, Ilkit M, Lombardi L, Perry AM, Gao M, Nobile CJ, Egger M, Perlin DS, Zhai B, Hohl TM, Gabaldón T, Colombo AL, Hoenigl M, Arastehfar A. Worldwide emergence of fluconazole-resistant Candida parapsilosis: current framework and future research roadmap. Lancet Microbe. 2023 Jun;4(6):e470-e480. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00067-8. Epub 2023 Apr 27. Erratum in: Lancet Microbe. 2023 Aug;4(8):e576. PMID: 37121240; PMCID: PMC10634418.,

Davari A., Haghani I., Hassanmoghadam F., Nabili M., Shokohi T., Hedayati M.T., Shabanzadeh S., Moazeni M. Echinocandin resistance in *Candida parapsilosis* sensu stricto: Role of alterations in *CHS3*, *FKS1* and *Rho* gene expression. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2020;22:685–688. doi: 10.1016/j.jgar.2020.06.025

Delaloye, J., & Calandra, T. (2014). Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*, *5*(1), 161–169. https://doi.org/10.4161/viru.26187

Demirci-Duarte, S., Arikan-Akdagli, S., & Gülmez, D. (2021). Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive Candida parapsilosis complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years. *Mycoses*, *64*(8), 823–830. https://doi.org/10.1111/myc.13296

Demirel, G., Celik, I. H., Erdeve, O., Saygan, S., Dilmen, U., & Canpolat, F. E. (2013). Prophylactic Saccharomyces boulardii versus nystatin for the prevention of fungal colonization and invasive fungal infection in premature infants. *European journal of pediatrics*, *172*(10), 1321–1326. https://doi.org/10.1007/s00431-013-2041-4.

Denning D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet (London, England)*, *362*(9390), 1142–1151. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14472-8

Dimopoulou, D., Hamilos, G., Tzardi, M., Lewis, R. E., Samonis, G., & Kontoyiannis, D. P. (2014). Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible Candida parapsilosis isolates with different degrees of caspofungin susceptibility. Antimicrobial agents and chemotherapy, 58(1), 229–236. https://doi.org/10.1128/AAC.01025-13

Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R. Descriptions of Medical Fungi. 2nd editio.; Published by Authors. 2007

Eren E, Sav H, Beştepe Dursun Z (2022). The epidemiology and antifungal susceptibility of Candida species isolated from patients in intensive care units of a research hospital. Turk Hij Den Biyol Derg. 2022; 79(1): 93-102

Fanos V., Cataldi L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: A review. *J. Chemother.* 2000;12:463–470. doi: 10.1179/joc.2000.12.6.463.

Fernández-Pacheco, P., Pintado, C., Briones Pérez, A., & Arévalo-Villena, M. (2021). Potential Probiotic Strains of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces*: Functional and Biotechnological Characteristics. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *7*(3), 177. https://doi.org/10.3390/jof7030177

Gácser A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*. 2007;44(12):1336-1341. doi:10.1016/j.fgb.2007.02.002.

Garcia Vilela, E., De Lourdes De Abreu Ferrari, M., Oswaldo Da Gama Torres, H., Guerra Pinto, A., Carolina Carneiro Aguirre, A., Paiva Martins, F., Marcos Andrade Goulart, E., & Sales Da Cunha, A. (2008). Influence of Saccharomyces boulardii on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *43*(7), 842–848. https://doi.org/10.1080/00365520801943354

Garzoni C, Nobre V a, Garbino J. Candida parapsilosis endocarditis: a comparative review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(12):915-926. doi:10.1007/s10096-007-0386-1.

Gautret, P., Rodier, M. H., Kauffmann-Lacroix, C., & Jacquemin, J. L. (2000). Case report and review. Onychomycosis due to Candida parapsilosis. Mycoses, 43(11-12), 433–435.

