

764079



T.C
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HASTANEDE YATAN HASTALARIN KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *TRICHOSPORON ASAHII* KÖKENLERİNDE BAZI
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYLİN DAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. NİLGÜN ÇERİKÇİOĞLU

İSTANBUL - 2005

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Nilgün Çerikçioğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde akademik katkılarından ve her konuda vermiş oldukları destekten dolayı değerli hocalarıma,

Tüm yüksek lisans arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Aileme,

Ve üzerimde emeği olan herkese teşekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR	IV
KISALTMALAR	VI
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. <i>Trichosporon asahii</i> 'in Genel Özellikleri	7
4.2. Epidemiyoloji	8
4.3. Virülans Faktörleri	13
4.3.1. Salgısal Asit Proteinaz Enzimi (SAP)	14
4.3.2. Fosfolipaz Enzimi	16
4.3.3. Esteraz Enzimi	17
4.3.4. Yüzey Hidrofobisitesi	18
4.3.5. Sıvışik Örtü	19
5. GEREÇ VE YÖNTEM	22
5.1. GEREÇLER	22
5.1.1. <i>Trichosporon asahii</i> Kökenleri	22
5.1.2. Standart Kökenler	22
5.1.3. Besiyerleri	22
5.1.4. Şekerler	23
5.1.5. Kimyasal Maddeler	23
5.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler	24
5.1.7. Boyalar	24
5.1.8. Filtreler	25
5.1.9. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar	25

5.2. YÖNTEMLER	27
5.2.1. Mısır unlu - tween 80'li agar besiyerinde morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	27
5.2.1.1. Besiyerinin Hazırlanması	27
5.2.1.2. Deneyin yapılışı	27
5.2.2. Asit Proteinaz Deneyi	28
5.2.2.1. Besiyerinin Hazırlanması	29
5.2.2.2. Deneyin yapılışı	29
5.2.3. Fosfolipaz Deneyi	31
5.2.3.1. Besiyerinin Hazırlanması	31
5.2.3.2. Yumurta sarısının hazırlanması	31
5.2.3.3. Deneyin yapılışı	32
5.2.4. Esteraz Deneyi	34
5.2.4.1. Besiyerinin Hazırlanması	34
5.2.4.2. Deneyin yapılışı	34
5.2.5. Hücre Yüzey Hidrofobisitesinin Ölçülmesi	35
5.2.5.1. Hidrokarbon Adezyon Yöntemi	35
5.2.5.2. Polistiren Mikroküre Yöntemi	37
5.2.5. Sıvıışık Örtü Üretiminin Araştırılması	39
6. BULGULAR	40
6.1.Çalışmada Kullanılan <i>Trichosporon asahii</i> Kökenlerinin Klinik Materyallere Göre Dağılımı	40
6.2. <i>Trichosporon asahii</i> Kökenlerinin Virülans Faktörlerinin Değerlendirilmesi	40
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
8. KAYNAKLAR	57
9. ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR

	Sayfa no
i) Şekil Listesi	
Şekil 1: Fosfolipaz aktivitesi için Pz değerinin hesaplanması	33
ii) Resimlerin Listesi	
Resim 1: Patates dekstroz agarda CBS 2479 <i>T. asahii</i> var. <i>asahii</i> 'nin koloni morfolojisi	7
Resim 2: Mısır unlu-tween 80 agarda <i>T. asahii</i> 'nin hifal formları ve yalancı hif yapıları	28
Resim 3: Mısır unlu-tween 80 agarda <i>T. asahii</i> 'nin oluşturduğu artrosporlar	28
Resim 4: Asit proteinaz negatif <i>T. asahii</i> kökeni	30
Resim 5: <i>Candida albicans</i> CBS 2730, salgısal asit proteinaz üreten köken	31
Resim 6: Fosfolipaz pozitif <i>Candida albicans</i> SC 5314 kökeni ve negatif <i>Trichosporon asahii</i> kökeni	32
Resim 7: Fosfolipaz negatif ve yalancı fosfolipaz presipitasyon zonu oluşturan <i>T. asahii</i> kökeni.	34
Resim 8: Esteraz aktivitesi a-b; pozitif , c-d; negatif <i>T. asahii</i> kökenleri	35
Resim 9: Hidrokarbon adezyon yöntemi; a- yüzey hidrofobik özelliği düşük olan köken, b-yüzey hidrofobik özelliği yüksek köken	36
Resim 10: Polistiren mikroküre yönteminde boncuklarla bağlanan maya hücreleri	38
Resim 11: Polistiren mikroküre yönteminde boncuklarla bağlanmayan maya hücreleri	38
Resim 12: Tüp aderens yöntemi ile sıvışik örtü üretimi; a: (+++), b: (++), c: (+), d: (-)	39
Resim 13: Polistiren mikrokürelerin hifal formdaki maya hücrelerine Bağlanması	54

iii) Tabloların Listesi

Tablo 1: <i>Trichosporon</i> cinsi içindeki patojen ve olası patojen türler	9
Tablo 2: <i>Trichosporon</i> türlerine bağlı yaygın infeksiyonla ilişkili altta yatan hastalıklar	11
Tablo 3: <i>Trichosporon</i> türleri ile ilişkili olan yaygın infeksiyon olgularının klinik belirtileri	11
Tablo 4: Çalışmada kullanılan <i>Trichosporon asahii</i> izolatlarının klinik materyallere göre dağılımı	40
Tablo 5: Esteraz aktivitesinin günlere göre dağılımı	41
Tablo 6: <i>Trichosporon asahii</i> kökenlerinin hidrokarbon adezyon yöntemi ile saptanan yüzey hidrofobik özellikleri	42
Tablo 7: Çalışmaya alınan kökenlerin sıvıışık örtü üretim sonuçları	43
Tablo 8: Tüm deneylere ait sonuçlar	44
Tablo 9: <i>Trichosporon asahii</i> izolatlarının esteraz, fosfolipaz ve asit proteinaz aktiviteleri, yüzey hidrofobisite değerleri ve sıvıışık örtü üretimleri	45

KISALTMALAR

SDA	Sabouraud dekstroz agar
SGA	Sabouraud glikoz agar
PDA	Patates dekstroz agar
SGB	Sabouraud glikoz buyyon
SB	Sabouraud buyyon
MEA	Malt özütü (ekstrakt) agar
YEPD	Yeast extract peptone dextrose
SAP	Salgısal asit proteinaz
PUM	Potasyum üre magnezyum tamponu (K_2HPO_4 , Üre, $MgSO_4$)
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
Ig	İmmünoglobulin
Pz	Presipitasyon zonu
PIA	Polisakkarit intersellüler adesin
CBS	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
ATCC	American Type Culture Collection

1. ÖZET

Seyrek rastlanmasına rağmen antifungal tedaviye görece dirençli olan *Trichosporon* cinsinde yer alan *Trichosporon asahii* tüm dünyada olduğu gibi, hastanemizde yatmakta olan hastaların da klinik örneklerinden artan sıklıkta izole edilen tür olarak dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada 43 tanesi idrar, 1 tanesi periton, 1 tanesi dil sürüntüsü, 1 tanesi kan, 1 tanesi nefrostomi örneklerinden ve ayrıca 1 tanesi de saprofit olarak tırnaktan izole edilen toplam 48 adet *T. asahii* kökeninde; salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz aktiviteleri, sıvışik örtü (slime) üretme ve hidrofobisite özellikleri olmak üzere olası virülans faktörlerinin varlığı araştırılmıştır.

Çalışma kapsamına alınan 48 *T. asahii* kökeninin hiçbirinde salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzimi üretimine rastlanmazken, kökenlerin hepsinde esteraz aktivitesi bulunmuştur. Yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesinde, hidrokarbon olarak n-hekzadekan kullanıldığında, 4 köken orta düzeyde hidrofobik; 43 köken düşük düzeyde hidrofobik özellik sergilerken; 1 kökende ise yüzey hidrofobik özellik saptanmamıştır. Hidrokarbon olarak p-ksilen kullanıldığında 13 köken az hidrofobik olarak bulunurken, 35 kökende yüzey hidrofobik özellik negatif bulunmuştur. Yüzey hidrofobisitesinin ölçülmesinde kullanılan ikinci yöntem olan polistiren mikroküre deneyinde, elde edilen değerler % 53.2 ile % 92.7 arasında olup, hidrofobisite kökenler arasında değişen oranlarda saptanmıştır. Kökenlerin sıvışik örtü üretimini saptamak için kullanılan modifiye tüp aderens yönteminde; 10 köken orta (++) pozitif, 18 köken zayıf (+) pozitif olarak sıvışik örtü üretimi gösterirken, 20 köken ise (-) negatif saptanmıştır.

Çalışmamız olası virülans faktörlerinden salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi açısından literatürdeki ikinci çalışma olup, esteraz aktivitesi, yüzey hidrofobisitesi ve sıvışik örtü üretme özelliklerinin saptanması açısından ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz verilerin *T. asahii* türünün virülansı hakkında literatüre destek vereceğini düşünmekteyiz. Ancak, bu bulguların

virülansla ilişkilerinin net olarak belirlenebilmesi açısından klinik verilerle birlikte değerlendirilmeye gidilecek çalışmaların gerekli olduğu görüşünderiz.



2. SUMMARY

Investigation of Some Virulence Factors of *Trichosporon asahii* Strains Isolated From the Clinical Samples of Hospitalized Patients

In genus *Trichosporon* with relative resistance to antifungal therapy, *T. asahii* has emerged as a frequently isolated species from the clinical specimens of hospitalized patients in Turkish hospitals including Marmara University Hospital as well as in other parts of the world.

In this study; acid proteinase, phospholipase, esterase activities, slime production and hydrophobic properties of a total of 48 *T. asahii* strains isolated from urine (43), periton (1), tongue (1), blood (1), nephrostomy (1) and nail (1) as a saprophyte were investigated.

In none of the 48 strains acid proteinase and phospholipase activities could be detected, while all were found to be esterase positive. In hydrocarbon assay performed with n-hexadecane 4 strains exhibited moderate hydrophobicity; while 43 strains showed low level hydrophobicity and 1 strain was found to be negative. When p-xylene was used as hydrocarbon source, 13 strains were found to be weakly hydrophobic; while remaining 35 strains did not exhibit surface hydrophobicity. In the second procedure to measure hydrophobicity by using microspheres assay, the results were found to be changing from strain to strain with the lowest and the highest values between 53.2 % and 92.7 %. Establishing the production of slime, modified tube assay was performed. Ten strains were found to be mild producers (++), 18 strains were weakly (+) and 20 strains were defined as non-slime producers.

Our study is to be the second in the literature in terms of investigation of acid proteinase and phospholipase activities, but the first for determining the existence of esterase activity, surface hydrophobicity and slime production in *T. asahii* strains. We may suggest that our results related to the presumptive virulence factors of *T. asahii* will contribute to the literature. However, to validate the clearcut relationships between the

virulence factors and pathogenesis of the infections, further studies including clinical evaluations must be carried out.



3.GİRİŞ VE AMAÇ:

Doğada yaygın olarak bulunan mantar türleri, son 20 yılda tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere paralel olarak tıpta da giderek artan bir önem kazanmaya başlamıştır. Organ ve doku transplantasyonu ve yapay protez takılması gibi cerrahi girişimlerin günümüzde sık uygulanması, özellikle hematolojik maligniteli hastalarda daha etkili kemoterapötik tedaviyle yaşam sürelerinin uzatılması çabaları, geniş etkili antibiyotiklerin daha yaygın bir şekilde kullanılması, hiperalimentasyon tedavisinin uygulanması gibi nedenlerle mantar infeksiyonlarına duyarlı kişi sayısı artmıştır; AIDS hastalığının da bu artışta önemli yeri vardır (61).

Yeryüzünde 50 bin ile 250 bin arasında mantar türü olduğu bilinmekle beraber, 500 kadarı insanlarda hastalıklarla ilişkilendirilirken, bunların da ancak 100 kadarı sıklıkla infeksiyonlardan izole edilmektedir (67). *Candida albicans* insanda hastalık etkeni olarak en sık karşılaşılan tek hücreli fungal patojen olmayı sürdürse de, kandida dışı mantarların da klinik önemi artmıştır (23).

Son yıllara kadar klinik örneklerden izole edilen *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria* ve *Trichosporon* gibi cinsler kontaminant veya zararsız kolonizasyon etkenleri olarak değerlendirilmiştir. Ancak duyarlı hasta gruplarında; özellikle immünsüprese, sitotoksik kemoterapi ve organ transplantasyonu uygulanan hastalarda yaşamı tehdit eden ciddi infeksiyonlara yol açmaları, dikkatlerin bu mantarlar üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (4, 23).

Son 20 yıl içinde özellikle hematolojik malignitesi olan nötroopenik hastalarda antifungallere direnç gösteren ve nadir olarak infeksiyon oluşturan mantarlar, etken olarak artan sıklıkta izole edilmeye başlanmıştır. Seyrek rastlanmasına rağmen antifungal tedaviye görece dirençli olan *Trichosporon* cinsinde yer alan mayalar da bu mantarlar arasındadır ve patojenik potansiyelleri son zamanlarda çalışılmaya başlanmıştır (76).

Literatürde *Trichosporon* cinsi içinde yaklaşık olarak 30 tür tanımlanmış olup, bunlardan 6 tanesi insanda infeksiyon etkeni olarak en sık rastlanan türleri oluşturmaktadır (1, 43, 82, 84). Bunlar arasında *T. asahii*, tüm dünyada olduğu gibi, hastanemizde yatmakta olan hastaların da klinik örneklerinden en sık izole edilen *Trichosporon* türü olarak dikkat çekmektedir.

İzolasyon sıklıklarındaki bu çarpıcı artışa karşın, literatür taraması yapıldığında, bu mantara bağlı olarak gelişen infeksiyonların patogenezinde rol alabilecek olan fungal virulans faktörlerinin araştırıldığı kapsamlı çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu verilerden yola çıkarak 2000 yılından itibaren ve çoğunluğu 2002-2003 yılları arasında olmak üzere, Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *T. asahii* kökenlerinin olası virulans faktörlerinden salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz aktivitelerinin, sıvı sık örtü üretme ve hidrofobisite özelliklerinin araştırılması ve elde edilen verilerin ışığı altında, bu türe bağlı olarak gelişen infeksiyonların patogenezinde hangi virulans faktörü ya da faktörlerinin rol oynayabileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Trichosporon asahii*'in Genel Özellikleri

Trichosporon cinsi mayalar; *Basidiomycota* sınıfındaki *Hymenomyces* takımının *Trichosporonales* ailesi üyesidirler. *Trichosporon* türlerinin bir çoğu doğada (toprak, su ve bitki) yaygın olarak bulunmakla birlikte; sadece 8 türü insan ve sığırlardan hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. Ayrıca, insanda deri, solunum yolları, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde normal flora üyesi olarak da yer alabilmektedirler (23, 30, 57, 82, 84).

Makroskobik olarak, düzgünden buruşuğa kadar değişebilen, krem renginde, yumuşak kıvamlı ve parlak koloniler oluştururlar (Resim 1). Genç koloniler genelde krem renkli ve yumuşak iken, daha sonra koloni yaşlandıkça etrafındaki zarsı kısımda ışınsal oluklanmalar ve düzensiz kıvrımlar oluşur (37).



Resim 1: Patates dekstroz agarda CBS 2479
T. asahii var. asahii'nin koloni morfolojisi.

Sabouraud dekstroz agar (SDA) veya patates dekstroz agar (PDA) besiyerlerinde koloniler 5-7 günde olgunlaşırlar (54). Ayrıca, kültür karakteristiklerini tanımlamak için kloramfenikol içermeyen Sabouraud glukoz

agar (SGA), morfotiplendirme için ise % 2'lik malt özütü (ekstrakt) agar (MEA) kullanılabilir (30).

Mikroskopik olarak; mısır unlu-tween 80'li agarda 25 °C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra, hiyalen septalı hifler ve yalancı hifler oluştururlar (Resim 2). Ayrıca, bu hifler boyunca oval veya köşeli, 2-4 x 3-9 µm boyutunda artrosporlar veya blastosporlar oluşturdukları gözlenmektedir (Resim 3). Geniş bir ısı aralığında (25-40 °C) üreme yeteneğine sahip olup, ortalama üreme ısıları 30 °C'dir (23, 37, 54).

Trichosporon asahii türleri karbonhidratları fermente etmezler ve üreaz reaksiyonu olumluurlar. Dekstroz, laktoz, ksiloz ve inozitol asimilasyonu pozitif iken potasyum nitrat asimilasyonu negatiftir. Sükroz, maltoz, galaktoz, trehaloz, sellobiyoz, rafinoz, L-arabinoz ve eritritol gibi karbon bileşiklerini bazı kökenler asimile ederken bazıları etmez (13, 23, 30, 37, 57).

