

BİR STAPHYLOCOCCUS EPİDERMİDİS SUŞUNDAN ELDE EDİLEN SLİME MADDESİNİN İNSAN PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEN TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ (TNF) VE İNTERFERON GAMA (IFN- γ) SALGILAMASI ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMİDİS-EXTRACTED SLİME SUBSTANCE ON TUMOUR NECROSIS FACTOR (TNF) AND İNTERFERON GAMMA (IFN- γ) PRODUCTION FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Cemalettin AYBAY*, Kayhan ÇAĞLAR*, Turgut İMİR*, Nedim SULTAN*

Özet: Bu çalışmada bakteriyemili bir hasta kanından izole edilen *Staphylococcus epidermidis* tarafından üretilen ekstraselüler slime maddesi çalışıldı. Slime üretimi kongo kırmızılı agar ve safranin boyası ile tesbit edildi. Ham slime'dan fenol-salin ekstraksiyonu ile elde edilen madde DEAE-5PW kolona uygulandı. Bu çalışmanın temel amacı fenol-salin yöntemi ile ekstrakte edilen slime maddesinin insan periferik kan mononükleer (MN) hücrelerinden TNF ve IFN- γ salgılanması üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Kültür süpernatanlarındaki TNF aktivitesi L929 bioassay yöntemi ile değerlendirildi. Kültür süpernatanlarındaki IFN- γ konsantrasyonları ELISA ile ölçüldü. 250 μ g/ml konsantrasyondaki slime maddesi MN hücrelerden kontrollere göre anlamlı düzeyde TNF ve IFN- γ salgılanmasına neden oldu ($p < 0.05$).

Anahtar kelimeler: *S.epidermidis, slime, tümör nekroz faktörü, interferon γ .*

Summary: In this study the extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*, isolated from blood of a patient with bacteremia, was investigated. Slime production was determined by using congo red agar as well as safranin dye. A phenol-saline extract of crude slime was seperated into fractions on a DEAE-5PW column. Primary aim of this study was to investigate the effect of phenol-saline-extracted extracellular slime substance on TNF and IFN- γ production from human peripheral blood mononuclear (MN) cells. TNF activities in the culture supernatants was assessed by L929 bioassay. IFN- γ concentrations in the culture supernatants were determined by ELISA. Slime substance at a concentration of 250 μ g/ml, significantly induced TNF as well as IFN- γ production from MN cells when compared to that of controls ($p < 0.05$).

Key words: *S.epidermidis, slime substance, tumour necrosis factor, interferon γ .*

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokoklardan olan *Staphylococcus epidermidis* insanlarda burun delikleri, aksilla, kafa derisi, kol ve bacak derisi gibi bölgelerin normal florasında bulunur¹. *Staphylococcus epidermidis* daha önceleri avirulan, kommensal bir bakteri olarak düşünülür ve kültürlerde ürediği zaman kontaminant olarak değerlendirilirdi. Ancak son yıllarda *Staphylococcus epidermidis*'in intravasküler kateter, ortopedik protez, vasküler greft, peritoneal dializ kateteri ve serebrospinal şant enfeksiyonlarından sorumlu majör etkenlerden biri olduğu anlaşılmıştır^{2,3}. Hastane enfeksiyonlarında slime oluşturan koagülaz-negatif stafilokoklar önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır⁴. Slime oluşturan bu bakteriler kateter gibi polimer/plastik yüzeylere yapışma özelliği göstermektedir⁵. Slime üretimi bir virulans faktörü olarak değerlendirilmektedir⁶. Slime yapımı ile koagülaz negatif stafilokokların antibiyotiklere direnci arasında yakın bir ilişki olduğu da bildirilmektedir^{7,8}.

Memeli dokularının stafilokoklar tarafından invazyonu bu bölgelere lökositlerin göçüne neden olur. Normal şartlarda enflamasyon bölgesine göç eden lökositler, stafilokokları fagositoz sonrası öldürerek enfeksiyona karşı önemli bir savunma mekanizmasını yerine getirirler⁹. İmmün yanıtı oluşturan muhtelif hücreler salgıladıkları sitokinler ile karşılıklı bir etkileşim içerisine girerek bakterilere karşı oluşturulan immün yanıtın daha etkin olmasını sağlarlar. Buna karşın bakterilere ait bazı yapısal veya salgısal maddelerin enflamatuar yanıtta rol olan hücre fonksiyonları üzerine inhibe edici ve/veya aktive edici etki gösterdikleri de bilinmektedir. Örneğin stafilokoklara ait peptidoglikan ve protein A gibi hücre duvar yapıları lökositlerin fagositoz ve kemotaksi fonksiyonlarını engellemektedir¹⁰. Stafilokokal enterotoksin B ise mononükleer hücreleri aktive ederek değişik sitokinlerin salgılanmasına neden olmaktadır¹¹.