González, G. M., Treviño-Rangel, R.deJ., Palma-Nicolás, J. P., Martínez, C., González, J. G., Ayala, J., Caballero, A., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Velarde, F., Ascencio, E. P., Tinoco, J. C., Vázquez, J. A., Cano, M. A., León-Sicairos, N., González, R., Rincón, J., Elías, M. A., & Bonifaz, A. (2013). Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *68*(12), 2847–2851. https://doi.org/10.1093/jac/dkt283

Govender, N. P., Patel, J., Magobo, R. E., Naicker, S., Wadula, J., Whitelaw, A., Coovadia, Y., Kularatne, R., Govind, C., Lockhart, S. R., Zietsman, I. L., & TRAC-South Africa group (2016). Emergence of azole-resistant Candida parapsilosis causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 71(7), 1994–2004. https://doi.org/10.1093/jac/dkw091

Graf, B., Adam, T., Zill, E., & Göbel, U. B. (2000). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *Journal of clinical microbiology*, *38*(5), 1782–1785. https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1782-1785.2000

Groll, A. H., Rijnders, B. J. A., Walsh, T. J., Adler-Moore, J., Lewis, R. E., & Brüggemann, R. J. M. (2019). Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *68*(Suppl 4), S260–S274. https://doi.org/10.1093/cid/ciz076

Grossman N.T., Pham C.D., Cleveland A.A., Lockhart S.R. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59:1030–1037. doi: 10.1128/AAC.04613-14.

Harrington R., Kindermann S.L., Hou Q., Taylor R.J., Azie N., Horn D.L. Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients. *Curr. Med. Res. Opin.* 2017;33:1803–1812. doi: 10.1080/03007995.2017.1354824.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 11*(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66

Horvath P., Nosanchuk J.D., Hamari Z., Vagvolgyi C., Gacser A. The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in Candida parapsilosis virulence. *J. Infect. Dis.* 2012;205:923–933. doi: 10.1093/infdis/jir873.

Howell SA, Hazen KC. Candida, Cryptococcus, and other Yeasts of Medical Importance, " Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW(eds): In: Manual of Clinical Microbiology 10.digital Ed.". Vol 2; 115.sec. ASM Press, Washington 2011 17.

Jawhara S, Habib K, Maggiotto F, Pignede G, Vandekerckove P, Maes E, Dubuquoy L, Fontaine T, Guerardel Y, Poulain D. Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. PLoS One. 2012;7(7):e40648. doi: 10.1371/journal.pone.0040648. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22848391; PMCID: PMC3407157.

Kantarcıoğlu AS, Aygün G (2019). A 16-year analysis of antifungal susceptibilities of invasive Candida spp tested in our daily hospital routine. *Cerrahpasa Med J* 2019; 43(1): 13-22.

Kaźmierczak-Siedlecka, K., Ruszkowski, J., Fic, M., Folwarski, M., & Makarewicz, W. (2020). Saccharomyces boulardii CNCM I-745: A Non-bacterial Microorganism Used as Probiotic Agent in Supporting Treatment of Selected Diseases. *Current microbiology*, *77*(9), 1987–1996. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9

Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic Saccharomyces boulardii for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*, *5*(2), 111–125. https://doi.org/10.1177/1756283X11428502

Kim, J.; Kim, H.; Jeon, S.; Jo, J.; Kim, Y.; Kim, H. Synergistic Antibacterial Effects of Probiotic Lactic Acid Bacteria with Curcuma longa Rhizome Extract as Synbiotic against Cutibacterium acnes. *Appl. Sci.* 2020, *10*, 8955. https://doi.org/10.3390/app10248955

Kozik, A., Karkowska-Kuleta, J., Zajac, D., Bochenska, O., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., & Rapala-Kozik, M. (2015). Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of Candida parapsilosis and Candida tropicalis pathogenic yeasts. BMC microbiology, 15, 197. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0531-4

Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 2002;70:878–888. doi: 10.1128/IAI.70.2.878-888.2002

Kukhar, Y.; Smagulova, A.; Daniyarova, A.; Baiduissenova, A.; Kiyan, V. Candida parapsilosis as a Causative Agent of Onychomycosis in Patient with Cirrhosis of the Liver. J. Fungi 2020, 6, 313. https://doi.org/10.3390/jof6040313

Kumar, S., Bansal, A., Chakrabarti, A., & Singhi, S. (2013). Evaluation of efficacy of probiotics in prevention of candida colonization in a PICU-a randomized controlled trial. Critical care medicine, 41(2), 565–572. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31826a409c

Kunyeit L, K A AA, Rao RP. Application of Probiotic Yeasts on *Candida* Species Associated Infection. J Fungi (Basel). 2020 Sep 25;6(4):189. doi: 10.3390/jof6040189. PMID: 32992993; PMCID: PMC7711718.