4.2. Epidemiyoloji:

Trichosporon türlerinin neden olduğu infeksiyonlar trikosporoz (trichosporonosis) olarak isimlendirilir. Son yıllarda artan sıklıkta klinik örneklerden izole edilmeye başlanan tıbbi öneme sahip *Trichosporon* türleri sistemik veya mukoza ile ilişkili ya da beyaz piedrayı da içine alan yüzeysel infeksiyonlara sebep olabilirler (23, 81).

Yüzeysel mikozlara neden olan kökenlerle derin infeksiyonlara yol açan kökenlerin morfolojik, fizyolojik ve genetik olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle *Trichosporon* türleri taksonomik gruplandırmaya alınmıştır (23). Gueho ve arkadaşlarının (25) 1992 yılında yapmış oldukları ilk önemli taksonomik sınıflamasından sonra Sugita ve çalışma grubu (82) 1999'da yaptıkları son taksonomik sınıflandırma ile, insanda infeksiyon etkeni olabilen altı *Trichosporon* türü tanımlanmış olup bunlar; *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin* ve *T. ovoides*'tir. Ayrıca farklı türler olarak bilinen *T. cutaneum* ve *T. beigelii*, 2002 yayınlarında birbirlerinin sinonimi olarak belirtilmiştir (1, 13, 30, 43, 81, 83, 84).

Trichosporon asahii, *T. mucoides* başlıca sistemik infeksiyon; *T. asteroides*, *T. cutaneum* yüzeysel infeksiyon; *T. ovoides* (baş) ve *T. inkin* (genital bölge) beyaz piyendra etkenidirler (13, 30, 43, 81). Bu altı türe ek olarak artan sayıda farklı *Trichosporon* türleri izole edilip tanımlanmaya devam edilmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. *Trichosporon* cinsi içindeki patojen ve olası patojen türler (57).

Tür	Habitat	Patojenite
<i>T. asahii</i>	Bitki/salyangoz	Yüzeysel ve sistemik
<i>T. asteroides</i>	Bilinmiyor	Yüzeysel ve sistemik
<i>T. brassicae</i>	Bitki	Bilinmiyor
<i>T. coremiiforme</i>	Toprak,kuşlar	Yüzeysel ve sistemik
<i>T. cutaneum</i>	Lağım birikintisi	Yüzeysel
<i>T. dermatis</i>	Bilinmiyor	Yüzeysel
<i>T. domesticum</i>	Toprak, çürümekte olan ağaç	Bilinmiyor
<i>T. faecale</i>	İnsan dışkısı	Bilinmiyor
<i>T. guehoae</i>	Toprak	Bilinmiyor
<i>T. inkin</i>	Bilinmiyor	Yüzeysel
<i>T. japonicum</i>	Toprak	Bilinmiyor
<i>T. jirovecii</i>	Yaprak kemiren karıncalar	Yüzeysel
<i>T. loubieri</i>	Toprak, yenen mantarlar	İnekte mastit
<i>T. montevidensis</i>	Su, insan dışkısı	Bilinmiyor
<i>T. mucoides</i>	Toprak	Yüzeysel ve sistemik
<i>T. ovoides</i>	Bilinmiyor	Yüzeysel
<i>T. veenhuisii</i>	Bizon gübresi	Bilinmiyor

Trikosporoz genelde nütropenik ve hematolojik malignitesi olan immünsüprese hastalarda gelişir. Bunun dışında; aplastik anemi, organ transplantasyonu, AIDS ve solit tümörü olan immün sistemi baskılanmış hastalar ile intravenöz ilaç bağımlıları, CAPD'li (kronik ayaktan periton diyalizi), prostatik kalp kapağı olan, topikal kortikosteroid kullanan ve belirgin bir immün baskılanmanın

olmadığı düşkün hastalar arasında da gelişen olgular bulunmaktadır (13, 23, 43, 30, 57, 81).

Trichosporon türlerinin neden olduğu infeksiyonlarda, ateş, yaygın papülopüstüler kutanöz lezyonlar ve akciğer tutulumunu da kapsayan klinik semptomlar gözlenmektedir. İnvaziv infeksiyonlar, aşırı duyarlılık pnömonisi ve beyaz piedra risk faktörleri bulunan hasta gruplarında *Trichosporon* türlerinin neden olduğu en sık rastlanan infeksiyonlardır.

Yaygın sistemik trikosporozlu hastaların % 90'dan fazlasında etken *T. asahii*'dir ve bu hastaların çoğu altta yatan hematolojik malignite, nötropeni veya sitotoksik kemoterapi gibi başka bir sistemik hastalığa sahiptir. *Trichosporon asahii*'nin neden olduğu invaziv trikosporoz yüksek mortalite oranı ve kötü prognozuyla hayatı tehdit edici bir infeksiyondur (43).

Risk faktörleri bulunan bu hasta gruplarında oluşan yaygın sistemik trikosporoz birçok yönü ile kandidoza benzer ve akut ya da kronik seyirli olabilir. Akut olgular fungemi, fungüri, çoklu deri lezyonları, oküler tutulum ile karakterize iken; örneğin *T. cutaneum* ile oluşan kronik olgularda ise hepatosplenik kandidoza benzer tablo oluşur (23).

Trichosporon türlerinin etken olduğu hastalıklarda amfoterisin-B ve flukonazol içeren antifungal tedaviye rağmen ölüm oranının % 74 - 88 (~ % 78) arasında olduğu bildirilmiştir (1, 25, 84).

Literatür verilerinin taranması ile özellikle nötropenik hastalarda 1974-2002 yılları arasında *T. asahii*'yi de içeren *Trichosporon* türlerinin yaygın infeksiyon etkeni olarak izole edildiği toplam 70 olgunun varlığı bildirilmiştir. İlk olgu Teksas'ta tanımlanmış olup (68), diğer olgular Amerika, Avrupa ve Asya gibi dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmiştir (25).

Tanımlanan bu 70 olguda yaş ortalaması 39 olup, erkek / kadın oranı 3:1'dir. Olguların yaklaşık % 90'ının nötropeni nedeni hematolojik malignite olup, infeksiyon ateş ile seyretmektedir (Tablo 2).

Tablo 2: *Trichosporon* türlerine bağlı yaygın infeksiyonla ilişkili alta yatan hastalıklar (25).

Hastalık	Olgu sayısı (%)
Akut lösemi	52 (74)
Akut miyeloid lösemi	36 (51)
Akut lenfoid lösemi	11 (16)
Diğer akut lösemiler	5 (7)
Lenfoma	5 (7)
Spesifik olmayan hemopati	3 (4)
Kronik lenfoid lösemi	3 (4)
Kronik miyeloid lösemi	2 (3)
Diğer	5 (7)
Toplam	70 (100)

Kutanöz lezyonlar % 43 oranında olmakla beraber genellikle yaygın, bazen nekrotik alanlar şeklinde papülonodüler ya da püstüler olarak gözlenmektedir. Pulmoner lezyonlar ise olguların % 30'unda (Tablo 3) gözlenmektedir (25).

Tablo 3: *Trichosporon* türleri ile ilişkili olan yaygın infeksiyon olgularının klinik belirti ve bulguları (25).

Klinik Belirtiler	Olgu sayısı (%)
Ateş	63 (90)
Kutanöz lezyonlar	30 (43)
Akciğer tutulumu	21 (30)
Karaciğer apsisi	4 (6)
Dalak apsisi	3 (4)
Kemik/eklem tutulumu	2 (3)
Retinal lezyonlar	2 (3)

Özellikle immünsüprese hastalarda *Trichosporon* türlerine karşı uygulanan antifungal tedavi etkisiz kalmaktadır, bu da infeksiyonların yüksek oranda ölümle sonuçlanmasına yol açmaktadır (25, 39). İmmünsüprese olguların tedavisinde uygun antifungal ajanın kullanılmasının yanı sıra, hastanın düşük olan lökosit sayısının normal düzeye yükseltilmesi de hastalığın seyrini etkileyen önemli bir faktördür (25).

Yaygın trikosporoz olarak bildirilen olguların çoğunun tedavisinde (63 / 70; % 90) amfoterisin-B kullanıldığı belirtilmektedir. Diğer hastalara ise, tedavi amaçlı olarak flukonazol, mikonazol ve itrakonazol uygulandığı bildirilmiştir. Hastalardan 54'ünün (% 78) antifungal tedaviye rağmen *Trichosporon* infeksiyonundan kaybedildiği bildirilmiştir. Yaygın *Trichosporon* infeksiyonu olan hastalarda, nötrofil sayısının yükseltilmesi prognozu olumlu yönde etkilemesine karşın, infeksiyonun tedavisi açısından her zaman yeterli olamamaktadır (25).

Fournier ve arkadaşları (25), amfoterisin B ve flukonazol tedavisine yanıt vermeyen akut lösemili nötropenik bir hastaya, yeni kuşak azollerden olan vorikonazol uygulanması ile başarılı bir tedavi elde edildiğini bildirmişlerdir. Fakat amfoterisin B ile azollerin *Trichosporon* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasına yönelik karşılaştırılmalı çalışmalar bulunmadığından, bu infeksiyonlara ilişkin en iyi tedavi yaklaşımı henüz açıklık kazanmamıştır.

Kimura ve arkadaşlarının (49) yapmış olduğu bir çalışmada safra kesesinin sitolojik incelemesinde gözlenen artrosporlar, gerçek hifler, blastosporlar ve maya hücrelerinin "*T. beigelii* kolonizasyonu" tanısı konmasında yardımcı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, tanısı zor ve kötü seyirli *Trichosporon* infeksiyonlarında sitolojik tanının, erken tedavi ve ölüm riskinin azaltılması açısından önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşın literatürde mantarların sitolojik olarak tanımlanmasına yönelik sınırlı sayıda veri mevcuttur.

4.3. Virülans Faktörleri

Konak-patojen ilişkisi oldukça karmaşık olup, bu ilişkide konakçıya ait bir takım faktörlerin yanı sıra, mikroorganizmaya ait çeşitli faktörler de rol almaktadır. Fungal infeksiyonların patogenezinde önemli rol oynayan bu faktörler arasında; hif oluşumu, yüzeyel antijenik yapılar, fenotipik ve genotipik değişim gösterebilmeleri, yüzey hidrofobisitesi, sıvı-sık örtü üretimi gibi aderensi etkileyen faktörlere sahip olma, toksinlerin ve hidrolitik bazı enzimlerin üretimi sayılabilir (14, 16, 92, 100).

Hif oluşumu, doku invazyonu ve fagositozdan kaçış açısından önemli bir virülans faktörü olup, CO₂, pH (7.5-8.0), ısı (37 °C) gibi dış faktörlerden etkilenebilmektedir. Hif formu, maya formuna göre dokuya ve plastik yüzeylere daha fazla yapışma eğilimindedir (16).

Maya hücresi duvarında bulunan glukoz, mannan, kitin, lipid, fosfat gibi maddeler, gerek aderensi artırarak, gerekse maya hücresine antijenik özellik kazandırarak patogenezinde rol oynamaktadır (14).

Patogenezinde rolü olduğu düşünülen hidrolitik enzimler; peptid bağlarını parçalayan proteinazlar ve fosfolipidleri hidrolize eden fosfolipazlar olarak iki grupta toplanmakla beraber, lipolitik aktivite gösteren başka enzimlerin de varlığı saptanmıştır (60, 72, 89). Salgısal asit proteinaz (SAP) ve fosfolipaz *C. albicans* ve diğer bazı mantarlarda en iyi karakterize edilmiş enzimler olmakla beraber, lipaz ve esterazlar gibi daha başka hidrolitik enzimlerin de üretildiği gösterilmiştir (41, 97, 100).

Konak hücreye invazyon, öncelikle penetrasyonu ve hücre membranının harabiyetini gerektirir. Bu geçiş süreci, büyük olasılıkla fiziksel veya enzimatik yoldan ya da ikisinin kombinasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Fosfolipitler ve proteinler konak hücre membranının başlıca kimyasal bileşenleridir. Bu kimyasal bileşenleri hidrolize etme yeteneğinde olan fosfolipaz, proteinaz ve esteraz gibi enzimlerin büyük olasılıkla konak hücre invazyonu sırasında oluşan membran hasarı sürecinde yer aldıkları düşünülmektedir (26).

4.3.1. Salgısal Asit Proteinaz Enzimi (SAP)

Blank ve arkadaşları (65) 1957 yılında *Candida* türlerinin üremek için nitrojen kaynağı olarak keratinden yararlanabilme yeteneğine sahip olduğuna işaret etmişlerdir. Bu bulgu, bu organizmalar tarafından hücre dışı proteolitik aktivitenin oluşturulduğu ihtimalini akla getirmiştir. Salgısal asit proteinaz enzimi bu aktivitelerden biri olup, ilk kez Staib tarafından 1965 yılında *C. albicans* kökenlerinde saptanmıştır. Ayrıca, *albicans* dışı *Candida* türleri ve bazı patojen mantarlar tarafından da üretilmektedir. Kandidaların hidrolitik enzimleri arasında en iyi tanımlanmış olan SAP'lar kimyasal özelliklerinden dolayı "karboksil proteinaz veya aspartil proteinaz" gibi adlarla da anılmaktadır (55, 71).

Salgısal asit proteinaz enzimi glikoprotein yapısında olup, amino (N) ucunda triptofan, karboksil (C) ucunda lösin bulunan ve çok miktarda aspartik asit rezidüleri içeren bir polipeptid zincire sahiptir (14). Bu enzim geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olup; serum albumini, ovalbumin, hemoglobin, kazein, laminin, fibronektin, keratin ve kollajeni parçalama yeteneğindedir. Bir karboksil peptidaz inhibitörü olan pepstatin proteinazın özgül ve güçlü bir inhibitörüdür (14, 16).

Yalnızca amino asit veya amonyum tuzları içeren besiyerinde mayaların düşük düzeyde SAP enzimi salgıladıkları ancak; tek azot kaynağı olarak sığır serum albumini gibi bir protein içeren besiyerinde ise bu enzimi yüksek düzeyde ürettikleri saptanmıştır. Yapılan deneylerde SAP'ın hücre içinde biriktirilmediği, sentezlendikten hemen sonra salındığı gösterilmiştir (15, 17).

Bu enzimin konakta oluşturduğu hidrolitik saldırının başlıca hedefleri arasında IgG₁ ve IgA yer almaktadır. Bunların yanı sıra diğer muhtemel hedefleri arasında; α_2 makroglobulin, koagülasyon faktör X ve anjiyotensinojen de bulunmaktadır (62, 66, 97). Enzim aktivitesi için optimum pH 4.3'dür; 7.0 ve daha yüksek pH değerlerinde dönüşümsüz olarak denatüre olur (27, 64).

Salgısal asit proteinazın virülans faktör olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* kökenleri kullanılarak yapılmıştır. Kandidozlu hastaların serumlarında yüksek titrede SAP'a karşı özgül antikorların saptanması enzimin in vivo salgılandığını ve kandida infeksiyonunun patogeneğinde önemli rolü olduğunu desteklemektedir. *Candida albicans* kökenleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda proteinaz enzimi üretenlerin, üretmeyenlere oranla virulanslarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (60, 66, 97).

Salgısal asit proteinaz enzim aktivitesi asidik pH ile sınırlanmasına rağmen, yapılan çeşitli çalışmalar ortamda zayıf bir asidifikasyonun bile maya çoğalmasını ve proteinaz üretimini artırdığını gösterilmiştir. Ayrıca asiditesi (pH < 6.0) uzun süre korunan kültür ortamında SAP üreten kökenler, asiditesi daha kısa süreyle muhafaza edilen kültür ortamındaki kökenlerden daha invaziv ve daha virulan olarak bulunmuştur (64).

Macdonald ve arkadaşlarının (55) nitrozoguanidin ile yaptıkları çalışmada, proteinaz üretmeyen (SAP-yoksun) *C. albicans* mutantları üretilmiş ve bu mutantların sıçanlar üzerinde SAP üreten kökenlerden daha düşük virulan etkili olup, fagositoza daha duyarlı hale geldiklerini gözlemlemişlerdir.

Vulvovajinal kandidozlu kadınlardan izole edilen ve in vitro koşullarda yüksek düzeyde SAP ürettiği gözlenen *C. parapsilosis* suşlarının aynı zamanda sıçanlarda vaginal kolonizasyona yol açtıkları bildirilmiştir. Bu suşların germ tüp ve gerçek hif oluşturmamalarına karşın sıçan vajenindeki epitellere yapışabilmeleri proteolitik aktivitelerine bağlanmıştır (8).

Enzimin virülansa katkısını araştırmak üzere yapılan bir başka deneysel modelde, proteinaz defektli suşun normal embriyonlu tavuk yumurtasının koryo allantoyik membranında çoğalamazken, proteinaz ile muamele edilmiş olan koryo allantoyik membranda çoğalabildiği ve hif oluşturduğu gösterilmiştir (51).