Staphylococcus epidermidis'den elde edilen slime maddesi yapısal olarak daha çok mannoz, galaktoz, glukoz ve riboz monosakkaridlerinden oluşmuş bir polisakkariddir¹². Bu maddenin insan nötrofilleri üzerine kemotraktan etki yaptığı, nötrofillerin bazı kemotraktan maddelere karşı yanıtını ve fagositozu engellediği bildirilmektedir. Buna karşın nötrofil degranülasyonunu arttırmaktadır¹³. Ayrıca slime maddesi periferik kan mononükleer hücrelerinin fitohemagglütinin (PHA) ve streptokokal blastojen A'ya karşı oluşan lenfoproliferatif cevabını baskılamaktadır¹⁴. Slime maddesinin sitokin salgılanmasına etkisi ile ilgili herhangi bir yayına literatürde rastlanmadı. Bu çalışmada *Staphylococcus epidermidis*'den izole edilen slime maddesinin enflamatuar yanıtta rol alan TNF ve IFN- γ 'nın mononükleer hücrelerinden salgılanmasına etkisi araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

S. epidermidis

Bakteriyemili bir hastanın periferik kanından izole edilen katalaz pozitif, koagülaz negatif, novobiosine duyarlı, glikozu fermente eden, mannitole etkisiz gram pozitif kok *S. epidermidis* olarak değerlendirildi⁵. Bakteri kongo kırmızılı agara ekilerek 24 saat

37°C'de inkübe edildi. Oluşan siyah renkli kuru koloniler bakterinin slime ürettiğinin göstergesi olarak kabul edildi¹⁵. Slime üretimi tüp yöntemi ile de teyid edildi¹⁶.

Slime izolasyonu

Slime izolasyonu Ludwicka ve ark.'nın¹⁷ tanımladığı yöntemle yapıldı. Kısaca, beyin-kalp infüzyon buyyonda 24 saat üretilen bakteri yıkanarak % 3 kazamino asid ve % 1 glukoz içeren nutrient agar plaklarına ekildi. 48 saatlik inkübasyon sonrası sıvı-bakteri-slime karışımı toplanarak vortekslendi. Santrifüj (12000×g de 30 dakika) sonrası üst sıvı toplanarak 0.45 µ'luk filtreden (Costar) geçirildi ve distile suya karşı +4°C'de 48 saat dializ edildikten sonra liyofilize (Virtis Company, freeze dryer benchtop 3L, New York) edilerek ham (crude) slime elde edildi. Liyofilize edilen ham slime fenol-salin ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılarak¹⁸ dializ sonrası tekrar liyofilize edildi. Deneysel çalışmalarda fenol ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılan slime kullanıldı. Slime maddesi, pH 5.5 olan 0.1M fosfat tamponunda (PBS) çözüldü (30 mg/2ml). Kolon aynı fosfat tamponu ile dengelendi ve çözünen slime maddesinden kolona 200 µl yükleme yapıldı. Slime içerisindeki fraksiyonlar DEAE-SPW kolon (5×0.5 cm, Tosohaas) kullanılarak Water 600E sistem kontrol edici ve Waters 490 E dedektör (Millipore) sistemi ile Maxima 820 bilgisayar programında görüntülendi.