Kunyeit L, Kurrey NK, Anu-Appaiah KA, Rao RP. 2019. Probiotic Yeasts Inhibit Virulence of Non-albicans Candida Species. mBio 10:10.1128/mbio.02307-19. https://doi.org/10.1128/mbio.02307-19

Laffey S.F., Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis. *Microbiology.* 2005;151:1073–1081. doi: 10.1099/mic.0.27739-0.

Lass-Flörl C, Krause R, Willinger B, et al. Clinical usefulness of susceptibility breakpoints for yeasts in the treatment of candidemia: A noninterventional study. J Fungi 2020; 6: 76. doi: 10.3390/jof6020076.

Lazo-Vélez M.A., Serna-Saldívar S.O., Rosales-Medina M.F., Tinoco-Alvear M., Briones-García M. Application of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii in food processing: A review. *J. Appl. Microbiol.* 2018;125:943–951. doi: 10.1111/jam.14037.

Leão MVP, Tavares TAA, Gonçalves E Silva CR, Dos Santos SSF, Junqueira JC, de Oliveira LD, Jorge AOC. Lactobacillus rhamnosus intake can prevent the development of Candidiasis. Clin Oral Investig. 2018 Sep;22(7):2511-2518. doi: 10.1007/s00784-018-2347-8. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29372447.

Lee D.H. The Ideal Yeast Cell Wall Product for Young Animals. (accessed on 8 Feb 2024)). Available online: https://www.poultryworld.net/Specials/Articles/2021/6/The-ideal-yeast-cell-wall-product-for-young-animals-754687E/

Lee, J. H., Kim, J., & Kim, G. Y. (2023). Synergistic Effects of a Probiotic Culture Extract and Antimicrobial Combinations against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Medicina (Kaunas,Lithuania), 59(5),947.https://doi.org/10.3390/medicina59050947

Leo, M.V.P., Tavares, T.A.A., Gonçalves e Silva, C.R. et al. Lactobacillus rhamnosus intake can prevent the development of Candidiasis. Clin Oral Invest 22, 2511–2518 (2018). https://doi.org/10.1007/s00784-018-2347-8

Liang J, Macesic N, Blakeway L. Comment on: genetically related micafungin-resistant Candida parapsilosis blood isolates harbouring novel mutation R658G in hotspot 1 of Fks1p: a new challenge? J Antimicrob Chemother 2022; 77: 1790.

Lockhart S.R., Iqbal N., Cleveland A.A., Farley M.M., Harrison L.H., Bolden C.B., Baughman W., Stein B., Hollick R., Park B.J., et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of Candida bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:3435–3442. doi: 10.1128/JCM.01283-12.

Łukaszewicz M. *Probiotics.* IntechOpen; London, UK: 2012. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*—Probiotic Yeast

Lupetti A., Tavanti A., Davini P., Ghelardi E., Corsini V., Merusi I., Boldrini A., Campa M., Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:2363–2369. doi: 10.1128/JCM.40.7.2363-2369.2002. [

Malinovská Z, Čonková E, Váczi P. Biofilm Formation in Medically Important Candida Species. J Fungi (Basel). 2023 Sep 22;9(10):955. doi: 10.3390/jof9100955. PMID: 37888211; PMCID: PMC10607155.

Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, Hill C, Holzapfel W, Lebeer S, Merenstein D, Reid G, Wolfe BE, Hutkins R. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021 Mar;18(3):196-208. doi: 10.1038/s41575-020-00390-5. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33398112; PMCID: PMC7925329.

Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Guinea J. Frequency of the Paradoxical Effect Measured Using the EUCAST Procedure with Micafungin, Anidulafungin, and Caspofungin against Candida Species Isolates Causing Candidemia. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Dec 27;61(1):e01584-16. doi: 10.1128/AAC.01584-16. PMID: 27799221; PMCID: PMC5192150.

Massire C, Buelow DR, Zhang SX, Lovari R, Matthews HE, Toleno DM, et al. PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol 2013;51:959-66.

Matsubara, V. H., Wang, Y., Bandara, H. M. H. N., Mayer, M. P. A., & Samaranayake, L. P. (2016). Probiotic lactobacilli inhibit early stages of Candida albicans biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. Applied microbiology and biotechnology, 100(14), 6415–6426. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7527-3

McFarland L. V Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol. WJG*. 2010;16:2202. doi: 10.3748/wjg.v16.i18.2202.

McFarland, L. V Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. ACG* **2006**,

McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans. *Infect Genet Evol*. 2014;21(January 2016):166-178. doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.008

Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, et al. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazoleresistant Candida parapsilosis. Mycoses 2020; 63: 361–8. doi: 10.1111/myc.13050.

Mete B, Zerdali EY, Aygun G, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2021; 40: 325–33. doi: 10.1007/s10096-020-03994-6.

Miranda LDN, Rodrigues EC a., Costa SF, et al. Candida parapsilosis candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. BMJ Open. 2012;0:e000992. doi:10.1136/bmjopen-2012-000992.

Mitchell K.F., Zarnowski R., Sanchez H., Edward J.A., Reinicke E.L., Nett J.E., Mitchell A.P., Andes D.R. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112:4092–4097. doi: 10.1073/pnas.1421437112

Modiri M, Hashemi SJ, GhazvinI RD, Khodavaisy S, Ahmadi A, Ghaffari M, Rezaie S. Antifungal susceptibility pattern and biofilm-related genes expression in planktonic and biofilm cells of *Candida parapsilosis* species complex. Curr Med Mycol. 2019;5(4):35-42. doi: 10.18502/cmm.5.4.1950. PMID: 32104742; PMCID: PMC7034785.

Modiri M, Khodavaisy S, Barac A, Akbari Dana M, Nazemi L, Aala F, Salehi M, Rezaie S. Comparison of biofilm-producing ability of clinical isolates of Candida parapsilosis species complex. J Mycol Med. 2019 Jun;29(2):140-146. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.02.003. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30871787.

Mukherjee P.K., Chandra J. Candida biofilm resistance. *Drug Resist. Updat.* 2004; 7:301–309. doi: 10.1016/j.drup.2004.09.002.

Murphy SE, Bicanic T. Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Dec 14;11:759408. doi: 10.3389/fcimb.2021.759408. PMID: 34970504; PMCID: PMC8713075.

Nemeth T., Toth A., Szenzenstein J., Horvath P., Nosanchuk J.D., Grozer Z., Toth R., Papp C., Hamari Z., Vagvolgyi C., et al. Characterization of virulence properties in the C. parapsilosis sensu lato species. *PLoS ONE.* 2013;8:e68704. doi: 10.1371/journal.pone.0068704

Neppelenbroek KH, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014;20(4):329-44. 65.

Ning Y., Xiao M., Perlin D.S., Zhao Y., Lu M., Li Y., Luo Z., Dai R., Li S., Xu J., et al. Decreased echinocandin susceptibility in Candida parapsilosis causing candidemia and emergence of a pan-echinocandin resistant case in China. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12:2153086. doi: 10.1080/22221751.2022.2153086.

Odds F.C., Brown A.J.P., Gow N.A.R. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003;11:272–279. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3.

Pammi M., Holland L., Butler G., Gacser A., Bliss J.M. Candida parapsilosis is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013;32:e206–e216. doi: 10.1097/INF.0b013e3182863a1c

Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A.C., Schuster M.G., Vazquez J.A., Walsh T.J., et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2016;62:e1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933.

Paramythiotou E., Frantzeskaki F., Flevari A., Armaganidis A., Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. *Molecules.* 2014;19:1085–1119. doi: 10.3390/molecules19011085

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods 2008; 72: 157–65.