Candida albicans'a ek olarak daha az oranda *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis*'i de içeren çoğu patojen *Candida* türü SAP geni taşımakta ve hücre dışı

proteinaz üretmektedir (40). *Candida kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. guilliermondii* ise nadiren SAP enzimi üretmektedirler (16).

Trichosporon asahii'nin bu enzimi üretilip üretilmediği ve bir virülans faktör olarak bu enzimin rolünün olup olmadığı halen kesinlik kazanmamakla birlikte, 61 *T. asahii* klinik izolatu içeren bir çalışmada hiçbir kökünde SAP enzim aktivitesine rastlanmadığı bildirilmiştir (55).

4.3.2. Fosfolipaz Enzimi

İlk kez 1968 yılında Costa ve arkadaşları (7) tarafından *C. albicans*'da fosfolipaz aktivitesi gösterilmiş olup, diğer pek çok mantarda da fosfolipazların bulunduğu ve patojenitede rol oynadığı kanıtlanmıştır. Önemli bir virülans faktörü olan fosfolipazların mantarlar dışında, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* ve *Entamoeba histolytica* gibi birçok patojen mikroorganizma tarafından da üretildiği gösterilmiştir (60).

Fosfolipazlar, gliserofosfolipidlerdeki bir veya daha fazla ester bağımlı hidrolize etme yeteneğine sahip enzim grubudur. Tüm fosfolipazlar, substrat olarak fosfolipidleri hedeflese de her bir enzim, özgül bir ester bağımlı parçalama yeteneğindedir. Fosfolipazların ayırımında A, B, C, D gibi harfler kullanılmaktadır (66, 97).

Fosfolipaz A₁, gliserol molekülünün sn-1 (birinci çift bağımlı karbon) pozisyonundaki açıl-ester bağlarını; A₂, sn-2 (ikinci çift bağımlı karbon) pozisyonundaki bağları parçalamaktadır. Fosfolipaz B, hem sn-1 hem de sn-2 pozisyonundaki bağlara etki edebilmektedir. Fosfolipaz C, fosfolipitlerdeki fosfodiester bağımlı hidrolize ederek 1,2 di-açıl gliserol oluşumunu sağlamaktadır. İkinci fosfodiester bağı ise fosfolipaz D tarafından koparılmaktadır (26, 66).

Hücre dışı fosfolipazları, konak hücreyi lizise uğratmak yoluyla veya hücrenin yüzey özelliklerini değiştirmek suretiyle aderensi ve penetrasyonu kolaylaştırarak virülansa katkı sağlamaktadır. Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarı da virülans açısından önem taşımaktadır (5, 7).

Yapılan çalışmalarda hifal formdaki hücrelerin fosfolipaz aktivitesi, maya formundaki hücrelere göre çok daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, in vitro sukroz ve galaktoz konsantrasyonları arttırıldıkça fosfolipaz aktivitesinin azaldığı, ancak düşük dozda (50-100 mM) glukoz kullanıldığında fosfolipaz yapımının olduğu gözlenmiştir (7).

Fosfolipaz aktivitesi olan *Candida* türlerinin yanak mukozasına bağlanabildiği ve fareler üzerindeki patojenitesi incelendiğinde, fosfolipaz üretim aktivitesiyle, patogenez ve adezyon arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca fosfolipaz enziminin *C. albicans*'ın gastrointestinal ve damar bariyerini geçmesini kolaylaştırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (60, 91).

Tüm fosfolipaz türleri *C. albicans*'da tanımlanmış olup, bu mayanın patogenezinde en önemli rolü, aktivitesi pH 4.0–5.0 arasında optimum olan fosfolipaz B'nin üstlendiği düşünülmektedir. Bu enzimden yoksun mutant kökenler farelere uygulandığında, fosfolipaz B enzimine sahip olan kökenlerden daha düşük oranda virülanslarının olduğu gösterilmiştir (22, 40, 99).

4.4.3. Esteraz Enzimi

Esterazlar da lipazlar gibi triaçilgliserollerin ester bağlarını hidrolize ederler. Lipazlardan farklı olarak, suda çözünebilir uzun zincirli yağ asidi içeren substratlara da etki ederler ve fosfolipazların aksine L- α (alfa) lesitin, triolein ve tripalmitini hidrolize edemezler (95).

Candida türlerinde esteraz aktivitesinin varlığı karbon kaynağı olarak tween 80 içeren, pH'sı 5.5 olan besiyerinde gösterilmiştir (72, 89, 100).

Biyoteknolojide de önemli yeri olan lipaz ve esterazların, mantarlar dışında birçok patojen mikroorganizma tarafından sentezlendiğini gösteren çalışmalar vardır. *Propionibacterium acnes*'in sahip olduğu lipaz enziminin insan derisine yerleşiminde rol aldığını, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile infekte hastaların

serumlarında anti-lipaz IgG antikorlarının saptanması ile bu bakterilerin infeksiyon süresince lipaz salgıladıklarını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (41).

Dimorfik patojen bir mantar olan *Penicillium marneffe*'nin de hem miçelyal hem de maya formunda esteraz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (95). Başka bir küf mantarı olan *Trichophyton rubrum*'un esteraz aktivitesinin antifungal bir ilaç olan tiokonazol direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (24).

İnsanda derinin stratum korneum tabakasının yüksek oranda (~ % 25) esteraz enziminin substratlarından olan triaçilgliserol ve monoaçilgliserol içermesi lipaz ve esterazın, mantarların patojenitesinde rol alabileceklerini düşündürmektedir (89).

Esteraz aktivitesi için yapılan hayvan deneylerinde ise, bu enzimin kandida patojenitesi ile zayıf bir ilişkisi olduğu gösterilmekle birlikte (27, 62, 89), bunun virülansta etkili olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur (45, 85, 86, 97, 100).

4.4.4. Yüzey Hidrofobisitesi :

Mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların patogenezinde etken mikroorganizmanın konak hücrelerine bağlanmasının önemi büyüktür ve bu özellik kolonizasyon ve infeksiyonun başlamasında ilk basamağı oluşturur (20).

Hidrofobik moleküller; alkol, eter gibi polar olmayan çözücülerde çözünebilen ancak suda çözünemeyen moleküller olup, hücre duvarında genellikle alifatik hidrokarbon zincirleri şeklinde lipitlere bağlı olarak bulunurlar ve hücre yüzeyine hidrofobik özellik kazandırılırlar. Hidrokarbon zincirindeki karbon sayısı ne kadar fazla ise hidrofobik özellik o kadar fazla olur (15, 17).

İnsan ve hayvan hücrelerinde olduğu gibi mikroorganizmalar da yüzeylerinde negatif yük taşırlar. Hidrofobik moleküllerle olan etkileşimin patojen mikroorganizmanın konak dokuya yapışmasında (aderensinde) yardımcı olduğu

düşünülmektedir. Gerson ve Scheer (58) hidrofobik yüzeydeki serbest enerji değişiminin bakterinin yapışmasında etkili olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda hidrofobik özellik gösteren mayaların, vajen ve yanak epitellerine, farenin dalak ve böbrek gibi organlarına daha fazla tutunduğu gösterilmiştir (11, 33).

Hidrofobik özelliğin, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Capnocytophaga* türleri, *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus sanguis* gibi bakterilerin de adezyonunda rol aldığı gösterilmiştir (87).

Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliğini ölçmede çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında temas-açı ölçümü (contact-angle measurement), tuz birikimi (salting out), hidrokarbon adezyon yöntemi ve polistiren mikroküre deneyi en sık başvurulan yöntemlerdir (33, 70, 87).

4.4.5. Sıvışik Örtü:

Son on yılda *Candida* infeksiyonlarındaki artış, tıbbi alanda protezler, endotrakeal tüpler, çeşitli kateterler gibi biyomateryallerin yaygın olarak kullanılmasıyla paralel görülmektedir. Bu biyomateryaller sıvışik örtü oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve oluşan biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar çoğu kez bir septisemiye yol açmaktadır. Bu açıdan sıvışik örtü, infeksiyonlar için önemli ve sürekli bir kaynak oluşturmaktadır (98).

Kompleks polisakkarit yapıda biyolojik bir film tabakası olan sıvışik örtü, mikroorganizmanın konak hücre yüzeyine yapışmasında, kateter ve tüp gibi düz yüzeyli tıbbi aletlere tutunarak buralarda çoğalmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi immün mekanizmalara karşı mikroorganizmayı koruyan sıvışik örtünün, lökosit ve lenfosit etkinliğinde de azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal ajanlara karşı direnç açısından da sıvışik örtü önemli bir virülans faktörüdür (38, 93).

İlk olarak 1980’li yıllarda koagülaz negatif stafilokoklarda tanımlanmış olan sıvışık örtü terimi, ilk literatürlerde kökenlerin oluşturduğu mukus maddesi olarak tanımlanmıştır. Bu yapışkan madde kültür tüplerinin duvarlarına, kateter yüzeylerine, ortopedik malzemelerin yüzeylerine ve diğer medikal eşyalara yapışabilir niteliktedir (19, 29, 79).

Yapılan çalışmalarda sıvışık örtü ile polisakkarit intersellüler adetin (PIA) maddesinin benzer olduğu saptanmıştır. PIA’nın intersellüler adezinler gibi etki ederek, cam ve diğer hidrofilik yüzeylere bağlanmada rol aldığı öne sürülmektedir. Son çalışmalarda PIA’nın esas olarak fagositoz ve konak savunmasına karşı koyan bir madde olduğu belirtilmektedir (19, 29, 79).

Bu madde bakteri dışındaki ortamda bir biyofilm matriks oluşturur. Bu oluşan matriks; bakterilere bütünlük kazandırması ve üreme hızını yavaşlatması, beslenme şartlarını temin etmesi ve bakteriyi çevre şartlarından koruması açısından özel öneme sahip bir maddedir (19, 29, 79).

Biyofilm, insan vücudunda kateterler, protez kalp kapakları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde oluşabilir. Kateter ve ortopedik malzemeler gibi cansız yüzeylerin insan vücudunda kaldığı her gün bakteriyel kolonizasyon ve biyofilm oluşumu için risk taşır. Biyofilm; mikrobiyal direnç plazmitlerinin hücreler arasında geçiş göstermesine zemin hazırlayarak, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi, sürekli infeksiyon kaynağı olabilme özelliği taşıması, patojen mikroorganizmaları barındırabilmesi açısından da çok büyük önem taşımaktadırlar (6).

Kateterlerde oluşan biyofilm yapısının incelenmesi ile maya hücrelerinin, çimlenme borusu oluşturmalarından 3-6 saat sonra ilk bağlanmalarını gerçekleştirdikleri ortaya çıkmıştır. Mayaların yüzeye bağlanmalarını takiben, biyofilm yapısının yaklaşık olarak 48 saat sonra olduğu ve bu yapının; mayalar, hifler ve yalancı hifleri içeren bir ağ şeklinde gelişme gösterdiği bildirilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, biyofilmin iki tabakalı bir yapı şeklinde olduğu ve alttaki bazal tabakayı

maya hücrelerinin, üstteki daha kalın tabakayı ise hif yapılarının oluşturduğu; tabakaların etrafının ise ekstraselüler, polimerik bir matriks ile çevrelendiği saptanmıştır (98).

Sıvı sık örtünün, özellikle *Staphylococcus epidermidis*'in neden olduğu kateter infeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte, *Candida* kökenlerinin de aynı mekanizma ile ciddi infeksiyonlara yol açabildiği gösterilmiştir (3, 93).



5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. GEREÇLER:

5.1.1. *Trichosporon asahii* Kökenleri:

Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde çoğunluğu yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların klinik örneklerinden 2000 Ocak – 2005 Mart arasında izole edilen mayalara germ tüp testi uygulandı, mısır unlu - tween 80'li agar besiyerinde morfolojik özelliklerinin (9) belirlenmesiyle birlikte, üreaz aktiviteleri saptandı ve ID 32C (bioMerieux, France) ticari asimilasyon kiti ile türleri tanımlandı (54). *Trichosporon asahii* olarak isimlendirilen kökenler çalışma kapsamına alındı. Çalışma kapsamına alınan toplam 48 adet kökenin izole edildikleri klinik materyale göre dağılımı; idrar (43), periton (1), dil sürüntüsü (1), kan (1), nefrostomi (1) şeklindedir. Ayrıca 1 tane tırnaktan saprofit olarak izole edilen köken de çalışma kapsamına alınmıştır.

5.1.2. Standart Kökenler:

- a) *Trichosporon asahii var. asahii* CBS 2479 (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Hollanda)
- b) *Candida albicans* CBS 2730, salgısal asit proteinaz üreten köken (Reinhard Röchell, Almanya)
- c) *Candida albicans* SC 5314, fosfolipaz üreten köken (Ghannoum M., ABD)
- d) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) sıvışık örtü üreten köken

5.1.3. Besiyerleri:

- Sabouraud Dekstroz Agar (BD)
- Sabouraud Glukoz Agar (Fluka)
- Maya özütü (BD)
- Sabouraud Glukoz Buyyon (bio-Merieux)
- Sabouraud Buyyon (BD)

Pepton (Oxoid)

Agar (BD)

Mısır unu

5.1.4. Şekerler:

Dekstroz (Merck)

Glukoz (Merck)

5.1.5. Kimyasal Maddeler:

Sığır serum albumini Fraksiyon V (BSA)(Sigma)

Gliserol (Sigma)

HCl (Merck)

NaCl (Merck)

KCl (Horasan Kimya)

Na₂HPO₄ (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

K₂HPO₄ (Merck)

C₆H₈O₇H₂O (Lachema)

Na₂HPO₄2H₂O (Merck)

MgSO₄7H₂O (Merck)

Üre (Merck)

Tween 80 (Merk)

n-Hekzadekan (Fluka)

p-Ksilen (Merck)

Lateks boncuklar (Sigma)

5.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler:

- 0,1 M PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su pH 7.2)

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.25 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
Distile su	1000 ml

- 0,1 M PUM (K₂HPO₄, Üre, MgSO₄, distile su pH 7.2)

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	22.2 gr
KH ₂ PO ₄	7.26 gr
Üre	1,8 gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 gr
Distile su	1000 ml

- Sitrik asit-disodyum hidrojen fosfat tampon çözeltisi

a) C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	21.01 gr / 1000 ml distile su	(0,1 M)
b) Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	35.6 gr / 1000 ml distile su	(0,2 M)

a ve b çözeltileri uygun miktarda karıştırılarak pH 4.2 olan tampon çözelti hazırlandı.

- % 0,9 NaCl çözeltisi

5.1.7. Boyalar

Safranin-O (Merck)

%1'lik Safranin-O boyasının hazırlanışı:

Safranin-O	1 gr
Distile su	100 ml

Safranin-O cam beherin içinde, her seferinde az miktarda distile su eklenerek karıştırılarak çözüldü. Daha sonra koyu renk bir cam şişede karanlık bir ortamda 24 saat dinlenmeye bırakılan boya, filtre kağıdından iki kez süzüldü.

5.1.8. Filtreler

0.45 µm 'lik membran filtre (Minisart NML, Sartorius)

0.2 µm 'lik membran filtre (Minisart NML, Sartorius)

5.1.9. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar

Terazi (Scaltec SPB 54 kaba terazi; 0.1 gr)

Etüv (Dedeoğlu – Heraeus)

Çalkalayıcı etüv (Lab-Line)

Su banyosu (Elektro-Mag)

Otoklav (HV-85 Hırayama)

Pastör fırını (Elektro-Mag) Buzdolabı (Arçelik)

Dondurucu (- 20 °C) (Uğur)

Dondurucu (- 45 °C) (Fiocchetti)

Buzdolabı (Arçelik)

Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)

Vorteks karıştırıcı (Elektro-Mag)

Manyetik karıştırıcı (Elektro-Mag)

Spektrofotometre (Sequoia-Turner Model 340 Spectrophotometer, 420-890 nm)

pH metre cihazı (Hana instruments)

Işık mikroskobu (Nikon)

Tek kanallı otomatik pipetler (Pipetmen, Socorex, Thermo, Biohit–Exelpette)

Cam pipetler 1, 2, 5, 10 ml

Thoma lamı

Enjektör 5, 10 ml

pH indikatör kağıdı (Merck, Germany)

Kağıt diskler (6 mm Whatman)

Kurutma kağıdı

Eküvyon

Petri kapları, balonlar, tüpler, mezur, sarı ve mavi pipet uçları, sporlar



5.2. YÖNTEMLER:

5.2.1. Mısır unlu - tween 80'li agar besiyerinde morfolojik özelliklerinin belirlenmesi:

5.2.1.1. Besiyerinin Hazırlanması:

Mısır unu	40 gr
Agar	20 gr
Tween 80	10 ml
Distile su	1000 ml

Mısır unu 500 ml distile su ile karıştırılarak 65 °C'de 1 saat ısıtıldı. Bu karışım tam bir duruluk elde edilinceye kadar önce gazlı bezden sonra süzgeç kağıdından süzüldü.