Mononükleer hücrelerin slime ile uyarılması

Heparinize periferik kandan mononükleer (MN) hücreler ficoll-hypaque kullanılarak ayrıldı¹⁹. İki kez RPMI-1640 besiyeri (Sigma) ile yıkanan hücrelerin % 10 fetal calf serum (FCS, Sebak) içeren RPMI-1640 içerisinde 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyonu yapıldı. 24 çukurlu plakların (Falcon) her bir çukuruna hücre süspansiyonundan 0.5 ml dağıtım yapıldı. Mononükleer hücrelerin uyarılması için kullanılan slime konsantrasyonu ön çalışmalar ile 250 µg/ml olarak belirlendi. RPMI-1640'da vortekslenerek çözülen slime'in konsantrasyonu 500 µg/ml olarak ayarlandı ve 0.5 ml hücre süspansiyonu bulunan uygun çukurlara 0.5 ml ilave edildi. Kontrol çukurlara ise sadece 0.5 ml RPMI-1640 ilave edildi. 24 saat 37°C'de ve % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası süpernatantlar toplandı, ependorf tüplerde santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve üst sıvı alınarak TNF ve IFN-γ düzeyleri için test edildi.

TNF ölçümü

Periferik kan mononükleer hücre kültür süpernatantlarındaki TNF aktivitesi L929 fare fibroblast hücreleri (ATCC, NCTC clone 929) kullanılarak daha önce tanımlandığı şekilde "bioassay yöntemi" ile değerlendirildi¹¹.

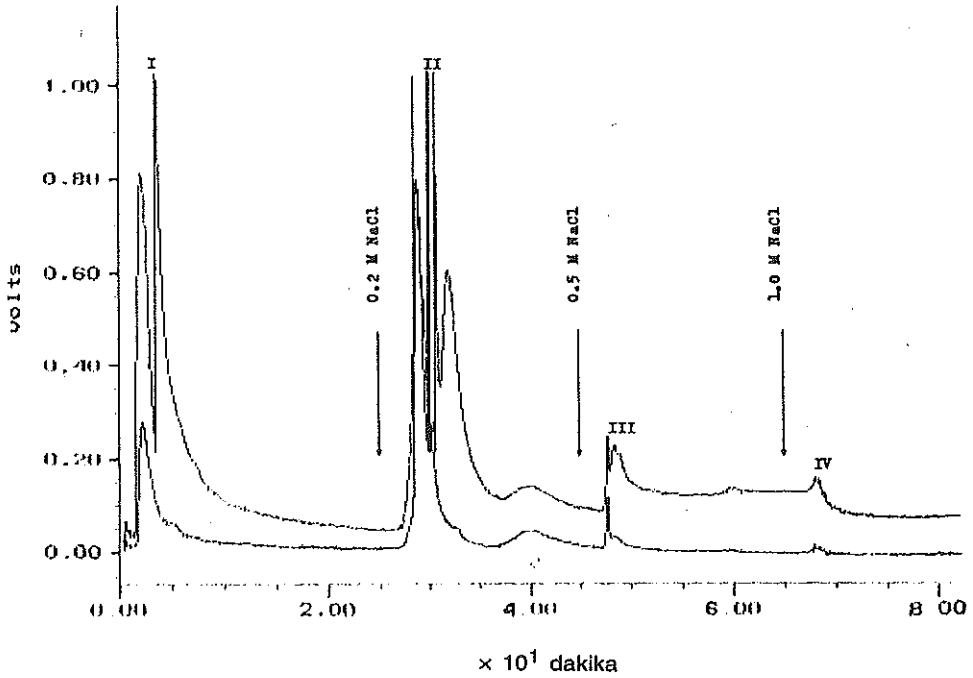
IFN-γ ölçümü

Slime ile uyarılan mononükleer hücre kültür süpernatantlarındaki IFN-γ düzeyleri ELISA kiti (TiterZyme, Interferon-γ EIA, PerSeptive Diagnostic Inc., Cambridge) kullanılarak ölçüldü.