Pericolini E, Gabrielli E, Ballet N, Sabbatini S, Roselletti E, Cayzeele Decherf A, Pelerin F, Luciano E, Perito S, Justen P, Vecchiarelli A. 2017. Therapeutic activity of a *Saccharomyces cerevisiae*-based probiotic and inactivated whole yeast on vaginal candidiasis. *Virulence* 8:74–90. doi: 10.1080/21505594.2016.1213937

Perlin D.S. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol.* 2011;6:441–457. doi: 10.2217/fmb.11.19.

Pfaller M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am. J. Med.* 2012;125:S3–S13. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2008;46(3):842-849. doi:10.1128/JCM.02122-07 .

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-163. doi:10.1128/CMR.00029-06.

Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tummala, S., & Lopez-Ribot, J. L. (2010). A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. J Vis Exp(44). doi:10.3791/2287

Pitarch A, Nombela C, Gil C. Diagnosis of invasive candidiasis: From gold standard methods to promising leading-edge technologies. Curr Top Med Chem 2018;18:1375-92

Prasanna, S., Partha Roy, Naveen Grover, Puneet Bhatt, Dudhat Vaibhav Laxmikant Rao and Nikunja Kumar Das. 2016. A Comparative Analysis on Identification and Antifungal Susceptibility Profile of Candida Isolates Using Conventional and Automated Techniques Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 5(3): 579-589.doi: http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.067

Pristov KE, Ghannoum MA.2019. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. Clinical Microbiology and Infection 25:792-798. 12.

Qamar, A.; Aboudola, S.; Warny, M.; Michetti, P.; Pothoulakis, C.; LaMont, J.T.; Kelly, C.P. Saccharomyces boulardii stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to Clostridium difficile toxin A in mice. Infect. Immun. 2001, 69, 2762–2765.

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL.2006. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS yeast research 6:979-986. 56.

Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3396-8.

Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, et al.. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl 1:4680-7; PMID:20534435; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002611107

Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard - Third Edition. Vol 28.; 2008.

Ribeiro, F.C., de Barros, P.P., Rossoni, R.D., Junqueira, J.C. and Jorge, A.O. (2017) *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors *in vitro* and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol* 122, 201– 211.

Robbins N., Caplan T., Cowen L.E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 2017;71:753–775. doi: 10.1146/annurev-micro-030117-020345

Rodrigues, M. E., Lopes, S. P., Pereira, C. R., Azevedo, N. F., Lourenco, A., Henriques, M., & Pereira, M. O. (2017). Polymicrobial Ventilator-Associated Pneumonia: Fighting In Vitro Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa Biofilms with Antifungal-Antibacterial Combination Therapy. PLoS One, 12(1), e0170433. doi:10.1371/journal.pone.0170433

Rossoni, R.D., Barbosa, J.O., de Oliveira, F.E., de Oliveira, L.D., Jorge, A.O. and Junqueira, J.C. (2014) Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 29, 1679– 1684.

Routsi C, Meletiadis J, Charitidou E, et al. Epidemiology of candidemia and fluconazole resistance in an ICU before and during the COVID-19 pandemic era. Antibiotics 2022; 11: 771. doi: 10.3390/antibiotics11060771

Ruchel R., Boning B., Borg M. Characterization of a secretory proteinase of Candida parapsilosis and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. *Infect. Immun.* 1986;53:411–419. doi: 10.1128/iai.53.2.411-419.1986.

Rupert CB, Rusche LN. The Pathogenic Yeast Candida parapsilosis Forms Pseudohyphae through Different Signaling Pathways Depending on the Available Carbon Source. mSphere. 2022 Jun 29;7(3):e0002922. doi: 10.1128/msphere.00029-22. Epub 2022 May 9. PMID: 35766504; PMCID: PMC9241547.

Sabbatini S, Monari C, Ballet N, Decherf AC, Bozza S, Camilloni B, Perito S, Vecchiarelli A. Anti-Biofilm Properties of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103 Probiotics against *G. vaginalis*. Microorganisms. 2020 Aug 24;8(9):1294. doi: 10.3390/microorganisms8091294. PMID: 32847138; PMCID: PMC7564297.