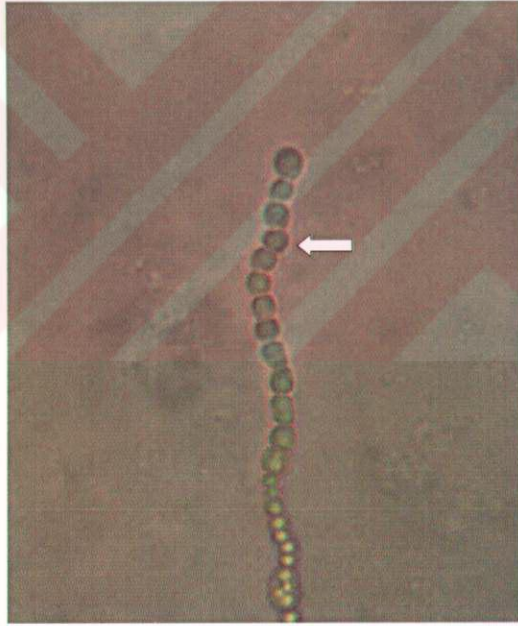
Elde edilen mısır unu karışımı distile su ile ilk hacmine getirildi ve pH 6.6-6.8'e ayarlandı. Üzerine 500 ml distile suda eritilmiş agar ve tween 80 eklenerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra 70 mm çaplı petri kaplarına 10'ar ml döküldü (90).

5.2.1.2. Deneyin Yapılışı:

Kökenlerin her birinin SDA'da 37 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra üreyen kolonilerinden iğne öze yardımıyla alınıp mısır unlu tween 80 agar üzerine çizgi ekim yapılarak ekim bölgesinin üzerine lamel kapatıldı. 25 °C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra, *T. asahii*'ye özgü hiyalen septalı hifler, yalancı hifler (Resim 2) ve bu hifler boyunca oval veya köşeli artrosporlar ve blastosporların oluşumu gözlemlendi.



Resim 2: Mısır unlu-tween 80 agarda *T. asahii*'nin hifal formları ve yalancı hif yapıları, (x40).



Resim 3: Mısır unlu-tween 80 agarda *T. asahii*'nin oluşturduğu artrosporlar (x 40).

5.2.2. Asit Proteinaz Deneyi :

Trichosporon asahii kökenlerinin salgısal asit proteinaz aktivitelerini saptamak amacıyla %1'lik sığır serum albumini içeren, pH: 5.0 olan katı besiyeri kullanıldı.

5.2.2.1. Besiyerinin Hazırlanışı:

a) YEPD Buyyon:

Maya özütü	1 gr
Pepton	2 gr
Dekstroz	2 gr
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi ve 5'er ml steril tüplere bölündü.

b) Temel Besiyeri:

Dekstroz	2 gr
KH ₂ PO ₄	0.1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05 gr
Agar	2 gr
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 110 °C'de 15 dakika steril edilerek, sitrik asit çözeltisi ile pH 5.0'e ayarlandı ve 50 °C'lik su banyosuna konuldu.

c) Temel Besiyerine Eklenen Protein Çözeltisi:

Sığır serum albumini (Fraksiyon V)	1 gr
Distile su	100 ml

Karışım manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra 0.2 µm'lik membran filtereden süzülerek steril edildi. Hazırlanan protein çözeltisinden yukarıdaki temel besiyerine % 20 oranında eklendi ve 70 mm çaplı petri kaplarına 10'ar ml döküldü.

5.2.2.2. Deneyin Yapılışı:

Test edilecek kökenlerin her birinin SDA'da 37 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra üreyen kolonilerinden alınıp YEPD buyyona pasajı yapıldı ve 30 °C'de 4-6 saat inkübe edildi. Bulanıklığı Mc Farland 0.5'e ayarlanan maya

süspansiyonundan 10 µl alınıp, katı besiyeri üzerine yerleştirilmiş olan 6 mm çapındaki steril kağıt disklere damlatıldı (15, 17).

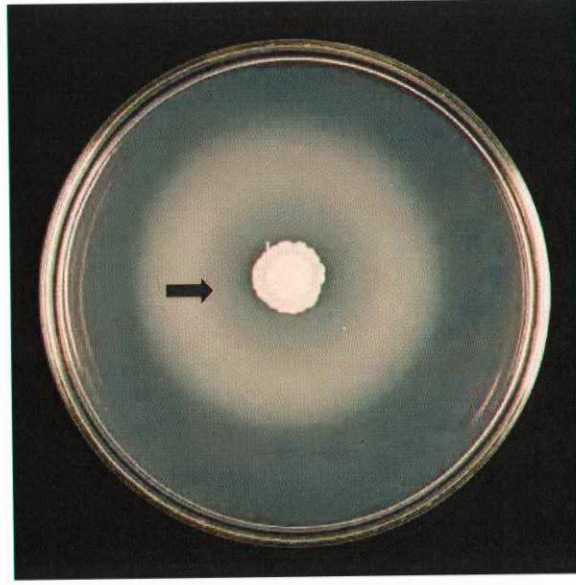
Petriler, 30 °C'de 6 gün boyunca inkübe edilerek hergün incelendi. İnkübasyon öncesinde besiyeri pH: 5.0'da hafif opak görünümündedir. Üreme ile birlikte disklerin çevresindeki artan opaklaşma ve de bunu takiben şeffaflaşma şeklinde zon oluşumu izlendi. Oluşan lizis zonları, proteinin parçalandığını göstermektedir. Altıncı günde bu lizis zonlarının mm olarak genişliklerine göre, proteolitik aktivitenin düzeyi belirlendi (15, 17).

Lizis zonu olmayan (-) negatif (Resim 4); lizis zonu diskin en fazla 1-2 mm açığındaki alana yayılmış olan reaksiyon ılımlı (+) pozitif; lizis zonu diskin 3-5 mm açığındaki alana yayılmış olan reaksiyon ise kuvvetli (++) pozitif olarak değerlendirildi (Resim 5) (14, 17).

Pozitif kontrol olarak, salgısal asit proteinaz üreten standart *C. albicans* CBS 2730 kökeni kullanılmıştır. Deney her köken için 3 kez tekrarlandı.



Resim 4: Asit proteinaz negatif *T. asahii* kökeni.



Resim 5: *Candida albicans* CBS 2730, salgısal asit proteinaz üreten köken.

5.2.3. Fosfolipaz Deneyi:

5.2.3.1. Besiyerinin Hazırlanışı:

Ana Besiyeri:

Pepton	1.25 gr
Glukoz	2.5 gr
Agar	2.5 gr
NaCl	7.3 gr
CaCl ₂ 6H ₂ O	0.14 gr
Distile su	115 ml

Karışım otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilerek 50 °C'lik su banyosuna konuldu.

5.2.3.2. Yumurta Sarısının Hazırlanışı:

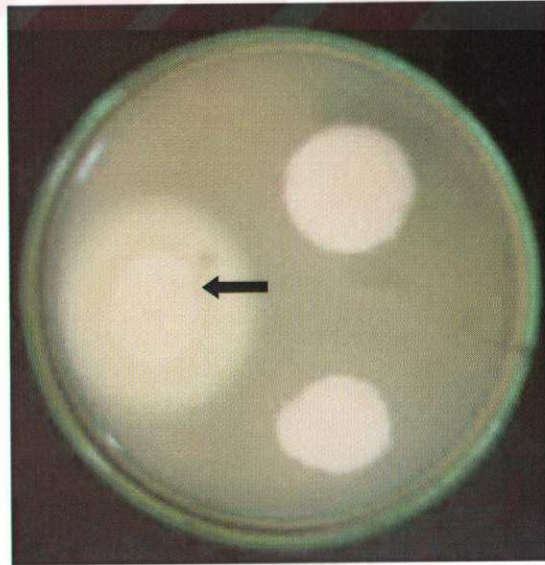
Yumurtalar öncelikle sulandırılmış çamaşır suyunda 1 dakika bekletildikten sonra steril gazlı bezle kurulandı. Yumurtalar daha sonra steril

koşullarda kırıldı ve sarısı steril bir mezüre aktarıldı. Üzerine eşit hacimde serum fizyolojik eklendi ve daha sonra içinde steril boncuklar bulunan bir balonda iyice karıştırıldı. Buzdolabında 24 saat bekletildikten sonra steril bir tüpe alınarak 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi (17, 53).

Santrifüj sonrası yumurtalı süspansiyonun üst kısımdan alınan 10 ml sıvı ile 125 ml sitrik asit disodyum fosfat tamponu, ana besiyerine eklendi ve 7 mm çaplı petrilere 10'ar ml döküldü (17, 91).

5.2.3.3.Deneyin Yapılışı:

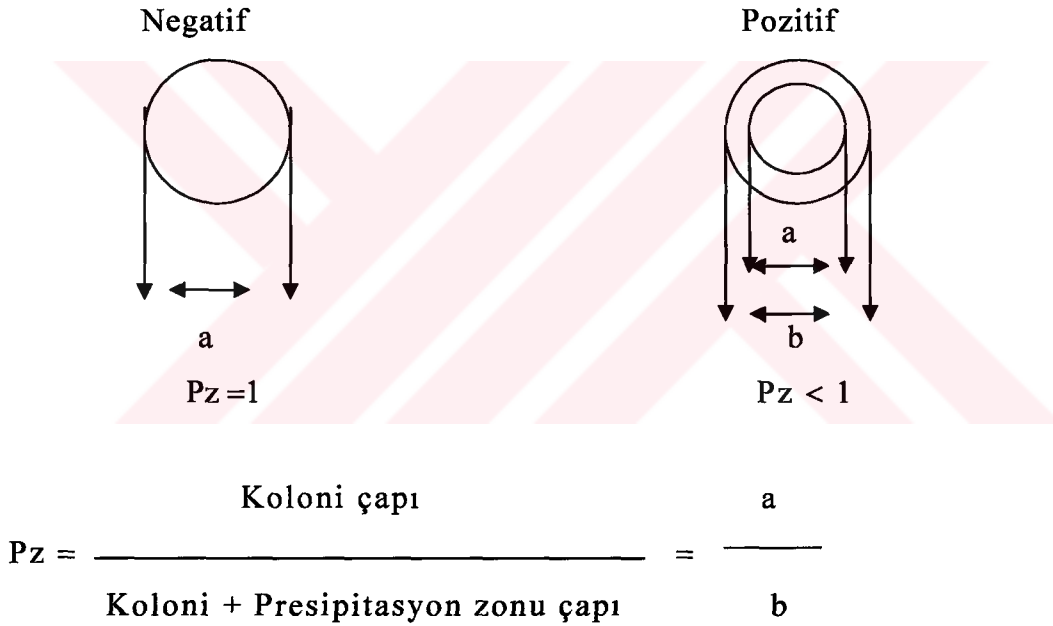
Kökenlerin SDA'da 18-24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen kolonilerinden steril serum fizyolojik içinde Mc Farland 0.5'e göre maya süspansiyonu hazırlandı. Her bir petriye maya süspansiyonlarından, ölçülü özeyle (0.01 ml) besiyeri yüzeyine değdirilmek suretiyle ekim yapıldı ve 37 °C'de 4 gün inkübe edildi (17, 91). Pozitif kontrol olarak *C. albicans* SC 5314 kökeni kullanıldı. Deney her köken için üç kez tekrarlandı.



Resim 6: Fosfolipaz pozitif *Candida albicans* SC 5314 kökeni ve negatif *Trichosporon asahii* kökenlerinin yumurtalı agarda oluşturdukları görüntü.

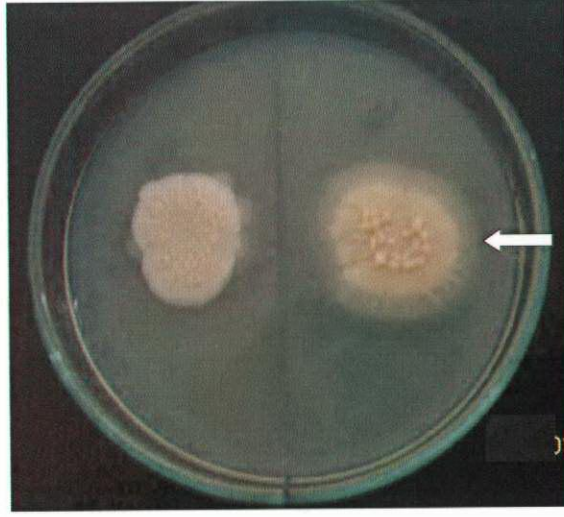
Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alınmıştır (Resim 6).

Fosfolipaz aktivitesi, koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmıştır (Şekil 1). Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz= 1.00 değeri, denenen kökenin fosfolipaz aktivitesinin negatif olduğunu göstermektedir. Bu durumda, Pz değeri 0.9 - 1.00 olanlar (+) pozitif; 0.89 - 0.8 olanlar (++) pozitif; 0.79 - 0.7 olanlar (+++) pozitif; < 0.69 olanlar (++++) pozitif grubu oluşturmaktadır (96).



Şekil 1: Fosfolipaz aktivitesi için Pz değerinin hesaplanması.

Trichosporon asahii kökenlerinden bazıları yumurtalı besiyerinde inkübasyon sonunda presipitasyon zonu benzerinde bir görüntü oluşturmuştur. Mikroskop altında incelendiğinde bu görüntünün mayanın hifal formlarının besiyeri içine yayılmasından dolayı olduğu anlaşılmıştır (Resim 7).



Resim 7: Yumurta sarısı içeren besiyerinde fosfolipaz negatif ve yalancı fosfolipaz presipitasyon zonu oluşturan *T. asahii* kökeni.

5.2.4. Esteraz Deneyi

5.2.4.1. Besiyerinin Hazırlanışı:

Tween 80 Agar Besiyeri:

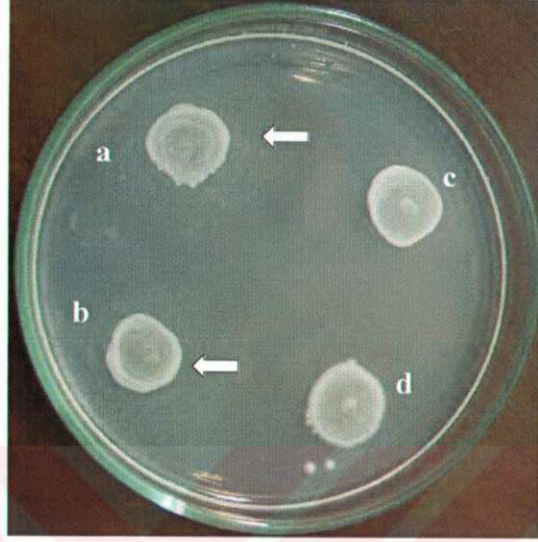
Pepton	10 gr
NaCl	5 gr
CaCl ₂	0,1 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121⁰C'de 15 dakika steril edilerek 50⁰C'lik su banyosuna konuldu. Daha sonra besiyeri içine 5 ml steril tween 80 eklenerek sitrik asit-disodyum hidrojen fosfat tamponu ile pH 6.8'ayarlandı (72, 79, 97, 100).

5.2.4.2. Deneyin Yapılışı:

SDA'da 24 saatlik inkübasyon sonucu üretilen suşların kolonilerine steril eküvyon dokundurularak alındı ve tween 80 agara daire şeklinde (~10 mm çapında) ekim yapıldı. 30 ⁰C'de 10 gün inkübe edilen plaklar her gün arkadan ışık verilerek incelendi. Tween 80 agarda inokülasyon bölgesinin etrafında tween 80'nin hidrolizi

sonucunda açığa çıkan yağ asidinin kalsiyum ile birleşerek opak kristaller halinde çökmesi (Resim 8) pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirildi (2, 44, 72, 79, 100). Her köken için deney üç kez tekrarlandı.



Resim 8: Esteraz aktivitesi a-b; pozitif ve c-d; negatif *T. asahii* kökenleri

5.2.5. Yüzey Hidrofobisitesinin ölçülmesi:

Bu deney için 2 ayrı yöntem kullanıldı.

5.2.5.1. Hidrokarbon Adezyon Yöntemi:

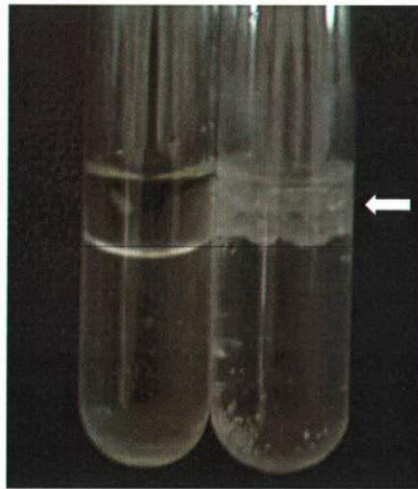
Hücre yüzey hidrofobisitesi Rosenberg ve arkadaşlarının (69, 70) yapmış olduğu yöntem modifiye edilerek saptanmıştır. Deneyde aşağıda belirtildiği gibi n-hekzadekan ve p-ksilen olmak üzere iki ayrı hidrokarbon molekülü kullanıldı.