B U L G U L A R

Slime maddesinde bulunan fraksiyonlar

Fenol ekstraksiyonu ile elde edilen slime maddesinin içerdiği fraksiyonlar DEAE-5PW kolon kullanılarak sıvı kromatografi ile ayrıldı. Artan konsantrasyonlarda NaCl uygulanmasına bağlı olarak 4 bölgede pikler kompleksi elde edildi. 220 nm ve 280 nm'de yapılan okumalarda elde edilen pikler aynı zamanlarda açığa çıkmaktadır. Slime maddesi içerisindeki polisakkarid fraksiyonundaki bileşikler (220 nm) protein karakterindeki bileşiklere göre (280 nm) daha heterojen bir grup oluşturmaktadır. Özellikle 0.2 M NaCl'ün uygulandığı ilk gradientte slime içerisindeki bileşiklerin çoğu açığa çıkmaktadır ve en heterojen bölge olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 1). NaCl uygulanmasına bağlı olarak elde edilen pikler Ludwicka ve ark.'nın¹⁷ bulguları ile uyumlu bulundu. Ancak elde edilen 4. pik Ludwicka ve ark.'larının elde ettikleri ve protein içeriği en yüksek olan pikten farklı olarak daha düşük bulundu. Bu araştırmacıların elde ettikleri her bir pikde tek bir madde veya birbirine benzer yapıdaki maddeler bulunduğu anlaşılmaktadır. Ancak kolondan elde edilen fraksiyon volümleri 1 ml olarak toplandıktan sonra absorbans ölçüldüğü için pik



Şekil 1: Fenol-salin ekstraksiyonu ile elde edilen slime maddesinin DEAE-5PW kolonu ile kromatografik görünümü. Örnek uygulama volümü 200 µl (15 mg/ml). Akım hızı 0.8 ml/dak. Okların olduğu yerler değişen konsantrasyonlardaki NaCl'ün uygulama zamanlarını göstermektedir. Üstteki eğri 220 nm de, alttaki eğri 280 nm de elde edilen okuma değerlerini göstermektedir.

içerisindeki değişik maddelerin harmanlanmış olabileceğini düşünmekteyiz. Elde ettikleri her bir pikde değişik şekerlerin bulunduğunu göstermiş olmaları, bu düşüncemizi doğrulamaktadır. Ayrıca kullanılan bakteri suşuna bağlı olarak slime içerisindeki fraksiyonlar farklı olabilmektedir^{17,20,21}.

Slime maddesinin TNF salgılanması üzerine etkisi

Kültür süpernatantlarındaki TNF aktivitesi TNF'ye duyarlı olan ve aktinomisin D (Sigma) ile duyarlılaştırılan fare L929 hücreleri kullanılarak bioassay yöntemi ile değerlendirildi¹¹. Slime maddesi ile (250 µg/ml) 24 saat uyarılan insan periferik kan mononükleer hücre kültür süpernatantlarındaki TNF aktivitesi, slime konulmamış ve aynı şartlardaki kontrol hücre kültür süpernatantlarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0.002) (Tablo 1).

Slime maddesinin IFN-γ salgılanması üzerine etkisi

İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinin 24 saatlik kültür süpernatantlarındaki IFN-γ düzeylerinin 5 pg/ml'den daha düşük düzeyde olduğu bulundu (1.14 ± 0.5 pg/ml). Ancak 250 µg/ml konsantrasyonda slime ile uyarılan hücrelerin süpernatantlarındaki IFN-γ düzeyleri eşdeğer hücrelerden oluşan kontrole göre anlamlı düzeyde artış gösterdi (p=0.005) (Tablo 2).

Tablo 1
Slime Maddesi ile Uyarılan Mononükleer Hücre Kültür Süpernatantlarında TNF Aktivitesi

	Kontrol MN Hücre Kültür Süpernatantları	Slime ile Uyarılmış MN Hücre Kültür Süpernatantları
% Sitotoksik aktivite	17.85 ± 1.34*	44.84 ± 16.8*

* Değerler deney sonuçlarının ortalaması ± standard sapma olarak ifade edildi. n = 7.

Tablo 2
Slime Maddesi ile Uyarılan Mononükleer Hücre Kültür Süpernatantlarında IFN-γ Konsantrasyonları

	Kontrol MN Hücre Kültür Süpernatantları	Slime ile Uyarılmış MN Hücre Kültür Süpernatantları
IFN-g konsantrasyonu (pg/ml)	< 5*	169 ± 123*

* Değerler deney sonuçlarının ortalaması ± standard sapma olarak ifade edildi. n = 7.

T A R T I Ş M A

Koagülaz negatif stafilokoklardan özellikle *S.epidermidis*'in klinik önemi artmaktadır. *S.epidermidis* hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden biridir. *S.epidermidis*'in ürettiği slime maddesi, tıbbi kullanıma giren kateter, protez, serebrospinal şant gibi plastik yapıdaki yabancı cisim yüzeylerinde kolonize olmasına neden olur¹⁻⁶.