Saidi N, Owlia P, Marashi SMA, Saderi H. Inhibitory effect of probiotic yeast Saccharomyces cerevisiae on biofilm formation and expression of α-hemolysin and enterotoxin A genes of Staphylococcus aureus. Iran J Microbiol. 2019 Jun;11(3):246-254. PMID: 31523409; PMCID: PMC6711867.

Sanglard D., Odds F.C. Resistance of Candida species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2002;2:73–85. doi: 10.1016/S1473-3099(02)00181-0.

Shin J.H., Kee S.J., Shin M.G., Kim S.H., Shin D.H., Lee S.K., Suh S.P., Ryang D.W. Biofilm production by isolates of Candida species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1244–1248. doi: 10.1128/JCM.40.4.1244-1248.2002.

Shruthi B, Deepa N, Somashekaraiah R, Adithi G, Divyashree S, Sreenivasa MY: Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: a review. Biotechnol Rep (Amst). 2022, 34:e00716. 10.1016/j.btre.2022.e00716

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol (2009) 47:681–9. doi:10.3109/13693780802549594

Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. *Trends Microbiol.* 2011;19:241–247. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003.

Silva S., Rodrigues C.F., Araujo D., Rodrigues M.E., Henriques M. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J. Fungi.* 2017;3:8. doi: 10.3390/jof3010008.

Simren, M.; Ohman, L.; Olsson, J.; Svensson, U.; Ohlson, K.; Posserud, I.; Strid, H. Clinical trial: The effects of a fermented milk containing three probiotic bacteria in patients with irritable bowel syndrome—A randomized, double-blind, controlled study. Aliment. Pharmacol. Ther. **2010**, 31, 218–227.

Sivignon ADVA, Barnich N, Denizot J, Darcha C, Pignède G, Vandekerckove P, Darfeuille-Michaud A. Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 2014; 21:276-86; http://dx.doi.org/ 10.1097/MIB.0000000000000280

Sónia Silva, Melyssa Negri, Mariana Henriques, Rosário Oliveira, David W. Williams, Joana Azeredo, *Candida glabrata, Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, *FEMS Microbiology Reviews,* Volume 36, Issue 2, March 2012, Pages 288–305, https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

Spurbeck, R.R. and Arvidson, C.G. (2010) *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 78, 3103– 311

Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods* **2021**, *10*, 1306. https://doi.org/10.3390/foods10061306

Stevens DA, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H. Escape of Candida from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep;50(9):3160-1. doi: 10.1128/AAC.00563-06. PMID: 16940118; PMCID: PMC1563524.

Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. The distinct morphogenic states of Candida albicans. Trends Microbiol. **2004**, 12, 317–324.

Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM. A multiplex nested PCR for the detection and identification of Candida species in blood samples of critically ill paediatric patients. BMC Infect Dis. 2014; 14: 406

Tamura T, Alshahni MM, Makimura K. Evaluation of CHROMagar™ Candida Plus chromogenic agar for the presumptive identification of Candida auris. Microbiol Immunol. 2022 Jun;66(6):292-298. doi: 10.1111/1348-0421.12973. Epub 2022 Apr 7. ~~PMID: 35229341.~~

Thomaz DY, de Almeida JNJ Jr, Sejas ONE, et al. Environmental clonal spread of azole-resistant Candida parapsilosis with Erg11Y132F mutation causing a large candidemia outbreak in a Brazilian Cancer Referral Center. J Fungi (Basel) 2021; 7: 259. 5

Thyab Gddoa Al-sahlany, S.; Altemimi, A.B.; Al-Manhel, A.J.A.; Niamah, A.K.; Lakhssassi, N.; Ibrahim, S.A. Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods* **2020**, *9*, 324.

Tomičić Z., Zupan J., Matos T., Raspor P. Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) modulates adhesive properties of Candida glabrata. *Sabouraudia.* 2016;54:835–845. doi: 10.1093/mmy/myw026.

Tosun I., Akyuz Z., Guler N.C., Gulmez D., Bayramoglu G., Kaklikkaya N., Arikan-Akdagli S., Aydin F. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of Candida parapsilosis complex strains isolated from clinical samples. *Med. Mycol.* 2013;51:483–492. doi: 10.3109/13693786.2012.745953.

Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, Turner SA, Butler G, Vágvölgyi C, Gácser A.2019. Candida parapsilosis: from genes to the bedside. Clinical microbiology reviews 32:e00111-18.

Trofa, D., Gácser, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews, 21*(4), 606–625. http://doi.org/10.1128/CMR.00013-08

Tung, J.M.; Dolovich, L.R.; Lee, C.H. Prevention of Clostridium difficile infection with Saccharomyces boulardii: A systematic review. Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol. **2009**, 23, 817–821

Türkiye Probiyotik Rehberi, Ürünler https://www.probiyotikrehberi.com/Probiyotikler.aspx Erişim Tarihi:20 Nisan 2024

Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect 2018;24(Suppl 1):e1-e38.

Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza O, Buitrago MJ. New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol 2016;54:2910-8.

Van Asbeck EC, Clemons K V, Stevens DA. Candida parapsilosis: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):283-309. doi:10.3109/10408410903213393.

Wagener J, Loiko V. Recent Insights into the Paradoxical Effect of Echinocandins. J Fungi (Basel). 2017 Dec 28;4(1):5. doi: 10.3390/jof4010005. PMID: 29371498; PMCID: PMC5872308.

Walsh TH, Hayden TH, Larone DH. Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 2018.

Wartenberg, A.; Linde, J.; Martin, R.; Schreiner, M.; Horn, F.; Jacobsen, I.D.; Jenull, S.; Wolf, T.; Kuchler, K.; Guthke, R.; et al. Microevolution of Candida albicans in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. PLoS Genet. **2014**, 10, e1004824.

Whaley, S.G.; Berkow, E.L.; Rybak, J.M.; Nishimoto, A.T.; Barker, K.S.; Rogers, P.D. Azole Antifungal Resistance in Candida albicans and Emerging Non-albicans Candida Species. Front. Microbiol. **2016**,

Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S.M.; Seifert, H.; Wenzel, R.P.; Edmond, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis. **2004**, 39, 309–317.

World Gastroenterology Organisation. Probiotics and prebiotics. 2017 (Erşim Tarihi 4 Nisan 2024 https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english

Wu Y, Min F, Pan J, Wang J, Yuan W, Zhang Y, Huang R, Zhang L. Systemic Candida parapsilosis Infection Model in Immunosuppressed ICR Mice and Assessing the Antifungal Efficiency of Fluconazole. Vet Med Int. 2015;2015:370641. doi: 10.1155/2015/370641. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26240775; PMCID: PMC4512613.

Xafranski H, Melo AS, Machado AM, Briones MR, Colombo AL. A quick and low-cost PCR-based assay for Candida spp. identification in positive blood culture bottles. BMC Infect Dis. 2013; 13: 467.

Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J, et al. Comparison of API20C with molecular identification of Candida spp isolated from bloodstream infections. J Clin Pathol. 2002; 55(10): 774-7

Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of Candida strains isolated from blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 73(1): 65-7

Yamin D, Akanmu MH, Al Mutair A, Alhumaid S, Rabaan AA, Hajissa K. Global Prevalence of Antifungal-Resistant Candida parapsilosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Trop Med Infect Dis. 2022 Aug 16;7(8):188. doi: 10.3390/tropicalmed7080188. PMID: 36006280; PMCID: PMC9416642.

Yamin DH, Husin A, Harun A. Risk Factors of Candida parapsilosis Catheter-Related Bloodstream Infection. Front Public Health. 2021 Aug 12;9:631865. doi: 10.3389/fpubh.2021.631865. PMID: 34458217; PMCID: PMC8387826.

Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(3): 465- 84.

Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Karhu J, Koskela M, Laurila J, Ohtonen P, Syrjälä H.2012. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment. Critical Care 16:R62.

.