Sabouraud glukoz agar'a (% 1 pepton, % 0.5 maya özütü, % 2 glukoz) pasajlanan her bir köken 24 saat oda ısısında (22-24 °C) inkübe edildi. Besiyerinde üreyen koloniden bir öze dolusu alınarak 5 ml SGB'ye inoküle edildi ve oda ısısında 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, bu üremeli buyyondan 1 ml alınarak 4 ml SGB içine inoküle edilerek çalkalayıcı etüvde oda ısısında 1200 rpm'de 24 saat inkübe edildi.

Santrifüj ile 4 °C'de 1500 g'de 5 dakika çevrilerek elde edilen maya hücreleri soğuk PUM çözeltisi ile 2 kez yıkandı. Yıkanan maya hücreleri PUM çözeltisi ile sulandırılarak Thoma lamında sayıldı ve 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde maya süspansiyonu hazırlandı.

Hazırlanan maya süspansiyonundan 2'şer ml alınarak 3 ayrı tüpe (12 x 75mm) konuldu. Tüplerden birine 0.5 ml n-hekzadekan, diğerine 0.5 ml p-ksilen eklenip, yalnızca maya süspansiyonu içeren son tüp ise kontrol tüpü olarak kullanıldı. Tüpler 10 dakika 37 °C'deki su banyosunda tutulduktan sonra her tüp 2 dakika 1400 rpm'de vortekslenerek hidrokarbon kısım ile maya süspansiyonunun iyice karışması sağlandı. Daha sonra tüpler 37 °C'deki su banyosunda 30 dakika tutulup her iki fazın tekrar ayrılması sağlandı. Otuz dakika sonra altta kalan sıvı faz cam pipet yardımıyla dikkatlice alınarak spektrofotometre ile 660 nm'de absorbans değeri ölçüldü ve kontrol tüpü ile karşılaştırıldı (21, 32, 47, 59, 69, 70, 91).

Kökenin yüzey hidrofobluğu ne kadar fazla ise o kadar çok hidrokarbon ile birleşecek, altta kalan sıvı faz o kadar çok şeffaflaşacak ve kontrole göre absorbans değeri düşecektir (Resim 9). Bunun tersi durumda ise, hidrokarbon içeren test tüpünün absorbansı ile kontrol tüpünün absorbansı arasında fark olmayacaktır. Deney, çalışmaya alınan her köken için 3 gün arka arkaya ve her gün 3'er kez olmak üzere tekrarlandı.



Resim 9: Hidrokarbon adezyon yöntemi; a- yüzey hidrofobik özelliği düşük olan köken, b-yüzey hidrofobik özelliği yüksek köken.

5.2.5.2. Polistiren Mikroküre Yöntemi:

Bu deneyde Hazen ve arkadaşlarının (33) geliştirmiş olduğu yöntem referans alınarak polistiren lateks boncuklar kullanıldı. Bu boncukların özelliği negatif yüklü olmaları ve yüzeylerinin > % 90 oranında hidrofobik ilişkiye uygun olmasıdır.

a) Boncuk süspansiyonunun hazırlanması:

Çalışmada, mavi renkli ve $0.825 \pm 0.1 \mu\text{m}$ çapındaki sıvı süspansiyon halinde stoklanmış boncuklar (% 10 katı halde) kullanıldı. Deneyde kullanılan bütün cam tüpler % 1'lik soğuk hidroklorik asitle (HCl) yıkandı.

Stok boncuk süspansiyonundan 6 μl alınarak 2 ml soğuk PUM tampon çözeltisinde sulandırıldı ve yaklaşık olarak 9.02×10^8 / ml boncuk elde edildi.

b) Maya süspansiyonunun hazırlanması:

Sabouraud glukoz agar'a pasajlanan kökenler oda ısısında 24 saatlik inkübasyondan sonra 5 ml SGB'ye bir öze dolusu olacak şekilde inoküle edildi. Oda ısısında 24 saat inkübasyondan sonra üremeli sıvı besiyerinden 1 ml alınarak 4 ml SGB içine inoküle edilip, tekrar çalkalayıcı etüvde oda ısısında 1200 rpm'de 24 saat inkübe edildi.

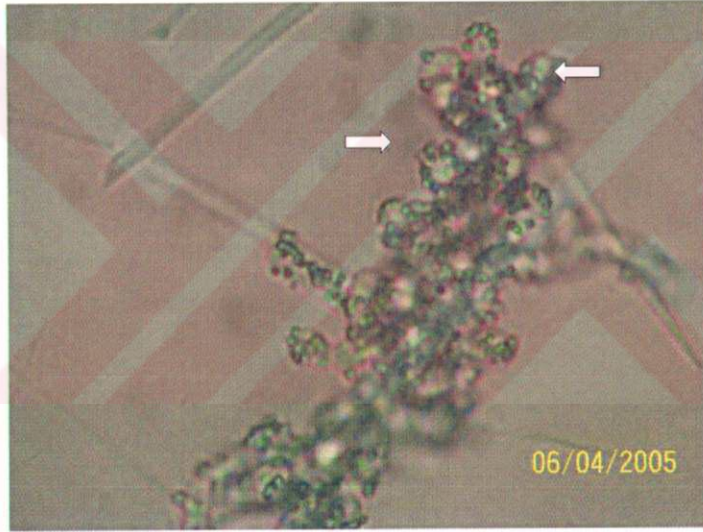
İnkübasyon sonunda maya hücreleri + 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1500 g'de 5 dakika santrifüjlenerek toplandı ve bir kez soğuk PUM çözeltisi ile yıkanarak Thoma lamında sayılan her bir köken yaklaşık olarak 2×10^6 hücre / ml olacak şekilde soğuk PUM tampon çözeltisi ile sulandırıldı.

En geç bir saat içerisinde maya ve boncukların karışımını gerçekleştirilmek üzere, hazırlanan süspansiyonlar 0 $^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.

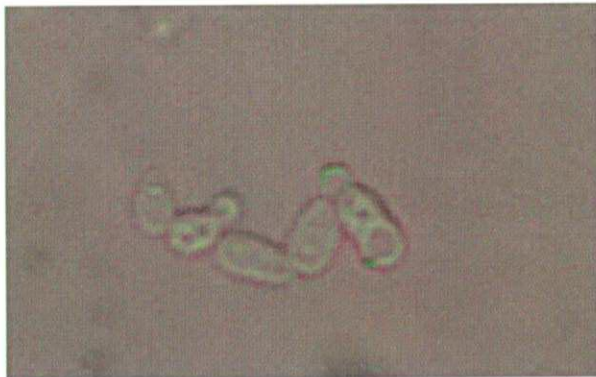
c) Maya-boncuk süspansiyonu karışımının hazırlanması ve değerlendirme:

Boncuk süspansiyonundan 150 µl, maya süspansiyonundan 150 µl alınarak karıştırıldı. Elde edilen karışım hemen oda ısısına getirilerek 30 sn vortekslendi. Bu karışımdan bir damla alınıp lam üzerine kondu ve üzeri lamelle kapatılarak 40x objektif ile sayım yapıldı (21, 32, 33, 34, 35).

Her bir köken için 100 maya hücresi sayıldı. Bu maya hücrelerinin içinde 3 veya daha fazla boncuk bağlanmış olan mayaların sayısı belirlenerek o kökenin yüzde (%) cinsinden hidrofobisitesi olarak değerlendirildi (Resim 10, 11). Her köken için deney 3 gün arka arkaya ve günde 3 kez olmak üzere tekrarlandı.



Resim 10: Polistiren mikroküre yönteminde boncuklarla bağlanan maya hücreleri.



Resim 11: Polistiren mikroküre yönteminde boncuklarla bağlanmayan maya hücreleri.

5.2.6. Sıvıık Örtü Üretimini Araştırılması

Sıvıık örtü üretimi modifiye tüp aderens yöntemi kullanılarak araştırıldı (10, 18, 98). Sabouraud glukoz agar'daki 24-48 saatlik kolonilerden bir öze dolusu alınarak; son glukoz konsantrasyonu % 8 olacak şekilde hazırlanan Sabouraud buyyondan 10 ml içeren polistiren falkon tüplerine inoküle edildi.

Tüpler 35 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra dikkatlice içerikleri boşaltılarak iki kez distile su ile yıkandı ve % 1'lik safranin ile boyandı. Havada kurutulan tüplerin iç çeperinde renkli, gözle görünür bir film tabakasının varlığı sıvıık örtü üretimi açısından olumlu olarak değerlendirildi. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar; zayıf (+) pozitif, orta (++) pozitif, kuvvetli (+++) pozitif olarak yorumlandı (Resim 12). Besiyeri ile hava kesişimindeki boya tutulmaları ise olumsuz olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 kökeni kullanıldı. Deney her köken için iki kez tekrarlandı.



Resim 12: Modifiye tüp aderens yöntemi ile sıvıık örtü üretimi: a: (+++) ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis* kökeni; b: (++) , c: (+), d (-) *T. asahii* kökenleri.

6. BULGULAR

6.1.Çalışmada Kullanılan *Trichosporon asahii* Kökenlerinin Klinik Materyallere Göre Dağılımı:

Çalışma kapsamına alınan toplam 48 adet kökenin; 43 tanesi idrar, 1 tanesi periton, 1 tanesi dil sürüntüsü, 1 tanesi kan, 1 tanesi nefrostomi örneklerinden ve ayrıca 1 tanesi de tırnaktan saprofit olarak izole edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Çalışmada kullanılan *T. asahii* izolatlarının klinik materyallere göre dağılımı

Klinik Materyal	<i>Trichosporon asahii</i> izolatlarının dağılımı	
	n	(%)
İdrar	43	89.58
İdrar Dışı	5	10.42
Kan	1	2.084
Periton	1	2.084
Dil sürüntüsü	1	2.084
Nefrostomi	1	2.084
Tırnak	1	2.084
Genel Toplam	48	100

6.2. *Trichosporon asahii* Kökenlerinin Virülans Faktörlerinin Değerlendirilmesi:

İdrar ve idrar dışındaki klinik materyallerden izole edilen *Trichosporon asahii* izolatlarının salgısal asit proteinaz, fosfolipaz ve esteraz enzimlerinin sekresyonu, hücre yüzey hidrofobisiteleri ve sıvıışık örtü üretimleri araştırıldı.

6.2.1. Fosfolipaz ve SAP aktivitelerinin değerlendirilmesi:

Çalışma kapsamına alınan 48 *T. asahii* kökeni ve CBS 2479 *T. asahii var. asahii* standart kökeni de dahil olmak üzere hiçbir kökende salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzimi üretimine rastlanmadı (Tablo 8).

6.2.2. Kökenlerin esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi:

Toplam 48 *T. asahii* kökeninden 7'si [% 14.58 (6'sı idrar, 1'i periton izolatı)] 1. gün esteraz aktivitesi gösterirken, 24'ü [% 50 (1'i dil sürüntüsü, 1'i tırnak ve 22'si idrar izolatı)] 2. gün, 17'si [% 35.42 (1'i kan, 1'i nefrostomi, 15'i idrar izolatı)] 3. gün esteraz aktivitesi göstermiştir. *Trichosporon asahii* CBS 2479 standart kökenin ise esteraz aktivitesi 2. günde saptanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5: Esteraz aktivitesinin günlere göre dağılımı.

İzolatin Kaynağı	1. gün	2. gün	3. gün	Toplam (%)
İdrar	6	22	15	43 (89.58)
Periton	1			1 (2.084)
Kan			1	1 (2.084)
Nefrostomi			1	1 (2.084)
Dil sürüntüsü		1		1 (2.084)
Tırnak		1		1 (2.084)
Toplam (%)	7 (14.58)	24 (50)	17 (35.42)	48 (100)

6.2.3. Kökenlerin yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi:

6.2.3.1. Hidrokarbon adezyon yönteminin değerlendirilmesi:

Hidrokarbon adezyon yöntemi ile günde 3 kez 3 gün üst üste yapılan her bir deneyden elde edilen 9 absorban değerinin ortalaması alınarak yüzde absorban değerleri n-hekzadekan ve p-ksilen için ayrı ayrı olmak üzere $\% A_{660} = [(A_{660} \text{ kontrol tüpü} - A_{660} \text{ test tüpü}) / (A_{660} \text{ kontrol tüpü})] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı. Bu

verilere göre, yüzde (%) absorbands değeri 0-20 arasında olanlar düşük, 20-80 arasında olanlar orta, 80-100 arasında olanlar ise yüksek hidrofobik olarak değerlendirildi (36).

a) n-hekzadekan kullanıldığında elde edilen sonuçlar:

Hidrokarbon olarak n-hekzadekan kullanıldığında 3'ü idrar, 1'i tırnak izolatu olmak üzere toplam 4 köken (% 8.3) orta düzeyde hidrofobik; 1 periton, 1 kan, 1 nefrostomi, 1 dil sürüntüsü ve 39 idrar izolatu olmak üzere 43 köken (% 89.6) düşük düzeyde hidrofobik; 1 idrar izolatu (% 2.1) ve standart *T. asahii* CBS 2479 kökeninde ise yüzey hidrofobik özellik saptanmamıştır (Tablo 6).

d) p-ksilen kullanıldığında elde edilen sonuçlar:

Hidrokarbon olarak p-ksilen kullanıldığında 1'i tırnak, 12'si idrar olmak üzere toplam 13 köken (% 27.08) az hidrofobik, diğer (idrar ve idrar dışı) 35 kökenin (% 72.91) ve standart CBS 2479 *T. asahii* kökeninin yüzey hidrofobik özelliği negatif bulunmuştur (Tablo 6).

Tablo 6: *Trichosporon asahii* kökenlerinin hidrokarbon adezyon yöntemi ile saptanan yüzey hidrofobik özellikleri.

Hidrokarbon Bileşik	n-hekzadekan		p-ksilen	
	Değer (%A ₆₆₀)	n	Değer (%A ₆₆₀)	n
Negatif ^a	(-1,111)	1	(-16,455) – (-0,2)	35
Az hidrofobik ^b	(0,288) – (17,144)	43	(0,211) - (11,972)	13
Orta hidrofobik ^c	(20,011) – (21,811)	4	-	-
Toplam (n)		48		48

a- %A₆₆₀ < 0, b- %A₆₆₀ 0-20, c- %A₆₆₀ 20-80

6.2.3.2. Polistiren mikroküre yönteminin değerlendirilmesi:

Yüzey hidrofobitesinin ölçülmesinde kullanılan ikinci yöntem olan polistiren mikroküre deneyinde, her bir köken için 3 gün üst üste günde 3 kez olmak üzere

tekrarlanan 3 deneyin ortalaması alınmış ve kökenlerin yüzey hidrofobitesi yüzde (%) olarak belirlendi. Buna göre elde edilen değerler en düşük % 53.2 (tırnak izolatu) ile en yüksek % 92.7 (idrar izolatu) arasında değişmektedir (standart sapma \pm 8.659). Standart *T. asahii* CBS 2479 kökeninin bu yöntem ile yüzde hidrofobik özelliği % 47.5 olarak bulunmuştur.

Polistiren mikroküre yöntemi ile elde edilen sonuçlar klinik örneklere göre değerlendirildiğinde; 1 periton izolatu % 84.5, 1 kan izolatu % 89, 1 nefrostomi izolatu % 72.3, 1 dil sürüntüsü izolatu % 88.7, 1 tırnak izolatu % 53.2 ve 43 idrar izolatu % 70.4 - % 92.7 olarak bulundu.

6.2.4. Sıvışık örtü üretiminin değerlendirilmesi:

Kökenlerin sıvışık örtü üretimini saptamak için kullanılan modifiye tüp aderens yönteminde; 1 periton, 1 nefrostomi ve 8 idrar izolatu olmak üzere 10 köken (% 20.83) orta (++) pozitif, 18 idrar izolatu (% 37.5) zayıf (+) pozitif sıvışık örtü üretimi göstermiştir. Biri kan, 1'i dil sürüntüsü, 1'i tırnak, 17'si idrar olmak üzere 20 köken (% 41.67) ve *T. asahii* CBS 2479 kökeni sıvışık örtü üretimi yönünden (-) negatif olarak saptanmıştır (Tablo 7).