Slime maddesi, bakteriyi saran, gevşek yapıda (glikokaliks) ve diğer bakterilerdeki polisakarid kapsüle benzer niteliktedir. Ham slime'in protein içeriği % 22, karbohidrat içeriği % 20'dir. Gaz kromatografi ile slime maddesi içerisinde galaktoz, mannoz ve glikoz standartlarına uygun lokalizasyonda piklerin açığa çıktığı bildirilmektedir²⁰. Slime maddesinin değişik monosakaritlerden oluşmuş kompleks bir yapı içerdiği diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir^{12,17,21}. Şekil 1'de görüldüğü gibi *S.epidermidis*'den elde edilen slime maddesinin karbohidrat ve protein içeriği açısından homojen bir madde olmadığı anlaşılmaktadır.

Mikroorganizmalara ait yapısal ve salgısal maddelerin immün sistem üzerine değişik etkiler yapabildiği bilinmektedir. Ayrıca fizyolojik bazı fonksiyonlar üzerine de etkiyebilmektedir. Bykowska ve ark.'ları²² *S.epidermidis* tarafından üretilen slime maddesinin hem ham formunun, hem de fenol-salin ekstraksiyon sonrası elde edilen formunun insan plazması için antikoagülan özellikte olduğunu bildirmişlerdir. Slime maddesi genel anlamda bir virulans faktörü olarak kabul edilir ve immün savunmaya karşı direnç oluşturur. *S.epidermidis*'den elde edilen slime maddesi bazı nötrofil ve lenfosit fonksiyonlarını engellemektedir^{13,14}. Ancak İshak ve ark.'ları⁴, periferik kandan izole edilen, slime üreten ve üretmeyen bakterilerin polimorfonükleer lökositler tarafından fagositoz sonrası öldürülmeleri arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca Noble ve ark.'ları²³ periferik kandan izole edilen *S.epidermidis*'lerin kontaminant olanlara göre nötrofillerin bakterisidal fonksiyonunu daha fazla inhibe ettiğini, buna karşın kalp kapakçıklarından izole edilen ve bol miktarda slime üreten iki *S.epidermidis* suşunun nötrofillerin bakterisidal fonksiyonunu engellemediğini bildirmişlerdir.

TNF ve IFN- γ gibi sitokinlerin immün sistemi oluşturan hücre fonksiyonları üzerine düzenleyici etkileri olduğu, immün cevabın şiddetini ve ne şekilde gelişeceğini belirleyen temel faktörler oldukları bilinmektedir²⁴. Slime maddesinin immün sistem hücrelerinden sitokin salgılanmasına olan etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmadı. Slime maddesinin yukarıda bahsedilen immün sistem hücreleri üzerine olan etkilerinin sitokinlerle ilgili olabileceği öngörülerek mononükleer hücrelerden TNF ve IFN- γ salgılanması üzerine etkisi araştırıldı. Tablo 1 ve Tablo 2'de görüldüğü gibi *S.epidermidis*'den elde edilen slime maddesi MN hücrelerden hem TNF hem IFN- γ salgınmasına neden olmaktadır. Bu açıdan bu maddenin MN hücreler üzerine uyarıcı etki gösterdiği anlaşılmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen slime maddesinin farelere i.v. yoldan enjekte edilmesinden sonra serum IFN seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir. İn vitro şartlarda da periton ve dalak hücrelerinden plastik yüzeye

yapışmayanların "non-adherent" *P.aeruginosa*'dan elde edilen slime maddesine karşı IFN salgıladıkları bildirilmiştir²⁵. Mantar hücre duvarında bulunan ve mannoz alt ünitelerini de içeren polisakkarid karakterindeki yapıların MN hücrelerden TNF salgılanmasına neden olduğu bildirilmektedir²⁶. Ayrıca mononükleer hücre membranında mannoz reseptörlerinin bulunduğu bilinmektedir²⁷. Bu nedenle MN hücrelerden TNF salgılanmasına slime'in içerdiği mannoz karakterindeki şekerlerin neden olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Patrick CC: Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. *J Pediatr* 1990, 116: 497-07.
2. Lowy FD, Hammer SM: Staphylococcus epidermidis infections. *Ann Intern Med* 1983, 99: 834-839.
3. Kloos WE, Bannerman TL: Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994, 7: 117-140.
4. Ishak MA, Gröschel DHM, Mandell GL, Wenzel RP: Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 1985, 22: 1025-1029.
5. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982, 37: 318-326.
6. Steckelberg JM, Keating MR, Rouse MS, Wilson WR: Lack of extracellular slime effect on treatment outcome of *Staphylococcus epidermidis* experimental endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1989, 23: 117-121.
7. Sultan N, Çağlar K, Aybay C: Slime faktör yapan ve yapmayan koagülaz negatif stafilocokların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının karşılaştırılması. *Ankem Dergisi* 1994, 8: 100.
8. Günaydın M, Leblebicioğlu H, Saniç A, Pirinççiler M: Koagülaz-negatif stafilocoklarda slime yapımı ve antibiyotik direnci ile ilişkisi. *Mikrobiyol Bült* 1995, 29: 26-31.
9. Verbrugh HA, Peters R, Peterson PK, Verhoef J: Phagocytosis and killing of staphylococci by human polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *J Clin Pathol* 1978, 31: 539-545.
10. Musher DM, Verbrugh HA, Verhoef J: Suppression of phagocytosis and chemotaxis by cell wall components of *Staphylococcus aureus* *J Immunol* 1981, 127: 84-88.
11. Aybay C, Başaydın İ, İmir T, Sultan N: Staphylococcal enterotoxin B induced TNF and IFN- γ production from human peripheral blood mononuclear cells and increased human NK cytotoxic activity. *Turkish Journal of Medical Sciences* 1995, 24: 51-55.
12. Kotilainen P, Oksman P, Vijanen MK, Nikoskelainen J, Huovinen P: Analysis of the relationship between bacterial adherence and extracellular production of mannose, galactose, glucose and ribose in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990, 9: 873-879.
13. Johnson GM, Lee DA, Regelman WE, Gray ED, Peters G, Quie PG: Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect Immun* 1986, 54: 13-20.
14. Gray ED, Peters G, Verstegen M, Regelman WE: Effect of extracellular slime substance from *Staphylococcus epidermidis* on the human cellular immune response. *Lancet* 1984, 18: 365-367.
15. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT: New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989, 42: 872-874.
16. Akova M, Gür D, Akalın HE, Baykal M: Klinik önemi olan *Staphylococcus epidermidis* suşlarının saptanmasında slime testinin yeri. *İnfeksiyon Dergisi* 1989, 3: 321-326.
17. Ludwicka A, Uhlenbruck G, Peters G, Seng PN, Gray ED, Jeljaszewicz J, Pulverer G: Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zbl Bakt Hyg A* 1984, 258: 256-267.

18. Nowotny A: Basic Exercises in Immunochemistry, a laboratory manual. 1979, pp: 69-72. Second ed., Springer-Verlag, New York.
19. Aybay C, Çağlar K, İmir T: Mechanism of natural killer cell lysis: Effect of microtubule disrupting agent on human NK cytotoxic activity. *Tr J Medical Sciences* 23: 5-8, 1995.
20. Kotilainen P, Maki J, Oksman P, Viljanen MK, Nikoskelainen J, Huovinen P: Immunochemical analysis of the extracellular slime substance of *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990, 9: 262-270.
21. Drewry DT, Galbraith L, Wilkonson BJ, Wilkonson SG: Staphylococcal slime: a cautionary tale. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 1292-1296.
22. Bykowska K, Ludwicka A, Wegrzynowicz Z, Lopaciuk S, Kopec M: Anticoagulant properties of extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Thrombosis and Haemostasis* 1985, 54: 853-856.
23. Noble MA, Grant SK, Hajen E: Characterization of a neutrophil-inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1990, 162: 909-913.
24. Durupınar B: Sitokinler ve enfeksiyon hastalıkları. *Mikrobiyol Bül* 1995, 29: 95-102.
25. Cembrzynska-Nowak M, Czarny A: Investigation on extracellular slime from *Pseudomonas aeruginosa* as interferon inducer in mice. *Arch Immunol Ther Exp (Abstract)* 1988, 36: 167-176.
26. Joualt T, Bernigaud A, Lepage G, Trinel PA, Poulain D: The *Candida albicans* phospholipomannan induces in vitro production of tumour necrosis factor- γ from human and murine macrophages. *Immunol* 83: 268-278, 1994.
27. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB Jr: Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* 1993, 91: 2596-2601.