Tablo7: Çalışmaya alınan kökenlerin sıvışık örtü üretimi sonuçları

İzolatuın Kaynağı	Sıvışık örtü üretimi			Toplam (%)
	negatif (-)	zayıf (+)	orta (++)	
İdrar	17	18	8	43 (89.58)
Periton			1	1 (2.084)
Kan	1			1 (2.084)
Nefrostomi			1	1 (2.084)
Dil sürüntüsü	1			1 (2.084)
Tırnak	1			1 (2.084)
Toplam (%)	20 (41.67)	18 (37.5)	10 (20.83)	48 (100)

Olası virülans faktörlerinin araştırılması amacıyla uygulanan tüm deneylere ait sonuçlar Tablo 8’de ve kökenlerin toplu halde dökümanı Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 8: Tüm deneylere ait sonuçlar

Deney	Salgısal Asit Proteinaz	Fosfolipaz	Esteraz	Sıvışik örtü	Hidrofobisite		
					n-hekzadekan	p-ksilen	Mikroküre
Negatif (n)	48 (%100)	48 (%100)	0	20 (%41.67)	1 (%2.08)	35 (%72.92)	0
Pozitif (n)	0	0	48 (%100)	28 (%58.33)	47 (%97.92)	13 (%27.08)	48* (%100)
Toplam (n)	48 (%100)	48 (%100)	48 (%100)	48 (%100)	48 (%100)	48 (%100)	48 (%100)

*Sayılan maya hücrelerinden 3 veya daha fazla boncuk bağlananlar pozitif kabul edilmiştir (Kökenlerin ortalama yüzde hidrofobisite değerleri % 53.2 - % 92.7 arasında değişmektedir).

Tablo 9: *Trichosporon asahii* izolatlarının esteraz, fosfolipaz ve asit proteinaz aktiviteleri, yüzey hidrofobisite değerleri ve sıvı sık örtü üretimleri

İzolat No	İzolatın Kaynağı	Esteraz aktivitesi	Fosfolipaz aktivitesi	Asit proteinaz aktivitesi	Yüzey Hidrofobisitesi			Sıvı sık örtü
					Hidrokarbon Adezyon Yöntemi (%A ₆₆₀)		Polistiren Mikroküre Yöntemi (%)	
					n-Hekzadekan	p-Ksilen		
1	Periton	1.gün	(-)	(-)	3,733	-5,166	84,5	++
2	İdrar	2.gün	(-)	(-)	0,288	-16,455	79,3	+
3	İdrar	2.gün	(-)	(-)	4,188	-1,333	78	-
4	Kan	3.gün	(-)	(-)	3,272	-2,138	89	-
5	İdrar	3.gün	(-)	(-)	1,7	-3,222	81,8	-
6	İdrar	3.gün	(-)	(-)	6,088	-0,6	84,7	-
7	İdrar	3.gün	(-)	(-)	9,011	-2,244	89,2	++
8	İdrar	2.gün	(-)	(-)	0,386	-6,18	80,2	-
9	İdrar	1.gün	(-)	(-)	6,666	-1,922	74,5	-
10	İdrar	2.gün	(-)	(-)	4,722	0,566	82,7	-
11	İdrar	2.gün	(-)	(-)	6,633	-1,711	92,3	+
12	İdrar	3.gün	(-)	(-)	7,677	-2,922	92,7	-
13	İdrar	2.gün	(-)	(-)	8,877	1,866	89,6	-
14	İdrar	3.gün	(-)	(-)	11,211	-3,777	74,6	+
15	İdrar	2.gün	(-)	(-)	9,722	-5,733	90,6	++
16	İdrar	2.gün	(-)	(-)	11,061	-3,205	89,2	++
17	İdrar	3.gün	(-)	(-)	6,6	-8,733	81,2	++
18	İdrar	2.gün	(-)	(-)	7,833	-9,744	70,4	+
19	İdrar	2.gün	(-)	(-)	6,744	-11,611	85,3	+
20	İdrar	2.gün	(-)	(-)	1,833	-4,2	83,3	+
21	İdrar	2.gün	(-)	(-)	7,955	-8,8	88,7	+
22	İdrar	3.gün	(-)	(-)	15,744	-3,788	82,2	+
23	İdrar	3.gün	(-)	(-)	21,811	7,988	79,1	+
24	İdrar	2.gün	(-)	(-)	1,966	-5,2	78,6	++
25	İdrar	2.gün	(-)	(-)	13,522	0,422	90,1	+
26	İdrar	1.gün	(-)	(-)	12,944	5,011	77,2	++
27	İdrar	2.gün	(-)	(-)	12,877	-1,911	78,5	+
28	İdrar	3.gün	(-)	(-)	15,577	-0,2	81	+
29	İdrar	2.gün	(-)	(-)	1,744	-6,722	85,6	-
30	İdrar	3.gün	(-)	(-)	14,011	8,688	87,2	-
31	İdrar	2.gün	(-)	(-)	13,355	-11,944	89,4	-
32	Nefrostomi	3.gün	(-)	(-)	2,433	-5,466	72,3	++
33	İdrar	3.gün	(-)	(-)	1,655	-11,466	92,7	+
34	İdrar	3.gün	(-)	(-)	16,844	2,155	89,1	-
35	İdrar	3.gün	(-)	(-)	20,011	1,866	80,4	+
36	İdrar	2.gün	(-)	(-)	15,244	-5,111	88,3	+
37	İdrar	2.gün	(-)	(-)	8,777	-9,644	84,5	-
38	İdrar	2.gün	(-)	(-)	1,633	-1,9	86,5	+
39	İdrar	3.gün	(-)	(-)	-1,111	-12,844	86,6	++
40	İdrar	2.gün	(-)	(-)	2,2	-5,544	86,3	-
41	İdrar	3.gün	(-)	(-)	2,744	-5,922	84,4	++
42	İdrar	2.gün	(-)	(-)	16,188	0,211	76	-
43	İdrar	1.gün	(-)	(-)	12,127	-3,238	81,1	-
44	İdrar	1.gün	(-)	(-)	20,066	3,633	84,4	+
45	İdrar	1.gün	(-)	(-)	17,144	3,366	85	-
46	İdrar	1.gün	(-)	(-)	16,633	7,411	86,5	+
47	Dil sürüntüsü	2.gün	(-)	(-)	13,911	-3,7	88,7	-
48	Tırnak	2.gün	(-)	(-)	20,538	11,972	53,2	-
<i>T.asahii</i> CBS 2479		2.gün	(-)	(-)	-1,227	-2,622	47,5	-
<i>C.albicans</i> CBS 2730								0.7cm(++)
<i>C.albicans</i> SC 5314								0.52(++++)

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organ ve doku transplantasyonu uygulanması gibi cerrahi girişimler, uzun süreli kateterizasyon, özellikle hematolojik maligniteli hastalarda etkili kemoterapötik tedaviye sık başvurulması, geniş etkili antibiyotiklerin artan sıklıkta kullanılması gibi nedenlerle mantar infeksiyonlarına duyarlı kişi sayısı artmıştır (61). İnsanı etkileyen mantar infeksiyonları arasında en sık rastlanan etkenler ise mayalardır (77).

Bu duyarlı hasta gruplarında son yıllara kadar kontaminant veya zararsız kolonizasyon etkenleri olarak değerlendirilen *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria* ve *Trichosporon* gibi nadir rastlanan mantar türlerinin klinik örneklerden giderek artan sayıda izole edilmeleri ve yaşamı tehdit eden ciddi infeksiyonlara yol açmaları dikkatlerin bu mantarlar üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (4, 23).

Son 20 yıl içinde antifungallere direnç gösteren ve nadir olarak infeksiyon oluşturan mantarlar özellikle hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda, etken olarak artan sıklıkta izole edilmeye başlanmıştır. Seyrek rastlanmasına rağmen antifungal tedaviye görece dirençli olan *Trichosporon* cinsinde yer alan mayalar da bu mantarlar arasındadır (76).

İnsanda deri, tırnak, ağız ve gastrointestinal sistemde normal flora üyesi olarak bulunan *T. asahii*, nadir olarak sistemik ve lokal infeksiyonlara yol açmakla birlikte son yıllarda etken olarak izole edildiği olgu sayısı artış göstermiştir (49). İmmünkompetan bireylerde genellikle beyaz piedra etkeni olarak izole edilmesine rağmen, *T. asahii*'ye duyarlı grubu oluşturan immünsüprese hastalarda bu mayanın en sık görülen lokal infeksiyonları; endokardit, akut veya kronik menenjit, peritoneal diyalizle ilişkili peritonit, pnömoni, artrit, kolanjit, hepatit ve oküler infeksiyonlar olup, bunlar % 18 – 20 oranında yaygın infeksiyona dönüşebilir (63, 77).

Chakrabarti ve arkadaşları (12) 2002 yılında yayımladıkları makalede, *T. asahii*'nin tek başına etken olduğu ve amfoterisin-B tedavisine rağmen tekrar eden bir yaygın lenfadenit olgusu bildirmişlerdir.

Matsunaga ve arkadaşları (56), Japonya'da 2003 yılında, *T. asahii*'nin inhalasyonu sonucu oluşan aşırı duyarlılık pnömonisi (Summer-type HP) olgusu bildirmişlerdir.

Panagopoulou ve arkadaşlarının (63) 2002'de bildirdiği bir olguda da 26 haftalık prematüre kız bebekte doğumdan sonraki 6. günde *Klebsiella pneumoniae* sepsisine ek olarak alınan kan örneklerinin birinde de *T. asahii* üretilmiştir. Yıldırım ve arkadaşları (94) 2003 yılında 27 haftalık bir bebekte idrar ve kan kültürlerinde *T. asahii* üremesi ile saptanan yaygın trikosporoz olgusu bildirmişlerdir. İmmün sistemi baskılanmış erişkinlerin yanı sıra prematüre yeni doğanlarda da invaziv infeksiyon etkeni olarak *T. asahii*'nin saptanması bu mayanın giderek artan önemini göstermektedir.

Sugita ve arkadaşlarının (83) 1998 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *T. asahii*'nin en sık izole edildiği klinik materyaller idrar (% 28.6), akciğer (% 21.4), kan (% 14.3), balgam (% 17.85) ve dışkı (% 17.85) olarak sıralanmaktadır.

Sugita ve arkadaşları (80) tarafından yapılan bir başka çalışmada *T. asahii*'nin izole edildiği klinik örneklerin dağılımında idrar en yüksek oranla (% 38.1) ilk sırada yer almakla birlikte, bunu sırasıyla kan (% 28.6), dışkı (% 9.52), balgam (% 7.14), plevra (% 4.77), asid sıvısı (% 4.77), deri (% 4.77) ve akciğer (% 2.33) örnekleri izlemektedir.

Toriumi ve arkadaşlarının (88) yapmış olduğu bir çalışmada *T. asahii* kökenlerinin izole edildiği klinik örneklerin dağılımı ise; idrar (% 44.1), kan (% 29.4), dışkı (% 11.8), plevral sıvı (% 8.8), akciğer (% 2.95) ve balgam (% 2.95) şeklindedir.

Ichikawa ve arkadaşlarının (43) 2004 yılında çalışmaya aldıkları 61 *T. asahii* kökeninin izole edildiği klinik örneklerin dağılımında ise kan ilk sırada (% 49.2) yer almakla birlikte bunu idrar (% 42.2), akciğer (% 7) ve dışkı (% 1.6) izlemektedir.

Çalışmamızda *T. asahii* klinik izolatlarının büyük bir kısmının kaynağını idrar örnekleri (% 89.58) oluşturmaktadır. Bu açıdan literatürle uyumlu olmakla birlikte bu

kadar yüksek bir yüzdede idrar izolatu ilk kez çalışmamızda saptanmıştır. Ayrıca, yaptığımız literatür taramalarında *T. asahii*'nin patojenitesinde rol alabilecek virulans faktörlerinin saptanmasına dair yeterli sayıda çalışma bulunamamıştır.

Çalışmamızda, mantarların dokuya invazyonunu kolaylaştıran fosfolipaz ve salgısal asit proteinaz enzimlerinin (60, 72, 89) yanı sıra, patogeneizde rolü olduğu düşünülen esteraz enzimi (41, 97, 100), mikroorganizmanın konak dokuya yapışmasında (aderens) yardımcı olduğu öne sürülen yüzey hidrofobisitesi (58) ve yine mikroorganizmanın konak hücre yüzeyine yapışmasında, kateter ve tüp gibi düz yüzeyli tıbbi aletlere tutunarak çoğalmasında ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşmasında önemli rol oynayan sıvı sıkı örtü üretimi araştırılmıştır (38, 93).

Yapılan çalışmalar *C. albicans* kökenlerinin kuvvetli proteolitik, *C. tropicalis* kökenlerinin daha az proteolitik olduğunu, *C. parapsilosis* ve diğer türlerin ise ılımlı proteolitik aktivite gösterdiğini ya da aktivite göstermediğini ortaya koymuştur (27, 74).

Kandidaların proteolitik aktivitesini ölçmede yararlanılan spektrofotometrik yöntemde, azot kaynağı olarak IgA, kazein, hemoglobin gibi substratlar kullanılmaktadır. Fakat asit proteinaz enziminin kolay stabilize edilememesi ve zaman zaman bu yöntemlerin duyarlılıklarında sapmalar olması gibi nedenlerle rutinde uygulanmaları oldukça zor ve zaman alıcı bulunmuştur. Bu amaçla proteinli agar besiyerleri uygulamaya konulmuştur (15, 73, 74).

Çalışmamızda da *T. asahii* kökenlerinin salgısal asit proteinaz aktivitelerini tespit etmek için %1 sığır serum albümini içeren katı besiyeri kullanılmış ve kökenlerin bu proteini hidrolize etme yetenekleri araştırılmıştır.

Çalışma kapsamına alınan 48 *T. asahii* kökeni ve CBS 2479 *T. asahii var. asahii* standart kökeni de dahil olmak üzere hiçbir kökende salgısal asit proteinaz enzimi üretimi saptanmamıştır (Tablo 8).

Candida albicans'ın patojenliğinde rol oynadığı bilinen virülans faktörlerinden yola çıkarak Ichikawa ve arkadaşları (43) yapmış oldukları çalışmada, % 42.2'sini idrar örneklerinin oluşturduğu toplam 61 *T. asahii* kökeninin hiçbirinde salgısal asit proteinaz enzimi üretimine rastlanmadığını bildirilmişlerdir. Çalışmamızda, salgısal asit proteinaz deneyinde elde ettiğimiz sonuçlarla, sözü geçen araştırmacıların elde ettiği sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çalışma kapsamında değerlendirilen ikinci faktör kökenlerin fosfolipaz aktiviteleridir. Üzerinde en çok çalışma yapılan tür olan *Candida albicans*'ın fosfolipaz enzimi üretme yeteneği, önemli bir patojenik özellik olarak öne sürülmektedir (40, 60).

Yapılan çalışmalar sonucunda, klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi yönünden büyük değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Samaranayake ve arkadaşları (75) 41 *Candida* izolatının fosfolipaz üretimini yumurta sarılı agar yöntemi ile taramış ve test edilen *C. albicans* kökenlerinin % 79'unun hücre dışı fosfolipaz üretirken, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* kökenlerinin bu aktiviteyi göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Ghannoum ve arkadaşlarının (26) 1998'de yaptıkları ve toplam 51 izolatın test edildiği bir çalışmada, hem yumurta sarılı besiyeri hem de kolorimetrik yöntemler kullanılarak *albicans* dışı *Candida* türlerinin de hücre dışı fosfolipaz ürettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada *C. glabrata* kökenlerinin % 41'inin, *C. parapsilosis* kökenlerinin % 51'inin, *C. tropicalis* kökenlerinin % 70'inin, *C. lusitaniae* kökenlerinin % 80'inin ve *C. krusei* kökenlerinin % 100'ünün saptanabilir düzeyde fosfolipaz ürettikleri belirlenmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar *albicans* dışı *Candida* türlerinde saptanan fosfolipaz aktivitesinin *C. albicans*'a göre daha düşük düzeyde olduğunu vurgulamışlardır.

Candida izolatlarında fosfolipaz aktivitesi, biyokimyasal ve mikrobiyolojik yöntemlerle saptanabilmektedir. Biyokimyasal yöntemlerin zaman alıcı olması nedeniyle, güvenilir sonuçlar veren pratik bir yöntem olarak

'plak yöntemi' önerilmiştir. Bu yöntemde besiyerine fosfolipit kaynağı olarak yumurta sarısı eklenmektedir. Yumurta sarılı besiyeri başlıca fosfolipaz B aktivitesini ortaya çıkarmaktadır (42).

Çalışmamızda kökenlerin fosfolipaz aktivitesini ölçmek için yumurta sarılı besiyeri kullanılmıştır. Çalışma kapsamına alınan 48 *T. asahii* izolatu ve CBS 2479 *T. asahii var.asahii* standart kökeni de dahil olmak üzere hiçbir kökende fosfolipaz üretimine rastlanmamıştır (Tablo 8). Elde edilen sonuçlar literatürdeki tek çalışma olan Ichikawa ve arkadaşlarının (43) bildirimleri ile uyumlu bulunmuştur. Ancak çalışmamızda dikkat çekici bir bulgu olarak, bazı *T. asahii* kökenlerinin yumurta sarısı içeren besiyerinde koloni etrafında fosfolipaz aktivitesi ile karıştırılacak bir presipitasyon zonu oluşturdukları gözlenmiştir (Resim 7). Bu zondan öze yardımıyla alınan örneklerin mikroskopik incelemesinde bunların mayaya ait hifal yapılardan oluştuğu anlaşılmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak *T. asahii* kökenlerinin fosfolipaz aktivitesi araştırılırken yalancı pozitiflik göz önüne alınarak değerlendirme yapılmasını önermekteyiz.

Değerlendirmeye alınan bir diğer enzimatik aktivite esteraz enziminin üretimidir. İnsanda derinin stratum korneum tabakasının yüksek oranda (~% 25) esteraz enziminin substratlarından olan triaçilgliserol ve monoaçilgliserol içermesi bu enzimin, mantarların patojenitesinde rol alabileceğini düşündürmektedir (89). Dahası başlangıçta *Candida* türlerinin ayırımında yardımcı bir test olarak kullanılması önerilen esteraz aktivitesi; infeksiyon etkeni olarak izole edilen kökenlerde yüksek oranda saptanınca, olası virülans faktörlerden biri olarak değerlendirilmeye alınmıştır (44).

Slifkin'nin (79) yapmış olduğu bir çalışmada, *C. albicans* ve *C. tropicalis* kökenlerinde yüksek oranda esteraz aktivitesi; *C. guilliermondii* ve *C. rugosa* kökenlerinde daha düşük oranda esteraz aktivitesi bulunurken, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. parapsilosis* kökenlerinde ise esteraz aktivitesine rastlanmamıştır

Susever ve arkadaşları (85, 86) lösemili çocuklardan izole ettikleri *C. albicans* kökenlerinin % 91.6'sında, lepralı hastaların ağız sürüntülerinden izole ettikleri *C. albicans* kökenlerinin % 100'ünde esteraz aktivitesi saptamışlardır.

Keçeli ve Budak (44) çalışmaya aldıkları *C. albicans* kökenlerinin % 96.5'inde, *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii* kökenlerinin % 100'ünde esteraz aktivitesi bulmuşlardır.

Çalışma kapsamına aldığımız tüm *T. asahii* kökenlerinin (% 100) esteraz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Birinci gün 6'sı idrar 1'i periton izolatu olmak üzere 7 köken (% 14.58), ikinci gün 22 idrar, 1 dil sürüntüsü ve 1 tırnak izolatu olmak üzere 24 köken (% 50), üçüncü gün 15 idrar, 1 kan, 1 nefrostomi izolatu olmak üzere 17 köken (% 35.42) tween 80 içeren besiyerinde inokülasyon bölgesinin etrafında hale oluşturarak esteraz aktivitesi sergilemiştir (Tablo 6). *Trichosporon asahii*'nin esteraz aktivitesini araştırmaya yönelik herhangi bir yayın bulunmadığından literatürle kıyaslama olanağımız olmamıştır.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer virülans faktör, kökenlerin hidrofobisite özellikleridir. Mikrobiyal infeksiyonun başlangıcında konak hücrelerine etken mikroorganizmanın adezyonu ilk basamak olup, yapılan çalışmalarda *Candida* türlerinin yüzey hidrofobik özelliğinin bu yapışmada önemli rol oynadığı bildirilmiştir. (32, 36, 47).

Çalışmamızda literatürdeki mevcut verilerin ışığı altında hidrofobik özelliği ölçmede besiyeri olarak SGB ve inkübasyon ortamı olarak oda ısısından yararlanılmıştır.

Yüzey hidrofobik özelliğin saptanmasında birinci yöntem olarak ilk kez Rosenberg ve arkadaşları (70) tarafından denenilen hidrokarbon adezyon testi kullanılmıştır (28, 46, 58, 59). Bu testle ilgili olarak, deney prosedüründe kullanılmak üzere, literatür verilerinde en çok çalışılan kimyasallar olan n-hekzadekan ve p-ksilen maddelerinden yararlanılmıştır.

Candida türleri ile yapılan çalışmalarda hif şeklinin maya şeklinden daha adeziv özellik gösterdiği saptanmıştır (21, 33). Yapılan çeşitli çalışmalarda 22-25 °C’de üreyen ve hif yapısı gösteren kökenlerin 37°C’de üreyenlere göre daha hidrofobik (~% 95 artış) olduğu gözlenmiştir (31, 32, 46, 47, 48, 79). Ayrıca, maya hücrelerinin durgunluk fazındaki (24. saat) adeziv özelliklerinin logaritmik fazdakine (18. saat) göre daha fazla olduğu saptanmıştır. *Candida* türlerinden bazılarının yüksek konsantrasyonlarda galaktoz içeren besiyerlerinde üretildikleri zaman daha fazla hidrofobik özellik göstererek daha adeziv hale geçtikleri gözlenmiştir (34, 59). Besiyeri ortamı olarak SGB’nin kullanıldığı deneylerde de iyi sonuçlara ulaşıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (33, 34).

Bakterilerin ve mayaların yüzey hidrofobik özelliğini ölçmek üzere yapılan çalışmalarda 2,2,4-trimetilpentan, sikloheksan, heksan, heksadekan, dodesen, hepten ve ksilen gibi farklı hidrokarbon bileşikleri kullanmıştır (36, 50). Rosenberg ve arkadaşları (70) ise n-oktan, n-heksadekan ve p-ksilen kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz p-ksilen ve n-heksadekan hidrokarbonları ile elde edilen sonuçlar farklılık göstermekte olup, bu da özellikle negatif kökenlerin sayısında değişiklik olarak yansımıştır (Tablo 6). Bunun nedeni, deneyde kullanılan p-ksilen maddesinin maya hücrelerinin bulunduğu sıvı fazda çok fazla birikmesi ve bu fazda yüksek miktarda kimyasal bulunması nedeniyle test tüpünün absorbansının (maya kökeni hidrofobik yüzey özelliğine sahip olsa bile) kontrol tüpünün absorbansından daha yüksek değer vermesidir. Diğer hidrokarbon molekül olan n-heksadekan’da ise böyle bir sorunla karşılaşılmamıştır (Resim 9).

Bu farklılık nedeniyle, p-ksilen kullanılarak yapılan deneylerdeki negatif köken sayısı, n-heksadekan kullanılarak yapılan deneye göre daha fazla çıkmıştır. Düşük düzeyde hidrofobisite n-heksadekan ile yüksek oranda saptanırken, p-ksilen ile oldukça düşük oranda saptanmış; orta düzeyde hidrofobisite ise n-heksadekan ile çok az kökende de olsa saptanırken, p-ksilenle bu özellikte hiçbir kökene rastlanmamıştır (Tablo 6).

Bakterilerle yapılan çalışmalarda, bakterilerin mayalara göre daha stabil bir yapıya sahip olup, yüzey hidrofobik özelliklerini kısa sürede değiştirmediklerinden dolayı hidrokarbon adezyon yöntemiyle başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Aynı yöntem maya hücreleri ile denendiğinde bakterilerde olduğu kadar başarılı sonuçların elde edilmediğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Hidrofobisitenin saptanamamasında, hidrokarbon adezyon yönteminde bir saate yakın süren deney sürecinde, dinamik bir yüzeye sahip olan mayaların hidrofobik konumdan hidrofilik konuma geçmelerinin rolü olabileceği ileri sürülmüştür (21, 47, 61).

Ener (21) *C. albicans* kökenleri ile yaptığı çalışmada hidrokarbon adezyon yöntemi ile yüzey hidrofobisitesi saptayamamıştır.

Bizim çalışmamızda da hidrokarbon adezyon yöntemi ile *T.asahii* kökenlerinin hidrofobisitesinin saptanamaması veya düşük düzeyde saptanması literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.

Yüzey hidrofobik özelliğinin saptanmasında ikinci yöntem olarak Hazen ve arkadaşları (33) tarafından uygulanan polistiren mikroküre yöntemi kullanıldı. Yöntemde polistiren boncuklar ile maya hücrelerinin karışımı hazırlanmış ve yüzey hidrofobisitesi yüksek olan mayaların düşük olanlara oranla daha fazla boncuk bağlandıkları gözlemlendi (Resim 10, 11). Çalışılan mayaların hidrofobisitesi en düşük % 53.2 (saprofit tırnak izolatu), en yüksek ise % 92.7 (ıdrar izolatu) olarak saptandı. Hidrokarbon yöntemi ile negatif sonuç veren standart *T. asahii* CBS 2479 kökeninin ise bu yöntem ile hidrofobisitesi % 47.5 olarak bulundu.

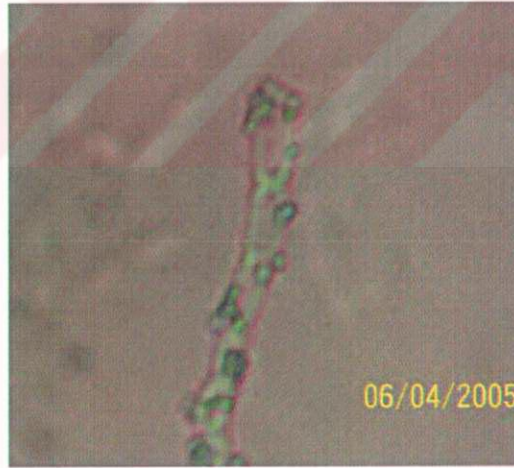
Literatürde, polistiren mikroküre yönteminde mikroskobik olarak inceleme yapıldığı için maya ve hifal formları gözlemlene imkanı olduğundan, güvenilirliğinin spektrofotometrik okumaya dayanan hidrokarbon adezyon yöntemine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (21, 33).

Mikroküre yöntemi ile hidrokarbon adezyon yöntemine göre daha yüksek oranlarda hidrofobik özelliğın saptanmasının, mikroküre yönteminin deneysel

aşamasında daha az zaman harcanmasına bağlı olarak fazlaca yüzey değişikliklerinin olmamasından kaynaklanabileceğini ileri sürebiliriz.

Literatür taramasında mantarlarda hidrofobisiteyi araştıran geniş kapsamlı çalışmalara rastlanmamıştır. Mevcut çalışmaların çoğunda sınırlı sayıda *Candida* kökenleri ile ortam farklılıklarının hidrofobisite üzerine etkisini araştırılmıştır. Bu çalışmalarda en önemli gözlemlerden birisi, mantarların hifal formlarının maya formalarına göre daha fazla adeziv ve hidrofobik olmalarıdır (21, 33). Çalışmamızda kullanılan *T. asahii* kökenleri de hifal form oluşturmaya ve bu nedenle daha yüksek oranda boncuk bağlamaya eğilimli olduklarından mikroküre deneyinde yüksek hidrofobisite sergilemişlerdir (Resim 13).

Literatürde *asahii* dahil *Trichosporon* türlerinde yüzey hidrofobik özelliğin araştırılmasına dair bir çalışmaya rastlanmadığından sonuçlarımızı yalnızca *Candida* türleri kullanılan az sayıdaki çalışmalar ile kıyaslayabildik.



Resim 13: Polistiren mikrokürelerin hifal formdaki maya hücresine bağlanması

Sıvı örtü üretimi *Candida*'lar için bir virülans faktörü olarak kabul edilmekte ve bu madde aracılığıyla konak hücresine ve protez, kateter gibi biyomateryallere daha kolay tutunarak kolonizasyon ve invaziv infeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir (10, 38).

Çeşitli *Candida* türlerini kapsayan bir çalışmada sıvışık örtü üretimi % 48.4 olarak bulunmuş ve örneklere göre değerlendirme yapıldığında vajinal sürüntüden izole edilen kökenlerin sıvışık örtü üretiminin diğer örneklerden izole edilenlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. (38).

Yapılan diğer bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleri arasında en fazla oranda *C. tropicalis* (9 / 21) kökenlerinde sıvışık örtü üretimi belirlenmiş olup, bunu *C. albicans* (23 / 94), *C. glabrata* (3 / 18) ve *C. parapsilosis* (2 / 12) kökenlerinin izlediği bildirilmiştir (98).

Çalışmamızda modifiye tüp aderens yöntemi ile *T. asahii* kökenlerinin sıvışık örtü üretimi açısından 10'u (% 20.83) orta (++) pozitif, 18'i (% 37.5) zayıf (+) pozitif, 20'si (% 41.67) (-) negatif saptanmıştır (Tablo 7).

Orta (++) pozitif düzeyde sıvışık örtü üreten 10 kökenin 8'i idrar, 1'i periton, 1'i nefrostomi; zayıf (+) pozitif sıvışık örtü üretimi saptanan 18 kökenin hepsi idrar; (-) negatif bulunan kökenlerin 17'si idrar, 1'i kan, 1'i dil sürüntüsü ve 1'i de tırnak izolatıdır. İdrar dışı klinik izolatlar az sayıda olduğu için çalışma kapsamına alınan *T. asahii*'lerin izole edildikleri klinik materyale göre sıvışık örtü üretimleri yönünden kıyaslamaları yapılamamıştır.

Belirtildiği gibi diğer *Trichosporon* türleri içinde bu kadar yüksek oranda izole edilmesine rağmen *T. asahii*'nin patojenitesinde rol oynayabilecek virülans faktörleri hakkında halen yeterli veri bulunmamaktadır (43).

Sonuç olarak, çalışmamızda çoğu idrardan izole edilen *T. asahii* kökenlerinde patojenitede rol alabilecek olası virülans faktörlerinden; esteraz aktivitesi tüm kökenlerde saptanırken, yüzey hidrofobisitesi ve sıvışık örtü üretimi özellikleri değişen düzeylerde saptanmıştır.

Araştırmamızın amacı doğrultusunda kökenlerimiz; izolatların etken olup olmaması, hastaların genel durumları gibi klinik verilere yönelmeksizin,

yalnızca mikrobiyolojik açıdan değerlendirmeye alınmıştır. Bu nedenle saptadığımız olası virülans faktörlerinin *T. asahii*'nin neden olduğu infeksiyonların patogeneğinde rol oynayıp oynamadığını belirtememekle birlikte, elde ettiğimiz bu verilerin *T. asahii* türünün virülansı hakkında literatüre katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Saptanan faktörlerin patojenitedeki gerçek etkilerinin ortaya konulması açısından, klinik verilerle birlikte değerlendirilmeye gidilecek çalışmaların gerekli olduğu görüşündeyiz.



8. KAYNAKLAR

1. Abliz P., Fukushima K., Takizawa K., Yang R., Li R., Nishimura K.: İdentification of the first isolates of *Trichosporon asahii* var. *asahii* from disseminated trichosporonosis in China. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 44: 17-22, 2002.
2. Aktaş E., Yiğit Y., Ayyıldız A.: Esterase activity in *Candida* species. J. Int. Med., 30: 322-324, 2002.
3. Anaissie E.: Opportunistic mycoses in the immuno-compromised host: experience at a cancer center and review. Clin. Infect. Dis., 14: 43, 1992.
4. Anaissie E. J., Bodey G. P., Rinaldi M. G.: Emerging Fungal Pathogens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8 (4): 323-330, 1989.
5. Arıkan S., Sancak B., Haşçelik G., Günalp A.: *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Flora, 3 (4): 240-243, 1998.
6. Bahar G.: Biyofilm, Tolerans ve İnfeksiyon Bölgesinde Direnç. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Antalya, 2002.
7. Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R. G., Ryles J. F.: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. Journal of General Microbiology, 131: 1217-1221, 1995.
8. Bernardis F., Lorenzini R., Verrichio R., Agatensi L., Cassone A.: Isolation acid proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. J. Clin. Microbiol., 27 (11):2598-2603, 1989.
9. Bilgehan H.: Besiyerleri Ayıraçlar ve Deneyler, Bölüm 41. S. 700, Barış yayınları, İzmir, 1995.
10. Branchini M. L., Pfaller M. A., Rhine-Chalberg J., Frempong T., Isenberg H. D.: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol., 32: 452-456, 1994.
11. Calderone R. A., Braun P. C. : Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiology Review, 55: 1-20, 1991.
12. Chakrabarti A., Marhawa R. K., Mondal R., Trehan A., Gupta S., Rao-Raman D. S., Sethi S., Padhyet A. A.: Generalized lymphadenopathy caused by *Trichosporon asahii* in a patient with Job's syndrome. Medical Mycology, 40 (1): 83 - 86, 2002.

13. Chowdhary A., Ahmad S., Khan Z. U., Doval D. C., Randhawa H. S.: *Trichosporon asahii* as an Emerging Etiologic Agent of Disseminated Trichosporonosis: A Case Report and an Update. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22 (1): 16-22, 2004.
14. Çerikçioğlu N.: Klinik örneklerden izole edilen kandida suşlarında asit proteinaz enzimi varlığının ve bunun virülans ile ilişkisinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 1993 (Danışman: Prof. Dr. Ruhi Alaçam).
15. Çerikçioğlu N., Alaçam R.: Kandida suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerlerinde gösterilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 27: 344-351, 1993.
16. Çerikçioğlu N., Topçu A. W.: *Candida* Türleri. Ed: Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M., İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Cilt 2). s. 1797-1809, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.
17. Dağdeviren M.: Hastanede yatan fungemili olgulardan izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinin virulans faktörleri. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2002 (Danışman: Yard. Doç. Dr. Nilgün Çerikçioğlu).
18. Dolapçı İ., Tekeli A.: Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktörü yapımının araştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*, 36: 323-328, 2002.
19. Donlan R. M., Costerton J. W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 167-193, 2002.
20. Ellepola A. N., Panagoda G. J., Samaranayake L. P.: Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, 44 (1-2): 29-35, 2001.
21. Ener B.: *Candida albicans* suşlarında epitel hücrelerine bağlanma ve bununla yüzey hidrofobik özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılması. M.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D. Uzmanlık tezi, İstanbul, 1991 (Danışman: Prof. Dr. Candan Bozok Johansson).
22. Ener B.: *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: etkenin rolü. Ed: Kiraz N., Kiremitçi A., Akgün Y., *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu. s.65-70, Eskişehir, 2002.

23. Ener B.: Nadir görülen fırsatçı mikozlar. Ed: Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s. 1105-1108, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
24. Facchin A. L., Contel E. P. B., Rossi E.: Effect of sub-minimal concentrations (Sub-MIC) of antifungal tioconazole in expression of esterase of *Trichophyton rubrum*. 19th Fungal Genetics Conference: 110 - Pacific Grove, CA, 1997 .
25. Fournier S., Pavageau W., Feuillhade M., Deplus S., Zagdanski A. M., Verola O., Dombret H., Molina J. M.: Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21 (12): 892-896, 2002.
26. Ghannoum M. A.: Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews, 13 (1): 122-143, 2000.
27. Ghannoum M.A., Abu-Elteen K.H.: Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses, 33 (6): 265-282, 1990.
28. Goldberg S., Doyle R. J., Rosenberg M.: Mechanism of Enhancement of Microbial Cell Hydrophobicity by Cationic Polymers. J. Bacteriology, 172 (10): 5650-5654, 1990.
29. Götz F.: *Staphylococcus* and biofilms. Molecular Microbiology, 43 (6): 1367-1378, 2002.
30. Gueho E., Improvisi L., Hoog de G. S., Dupont B.: *Trichosporon* on humans: a practical account. Mycoses, 37: 3 - 10, 1994.
31. Hazen B. W., Hazen K. C.: Dynamic Expression of Cell Surface Hydrophobicity during Initial Yeast Cell Growth and before Germ Tube Formation of *Candida albicans*. Infection and Immunity, 56 (9): 2521-2525, 1988.
32. Hazen K. C.: Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infection and Immunity, 57 (7): 1894-1900, 1989.
33. Hazen K. C., Hazen B. W.: A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations. Journal of Microbiological Methods, 6: 289-299, 1987.
34. Hazen K. C., Hazen B. W.: Surface Hydrophobic and Hydrophilic Protein Alterations in *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett., 107: 83-88, 1993.

35. Hazen K. C., Lay J. G., Hazen B. W., Fu R. C., Murthy S.: Partial Biochemical Characterization of Cell Surface Hydrophobicity and Hydrophilicity of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 58 (11): 3469-3476, 1990.
36. Hazen K. C., Plotkin B. J., Klimas D. M.: Influence of Growth Conditions on Cell Surface Hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infection and Immunity*, 54 (1): 269-271, 1986.
37. Hilmiğolu S.: Derinin Yüzeyel Mantar İnfeksiyonları. Ed: Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s.1025-1029, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
38. Hilmiğolu S., İlkit M., Çavuşoğlu C., Aydemir Ş., Tümbay E.: *Candida* türlerinde slime üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slime üretimiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. *İnfeksiyon Dergisi*, 13 (2): 183-186, 1999.
39. Hoy J., Hsu K. C., Rolston K., Hopfer R. L., Luna M., Bodey G. P.: *Trichosporon beigeli* infection : a review. *Rev. Infect. Dis.*, 8: 959-967, 1986.
40. Hube B., Naglik J.: Extracellular hydrolases. Ed: Calderone R.A., *Candida and Candidiasis*. s.107-122, ASM Press, Washington D.C., 2002.
41. Hube B., Stehr F., Bossenz M., Mazur A., Kretschmar M., Schafer W.: Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of Microbiology*, 174: 362-374, 2000.
42. Ibrahim A. S., Mirbod F., Filler S. G., Banno Y., Cole G. T., Kitajima Y., Edwards J. E., Nozawa Y., Ghannoum M. A.: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 63 (5): 1993-1998, 1995.
43. Ichikawa T., Sugita T., Wang L., Yokoyama K., Nishimura K., Nishikawa A.: Phenotypic Switching and beta-N-Acetylhexosaminidase Activity of the Pathogenic Yeast *Trichosporon asahii*. *Microbiol. Immunol.*, 48 (4): 237-242, 2004.
44. Keçeli S. A., Budak F.: *Candida* Türlerinde Esteraz Aktivitesi. *Mikrobiol. Bült.*, 38: 99-103, 2004.
45. Keçeli S. A., Budak F.: Esteraz aktivitesinin saptanmasında tween 80 opasite testinin değerlendirilmesi. Ed: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi: s.363, Bodrum, 2003.
46. Kennedy M. J., Rogers A. L., Hanselmen L. R., Soll D. R., Yancey R. J.: Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia*, 102: 149-156, 1988.

47. Kennedy M. J., Sandin R. L.: Influence of growth conditions on *Candida albicans* adhesion, hydrophobicity and cell wall ultrastructure. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26: 79-92, 1988.
48. Kennedy M. J., Volz P. A., Edwards C. A., Yancey R. J.: Mechanisms of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *J. Med. Microbiol.*, 24: 333-341, 1987.
49. Kimura M., Maekura S., Otsuka M., Satou T.: *Trichosporon* detected on bile cytology. *Acta Cytologica*, 41 (6): 1869-1870, 1997.
50. Klotz S. A., Drutz D. J., Zajic J. E.: Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.*, 50: 97-101, 1985.
51. Kobayashi I., Kondoh Y., Shimizu K., Tanaka K.: A role of secreted proteinase of *Candida albicans* for the invasion of chick chorio-allantoic membrane. *Microbiol. Immunol.*, 33 (9): 709-719, 1989.
52. Kwon-Chung K. S., Lehman D., Good C., Magee P. T.: Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 49 (3): 571-575, 1985.
53. Lane T., Garcia J. R.: Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses*, 34: 217-220, 1991.
54. Larone D. H.: *Medically Important Fungi: A Guide To Identification*. 4th ed. s.140-142, New York, 2002.
55. Macdonald F., Odds F. C.: Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *Journal of General Microbiology*, 129 (2): 431-438, 1983.
56. Matsunaga Y., Usui Y., Yoshizawa Y.: TA-19, a novel protein antigen of *Trichosporon asahii*, in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167 (7): 991-998, 2003.
57. Middelhoven W. J.: Identification of Clinically Relevant *Trichosporon* Species. *Mycoses*, 46: 7-11, 2003.
58. Minagi S., Miyake Y., Fujioka Y., Tsuru H., Suginaka H.: Cell-surface Hydrophobicity of *Candida* Species as Determined by the Contact-angle and Hydrocarbon-adherence Methods. *Journal of General Microbiology*, 132: 1111-1115, 1986.

59. Miyake Y., Fujita Y., Minagi S., Suginaka H.: Surface Hydrophobicity and Adherence of *Candida* to Acrylic Surfaces. *Microbios*, 46: 7-14, 1986.
60. Monod M., Borg-von Z. M.: Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chemical Immunology*, 81: 114-128, 2002.
61. Nader D. N., Zadeii G. R.: An overview of systemic *Candida* infections in peri-operative period and intensive care. *The internet journal of anesthesiology*, 12 (3):1998.
62. Odds F. C.: Pathogenesis of candidosis. Ed: Odds F. C., *Candida and candidosis*. 2nd ed., s. 252–278, Bailliere Tindall, London, 1988.
63. Panagopoulou P., Evdoridou J., Bibashi E., Filioti J., Sofianou D., Kremenopoulos G., Roilides E.: *Trichosporon asahii*: an unusual cause of invasive infection in neonates. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 21(2): 169 - 170, 2002.
64. Ray T. L., Payne C. D.: *Candida albicans* acid proteinase: a role in virulence. Ed: Ayoub E. M., Cassel G. H., Branche W. C., *Microbial Determinants of Virulence and Host Response*. s.163-178, ASM Press, Washington D.C., 1990.
65. Ray T. L., Payne C. D., Morrow B. J.: *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidiasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 306: 173-183, 1991.
66. Richard A. , Fonzi C., Fonzi W. A.: Virulence factors of *Candida albicans*. *TRENDS in Microbiology*, 9 (7): 327-335, 2001.
67. Richardson M. D., Warnock D. W.:Chapter I. Ed: Richardson M. D., Warnock D. W., *Fungal Infection Diagnosis and Management*. S. 1-13, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2003.
68. Rivera R., Cangir A.: *Trichosporon* sepsis and leukemia. *Canser*, 36: 1106-1110, 1975.
69. Rosenberg M.: Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 22: 289-295, 1984.
70. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E.: Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9: 29-33, 1980.
71. Ross I. K., Bernardis F., Emerson G. W., Cassone A., Sullivan P. A.: The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *Journal of General Microbiology*, 136 (4): 687-694, 1990.

72. Rudek W.: Esterase activity in *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 8: 756-759, 1978.
73. Rüchel R.: A variety of candida proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zentralblatt Fuer Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Section A*, 257(2), 266-274, 1984.
74. Rüchel R., Uhlemann K., Böning B.: Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralblatt Fuer Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Section A*, 255(4): 537-548, 1983.
75. Samaranyake L. P., Raeside J. M., MacFarlane T. W.: Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*, 22(3): 201-207, Abst, 1984.
76. Segal B. H., Bow E. J., Menichetti F.: Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. *Infect. Dis. Clin. N. A.*, 16 (4): 935-964, 2002.
77. Shadomy S.: *Miscellaneous Fungi*. Ed:Wonsiewicz M.J., *Infectious Diseases*.s. 1946-1951, W. B. Saunders Company, Amerika, 1992.
78. Shirliff M. E., Mader J.T., Camper A.K.: *Molecular Interactions in Biofilms*. *Chemistry & Biology*, 9: 859–871, 2002.
79. Slifkin M: Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (12): 4626–4628, 2000.
80. Sugita T., Ichikawa T., Matsukura M., Sueda M., Takashima M., Ikeda R., Nishikawa A., Shinoda T.: Genetic Diversity and Biochemical Characteristics of *Trichosporon asahii* Isolated from Clinical Specimens, Houses of Patients with Summer - Type -Hypersensitivity Pneumonitis, and Environmental Materials. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (7): 2405–2411, 2001.
81. Sugita T., Ikeda R., Nishikawa A.: Analysis of *Trichosporon* Isolates Obtained from the Houses of Patients with Summer-Type Hypersensitivity Pneumonitis. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (12): 5467-5471, 2004.
82. Sugita T., Nishikawa A., Ikeda R., Shinoda T.: Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (6): 1985-1993, 1999.

83. Sugita T., Nishikawa A., Shinoda T.: Identification of *Trichosporon asahii* by PCR based on sequences of the internal transcribed spacer regions. J. Clin. Microbiol., 36 (9): 2742-2744, 1998.
84. Sugita T., Nishikawa A., Shinoda T.: Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36 (5): 1458-1460, 1998.
85. Susever S., Ağırbaşı H., Erturan Z., Yeğenoğlu Y.: Lösemili çocuklardan soyutlanan *Candida albicans* suşlarında esteraz ve hemolitik aktivitenin araştırılması. Ed: Yeğenoğlu Y., Erturan Z., 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı. s. 361, Bodrum, 2003.
86. Susever S, Yeğenoğlu Y, Sütlaş M: Lepralı hastaların ağızlarından izole edilen *Candida*'ların esteraz ve hemolitik aktiviteleri. Ed: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi: s.362, Bodrum, 2003.
87. Sweet S. P., MacFarlane T. W., Samaranayake L. P.: Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. FEMS Microbiology Letters 48: 159-163, 1987.
88. Toriumi Y., Sugita T., Nakajima M., Matsushima T., Shinoda T.: Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Amphotericin B against *Trichosporon asahii*, Using Time-kill Methodology. Microbiol. Immunol., 46 (2): 89-93, 2002.
89. Tsuboi R., Komatsuzaki H., Ogawa H.: Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. Infection and Immunity, 64 (8): 2936-2940, 1996.
90. Tümbay E.: Besiyerleri ve uygulamaları. Pratik Tıp Mikolojisi. s. 190, Bilgehan Basımevi, İzmir, 1983.
91. Ülger N.T.: *Candida albicans* 'ın virülans faktörleri arasındaki ilişki ve bu faktörlerin kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımındaki rolleri. M.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 1995 (Danışman: Doç. Dr. Beyza Ener).
92. Vartivarian S.E.: Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanisms of *Candida albicans*. Clin. Infect. Dis., 14 (1): 30-36, 1992.
93. Yakupoğulları Y., Toraman Z.A.: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 34: 178-181, 2004.

94. Yildiran A., Kucukoduk S., Sanic A., Belet N., Guvenli A.: Disseminated *Trichosporon asahii* infection in a preterm. Am. J. Perinatol., 20 (5): 269-271, 2003.
95. Youngchim S , Vanittanakom N , Hamilton A J : Analysis of the enzymatic activity of mycelial and yeast phases of *Penicillium marneffe*. Medical Mycology, 37 (6): 445-450, 1999.
96. Yücel A., Kantarcıoğlu A. S.: *Candida albicans* kökenlerinin bazı virülans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki koelasyonun belirlenmesi. İnfeksiyon Dergisi, 15(4): 517-525, 2001.
97. Yücesoy M.: Virulence factors and their role in the pathogenesis. Microbiologia Balkanica, 3rd Balkan Conference of Microbiology, 4-6 Eylül İstanbul. Proceedings and Abstract Book, s.77-85, Çatı Grafik Reklamcılık Ltd., İstanbul, 2003.
98. Yücesoy M., Karaman M.: *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiol. Bült., 38 (1-2): 91-98, 2004.
99. Yücesoy M., Karaman M., Yulug N.: Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 14 (3): 405-408, 2000.
100. Yücesoy M., Marol S.: *Candida* türlerinin esteraz aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 37: 59-63, 2003.

9. ÖZGEÇMİŞ

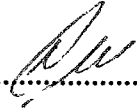
Adı – Soyadı:	Aylin Dağ
Doğum yeri / Tarihi:	İstanbul / 24.11.1980
Adres:	Fevzi Çak. Cad. Gözde Kent-2 No: 3/6 Avcılar/İstanbul
Tel:	0533 732 53 80
e-mail:	aylindag@yahoo.com
Yabancı dili:	İngilizce
Bilgisayar deneyimi:	MS Office (Word, excel, power point)
Eğitim durumu:	M.Ü. Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. Yüksek Lisans Programı (2002 -) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü (1998-2002) 50. Yıl Avcılar İnsa Lisesi (1997)
Lisans Bitirme Tezi:	Gen Tedavisi (Derleme)
Lisans Diploma derecesi:	75 (100'lük)
İş deneyimleri:	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi (Haziran 2002- Ekim 2002)
Stajlar:	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. (11.02.2002 – 24.05.2002) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi DETAE (Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü) Genetik A.D. (08.10.2001- 11.01.2002) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. (03.09.2001 - 21.09.2001) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı (13.08.2001 – 31.08.2001)

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

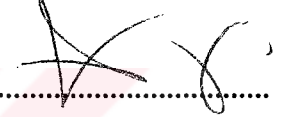
Yüksek Lisans öğrencisi Aylin DAĞ'ın, çalışması jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

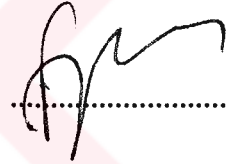
Tez Danışmanı : Doç.Dr.Nilgün ÇERİKÇİOĞLU
Üniversitesi : Marmara

.....


Üye : Prof.Dr.Güner SÖYLETİR
Üniversitesi : Marmara

.....


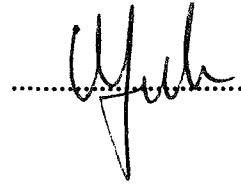
Üye : Prof.Dr.Funda BABACAN
Üniversitesi : Marmara

.....


Üye : Prof.Dr.Çiğdem BAL
Üniversitesi : İstanbul

.....


Üye : Doç.Dr.Ufuk HASDEMİR
Üniversitesi : Marmara

.....


ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun²⁸ / 06... / 2005 tarih ve ...3... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür