

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

INVESTIGATION OF SOME VIRULENCE FACTORS OF *TRICHOSPORON ASAHII* STRAINS ISOLATED FROM THE CLINICAL SAMPLES OF HOSPITALIZED PATIENTS

*Aylin DAĞ***, *Nilgün ÇERİKÇİOĞLU***

ÖZET: Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden (43 idrar, birer periton sıvısı, kan, nefrostomi ve dil sürüntüsü örneği ile biri saprofit olarak tırnaktan) izole edilen toplam 48 adet *Trichosporon asahii* suşunda salgısal asit proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktiviteleri, "slime" üretme ve hidrofobisite özellikleri olmak üzere olası virulans faktörlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışılan 48 *T.asahii* suşunun hiçbirinde salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzimi üretimine rastlanmazken, suşların hepsinde esteraz aktivitesi bulunmuştur. Yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesinde hidrokarbon olarak n-hekzadekan kullanıldığında, 4 suş orta düzeyde hidrofobik, 43 suş düşük düzeyde hidrofobik özellik sergilerken, bir suşta yüzey hidrofobik özellik saptanmamıştır. Yüzey hidrofobisitesinin ölçülmesinde kullanılan ikinci yöntem olan polistiren mikroküre deneyinde, elde edilen değerler %53.2 ile %92.7 arasında olup, hidrofobisite suşlar arasında değişen oranlarda saptanmıştır. İzolatların "slime" üretimini saptamak için kullanılan modifiye tüp aderens yönteminde; 10 suş orta (++) pozitif, 18 suş zayıf (+) pozitif olarak "slime" üretmiş, 20 suş ise bu özellik açısından negatif saptanmıştır. *T.asahii* türünün virulansı hakkında literatürdeki verilerin henüz yetersiz olması nedeniyle, elde edilen bulguların bu alanda katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Trichosporon asahii*, virulans faktörleri.

ABSTRACT: In this study, acid proteinase, phospholipase and esterase activities, slime production and hydrophobic properties of a total of 48 *Trichosporon asahii* strains isolated from urine (43), peritoneal fluid (1), tongue swab sample (1), blood (1), nephrostomy (1) and one saprophyte strain from nail sample, 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

*Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Proje no: SAĞ-042/230804) tarafından desteklenmiştir.

**Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

hydrocarbon assay performed with n-hexadecane, four strains exhibited moderate hydrophobicity, while 43 strains showed low level hydrophobicity and one strain was found to be negative. In the second procedure to measure hydrophobicity by using microspheres assay, the results were found to differ among the strains, 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 moderate producers (++), 18 strains were weakly positive (+) and 20 strains were defined as non-slime producers. Since the current data on virulence factors of *T.asahii* is insufficient already, these results may contribute to the present data in the literature.

Key words: Trichosporon asahii, virulence factors.

G İ R İ Ő

Son 20 yıl içinde özellikle hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda antifungallere direnç gösteren ve nadir olarak enfeksiyon 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 bařlanmıřtır¹.

Trichosporon (*Basidiomycota*, *Hymenomyces*, *Trichosporonales*) türlerinin birçoğu doğada (toprak, su ve bitki) yaygın olarak bulunmakla birlikte, sadece 8 türü insan ve sığırardan hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. Ayrıca, insanda deri, solunum yolları, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde normal flora yesi olarak da yer alabilmektedir²⁻⁵.

Makroskobik olarak, dzgnden buruşuğa kadar değişebilen, krem renginde, yumuşak kıvamlı ve parlak koloniler oluřtururlar⁶. Mikroskobik olarak; mısır unlu-tween 80'li agarda 25°C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra, hiyalen septalı hifler ve yalancı hifler oluştururlar. Ayrıca, bu hifler boyunca oval veya köşeli, 2-4x3-9 µm boyutunda artrosporlar veya blastosporlar oluşturdukları gözlenmektedir. Geniş bir ısı aralığında (25-40°C) reme yeteneğine sahip olup, ortalama üreme ısıları 30°C'dir^{6,7}.

Trichosporon türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar trikosporonoz olarak isimlendirilir. Son yıllarda artan sıklıkta klinik örneklerden izole edilmeye başlanan tıbbi öneme sahip *Trichosporon* türleri, sistemik veya mukoza ile ilişkili ya da beyaz piyedrayı da içine alan yüzeyel enfeksiyonlara sebep olabilirler⁸. Trikosporonoz genelde nötropenik ve hematolojik malignitesi olan immünsüpresif hastalarda gelişir. Bunun dışında; aplastik anemi, organ transplantasyonu, AIDS ve solid 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 olmadığu düşkün hastalar arasında da gelişen olgular bulunmaktadır^{2,3,8-10}.

Yüzeyel mikozlara neden olan suşlar ile derin enfeksiyonlar oluşturan suşların morfolojik, fizyolojik ve genetik olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle *Trichosporon* türleri taksonomik gruplandırmaya alınmıştır^{4,11}. 1999

yılında yapılan son taksonomik sınıflandırma ile, insanda enfeksiyon etkeni olabilen altı *Trichosporon* türü (*T.asahii*, *T.mucooides*, *T.asteroides*, *T.cutaneum*, *T.inkin*, *T.ovooides*) tanımlanmıştır. Ayrıca farklı türler olarak bilinen *T.cutaneum* ve *T.beigellii*, 2002 yayınlarında birbirlerinin sinonimi olarak belirtilmiştir^{2,8-10,12}. *T.asahii* ve *T.mucooides* başlıca sistemik enfeksiyon, *T.asteroides* ve *T.cutaneum* yüzeysel enfeksiyon, *T.ovooides* (baş) ve *T.inkin* (genital bölge) ise beyaz piyendra etkenidir^{2,8-10}.

Fungal enfeksiyonların patogeneğinde konak-patojen ilişkisi oldukça karmaşık olup, bu ilişkide konakçıya ait pek çok faktörün yanı sıra, mikroorganizmaya ait çeşitli faktörler de rol almaktadır. Mikroorganizmayla ilişkili özellikler arasında; hif oluşumu, yüzeysel antijenik yapıların varlığı, fenotipik ve genotipik değişimler, yüzeysel hidrofobisitesi, "slime" üretimi ve hidrolitik bazı enzimlerin salınması gibi aderensi etkileyen faktörlerin yanı sıra, toksinlerin üretimi de sayılabilir¹³⁻¹⁵. Patogeneğinde 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 saptanmıştır¹⁶⁻¹⁸. 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 gösterilmiştir¹⁹.

Son yıllarda *T.asahii*, tüm dünyada olduğu gibi, hastanemizde yatmakta olan hastaların da klinik örneklerinden en sık izole edilen *Trichosporon* türü olarak dikkat çekmektedir. Bu verilerden yola çıkarak 2000 yılından itibaren ve çoğunluğu 2002-2003 yılları arasında olmak üzere, Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde çoğu yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *T.asahii* suşlarının olası virulans faktörlerinden salgısal asit proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivitelerinin, "slime" üretme ve hidrofobisite özelliklerinin araştırılması ve elde edilen verilerin ışığı altında, bu türe bağlı olarak gelişen enfeksiyonların patogeneğinde hangi virulans faktörü ya da faktörlerinin rol oynayabileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Standart *T.asahii* CBS 2479 suşunun Sabouraud dekstroz agar (SDA)'daki koloni morfolojisine dayanarak çalışma kapsamına alınan toplam 48 suşun 43'ü idrar, 1'i periton sıvısı, 1'i dil sürüntüsü, 1'i kan, 1'i nefrostomi örneğinden ve ayrıca 1'i de tırnaktan saprofit olarak izole edildi. İzolatlara germ tüp testi uygulandı, mısır-unlu-tween 80'li agar besiyerinde morfolojik özelliklerinin belirlenmesiyle birlikte üreaz aktiviteleri saptandı ve tür tanımlamasında ID 32C (bioMerieux, France) ticari asimilasyon kiti kullanıldı⁷. *T.asahii* olarak tanımlanan suşlar çalışma kapsamına alındı.

Asit Proteinaz Deneyi: Bu amaçla, *T.asahii* suşlarının 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. Daha sonra %1'lik siğir serum albumini içeren, pH: 5.0 olan katı besiyeri üzerine yerleştirilmiş olan 6 mm çapındaki steril kağıt disklerle damlatıldı. Petriler, 30°C'de 6 gün boyunca

inkübe edilerek lizis zonu oluşumu yönünden her gün incelendi. Altıncı günde lizis zonlarının mm olarak genişliklerine göre, proteolitik aktivitenin düzeyi belirlendi²⁰. Pozitif kontrol olarak, salgısal asit proteinaz üreten standart *C.albicans* CBS 2730 suşu kullanıldı.

Fosfolipaz Deneyi: Suşların SDA'da 18-24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen kolonilerinden steril serum fizyolojik içinde maya süspansiyonu hazırlandı. Yumurta sarısı içeren pH: 4.3 olan besiyerlerine, ölçülü özeyle (0.01 ml) yüzeye değiştirilmek suretiyle ekim yapıldı ve 37°C'de 4 gün inkübe edildi. Fosfolipaz aktivitesi, koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı²¹. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* CBS 5314 suşu kullanıldı.

Esteraz Deneyi: SDA'da 24 saatlik inkübasyon sonucu üretilen kolonilere steril eküvyon dokundurularak alındı ve tween 80 içeren pH: 6.8 olan katı besiyerine daire şeklinde (yaklaşık 10 mm çapında) ekim yapıldı. 30°C'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, pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirildi^{7,19,22,23}. Her suş için deney üç kez tekrarlandı.

Yüzey Hidrofobisitesinin Ölçülmesi: Bu amaçla iki ayrı yöntem uygulandı. Hidrokarbon adezyon yönteminde, hücre yüzey hidrofobisitesi Rosenberg ve arkadaşlarının^{24,25} yapmış olduğu yöntem modifiye edilerek araştırıldı. 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 2 ayrı tüpe (12x75 mm) konuldu. Tüplerden birine 0.5 ml n-hekzadekan eklendi, diğer tüp ise yalnızca maya süspansiyonu içeren kontrol tüpü olarak kullanıldı. Tüpler 10 dakika 37°C'de su banyosunda tutulduktan sonra her tüp 2 dakika 1400 rpm'de vorteksenerek hidrokarbon kısım ile maya süspansiyonunun iyice karışması sağlandı. Daha sonra tüpler 37°C'de 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 absorbands değeri ölçüldü ve kontrol tüpü ile karşılaştırıldı²⁴⁻²⁶.

Hidrokarbon adezyon yöntemi ile günde üç kez üç gün üst üste yapılan her bir deneyden elde edilen absorbands değerinin ortalaması alınarak yüzde absorbands değerleri n-hekzadekan için $\% A_{660} = [(A_{660} \text{ kontrol tüpü} - A_{660} \text{ test tüpü}) / (A_{660} \text{ kontrol tüpü})] \times 100$ 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 değerlendirildi²⁹.

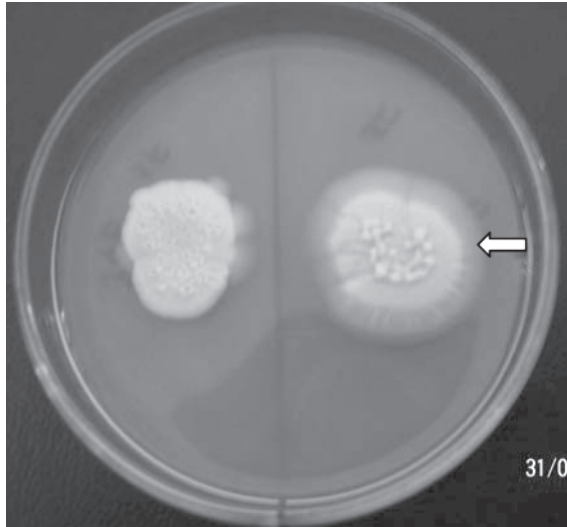
Uygulanan diğer yöntem olan polistiren mikroküre yönteminde, Hazen ve arkadaşlarının¹⁷ geliştirmiş olduğu yöntem referans alındı. Bu amaçla polistiren lateks, mavi renkli ve $0.825 \pm 0.1 \mu\text{m}$ çapındaki sıvı süspansiyon halinde stoklanmış boncuklar (%10 katı halde) kullanıldı. Stok boncuk süspansiyonundan 6 μl alınarak 2 ml soğuk PUM tampon çözeltisinde sulandırıldı ve yaklaşık olarak 9.02×10^8 /ml boncuk elde edildi. Thoma lamında sayılan her bir suş yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde soğuk PUM tampon çözeltisi ile sulandırıldı. Boncuk

süspansiyonundan 150 μ l, maya süspansiyonundan 150 μ l alınarak karıştırıldı. Elde edilen karışım hemen oda ısısına getirilerek 30 sn vortekslandı. Bu karışımdan bir damla alınıp lam üzerine kondu ve üzeri lamelle kapatılarak 40x objektif ile sayım yapıldı^{25,27}. Her bir suş için 100 maya hücresi sayıldı. Bu maya hücrelerinin içinde üç veya daha fazla boncuk bağlanmış olan mayaların sayısı belirlenerek o suşun yüzde (%) cinsinden hidrofobisitesi olarak değerlendirildi.

“Slime” Üretiminin Araştırılması: Sabouraud glukoz agardaki 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 “slime” üretimi açısından olumlu olarak değerlendirildi. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar; zayıf (+) pozitif, orta (++) pozitif ve kuvvetli (+++) pozitif olarak yorumlandı. Besiyeri ile hava kesişimindeki boya tutulmaları ise olumsuz olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı²⁸.

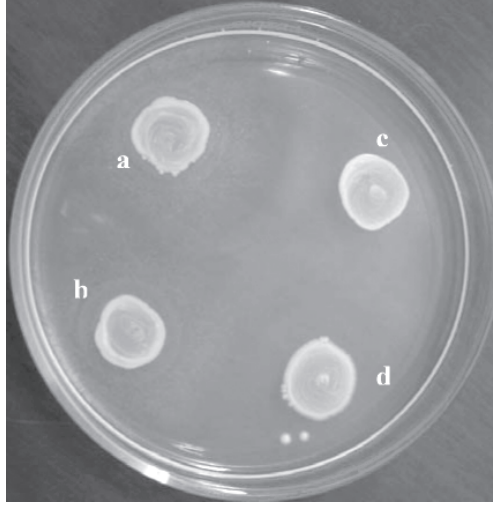
B U L G U L A R

Çalışılan 48 *T.asahii* izolatu ile CBS 2479 *T.asahii* var.*asahii* standart suşu da dahil olmak üzere hiçbir suшта salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzimi üretimine rastlanmamış, ancak bazı suşlarda fosfolipaz aktivitesini taklit eden zon oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1).



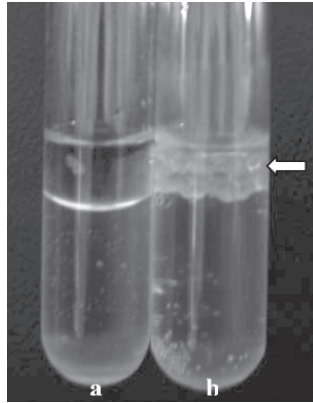
Şekil 1: Yumurta sarısı içeren besiyerinde fosfolipaz negatif ve yalnızca fosfolipaz presipitasyon zonu oluşturan *T.asahii* suşu.

T.asahii izolatlarının 7'si (%14.6) (6 idrar, 1 periton sıvısı izolatu) birinci gün esteraz aktivitesi gösterirken, 24'ü (%50) (1 dil sürüntüsü, 1 tırnak, 22 idrar izolatu) ikinci gün, 17'si (%35.4) (1 kan, 1 nefrostomi, 15 idrar izolatu) üçüncü gün esteraz aktivitesi göstermiştir. *T.asahii* CBS 2479 standart suşunun ise esteraz aktivitesi ikinci günde saptanmıştır (Şekil 2).



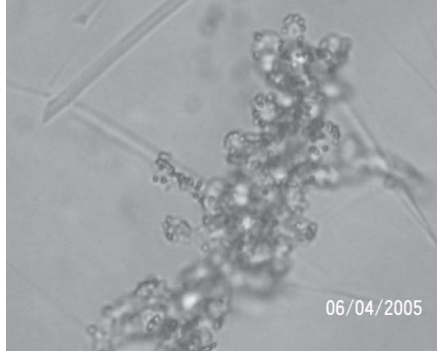
Şekil 2: a ve b: Esteraz aktivitesi pozitif, c ve d: Esteraz aktivitesi negatif *T.asahii* suşları.

Hidrokarbon olarak n-hekzadekan kullanıldığında; 4 izolat (%8.3) (3 idrar, 1 tırnak izolatu) orta düzeyde hidrofobik, 43 izolat (%89.6) (1 periton, 1 kan, 1 nefrostomi, 1 dil sürüntüsü ve 39 idrar izolatu) düşük düzeyde hidrofobik olarak saptanırken bir idrar izolatu (%2.1) ile standart *T.asahii* CBS 2479 suşunda ise yüzey hidrofobik özellik saptanmamıştır (Şekil 3).



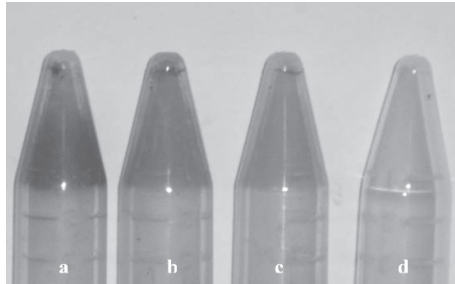
Şekil 3: Hidrokarbon adezyon yöntemi; a) yüzey hidrofobik özelliği düşük olan suş, b) yüzey hidrofobik özelliği yüksek olan suş.

Yüzey hidrofobitesinin ölçülmesinde kullanılan ikinci yöntem olan polistiren mikroküre deneyinde, her bir suş için üç gün üst üste günde üç kez olmak üzere tekrarlanan deneylerin ortalaması alınmış ve suşların yüzey hidrofobitesi yüzde olarak belirlenmiştir. Buna göre elde edilen değerler en düşük %53.2 (tırnak izolatu) ile en yüksek %92.7 (idrar izolatu) arasında değişmektedir (standart sapma ± 8.659). Standart *T.asahii* CBS 2479 suşunun bu yöntem ile hidrofobik özelliği %47.5 olarak bulunmuştur. Polistiren mikroküre yöntemi ile elde edilen hidrofobite yüzdelerinin klinik örneklerle göre değerlendirildiğinde; periton izolatının %84.5, kan izolatının %89, nefrostomi izolatının %72.3, dil sürüntüsü izolatının %88.7, tırnak izolatının %53.2 ve idrar izolatlarının %70.4-92.7 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4: Polistiren mikroküre yönteminde boncuklarla bağlanan maya hücreleri.

Suşların "slime" üretimini saptamak için kullanılan modifiye tüp aderens yönteminde; 1 periton, 1 nefrostomi ve 8 idrar izolatu olmak üzere 10 suş (%20.8) orta (++) pozitif, 18 idrar izolatu (%37.5) zayıf (+) pozitif "slime" üretimi göstermiştir. Birer kan, dil sürüntüsü ve tırnak izolatu ile 17 idrar izolatu olmak üzere toplam 20 suş (%41.7) ve *T.asahii* CBS 2479 standart suşu "slime" üretimi yönünden negatif olarak saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5: Modifiye tüp aderens yöntemi ile "slime" üretimi: a: (+++) ATCC 35984 *Staphylococcus epidermidis* suşu; b: (++) , c: (+), d: (-) *T.asahii* suşları.

Olası virulans faktörlerinin araştırılması amacıyla uygulanan tüm deneylere ait sonuçlar Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: Tüm Olası Virulans Faktörlerine Ait Sonuçlar

	Salgisal Asit			"Slime" n (%)	Hidrofobisite	
	Proteinaz n (%)	Fosfolipaz n (%)	Esteraz n (%)		n-hekzadekan n (%)	Mikroküre n (%)
Negatif	48 (100)	48 (100)	0	20 (41.7)	1 (2.1)	0
Pozitif	0	0	48 (100)	28 (58.3)	47 (97.9)	48 (100)
Toplam	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)	48 (100)

TARTIŞMA

Çalışmamızda *T.asahii* klinik izolatlarının büyük bir kısmının kaynağını idrar örnekleri (%89.6) oluşturmaktadır. Sugita ve arkadaşları³⁰ tarafından yapılan bir çalışmada *T.asahii*'nin izole edildiği klinik örneklerin dağılımında idrar en yüksek oranla (%38.1) ilk sırada yer almakta olup, benzer olarak Toriumi ve arkadaşlarının³¹ yapmış olduğu bir çalışmada da *T.asahii* suşlarının klinik örnekler göre dağılımında idrar (%44.1) en yüksek oranla ilk sıradadır. Bu açıdan literatürle uyumlu olmakla birlikte, bu kadar yüksek bir oranda idrar izolatu ilk kez çalışmamızda saptanmıştır. İzolasyon sıklıklarındaki bu çarpıcı artışa karşın, literatür taraması yapıldığında, bu mantara bağlı olarak gelişen enfeksiyonların patogeneğinde rol alabilecek olan fungal virulans faktörlerinin araştırıldığı kapsamlı çalışmalara rastlanmamıştır.

Candida albicans'ın patojenitesinde rol oynadığı bilinen virulans faktörlerinden yola çıkarak Ichikawa ve arkadaşları¹⁰ yapmış oldukları çalışmada, %42.2'sini idrar örneklerinin oluşturduğu toplam 61 *T.asahii* suşunun hiçbirinde salgısal asit proteinaz enzimi üretimine rastlanmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, salgısal asit proteinaz deneyinde elde ettiğimiz sonuçlarla, sözü geçen araştırmacıların elde ettiği sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Diğer bir hidrolitik enzim olan fosfolipaz aktivitesi açısından irdelendiğinde, hiçbir izolatta fosfolipaz üretimine rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki tek çalışma olan Ichikawa ve arkadaşlarının¹⁰ bildirimleri ile uyumlu bulunmuştur. Ancak çalışmamızın dikkat çekici bulgusu, bazı *T.asahii* suşlarının yumurta sarısı içeren besiyerinde koloni etrafında fosfolipaz aktivitesi ile karıştırılacak bir presipitasyon zonu oluşturduklarının gözlenmiş olmasıdır (Şekil 1). Öze yardımıyla mevcut zondan alınan örneklerin mikroskopik incelemesinde bunların mayaya ait hifal yapılardan oluştuğu anlaşılmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak, *T.asahii* suşlarının fosfolipaz aktivitesi araştırılırken yalancı pozitiflik dikkate alınarak değerlendirme yapılmasını önermekteyiz.

Değerlendirmeye alınan bir diğer enzimatik aktivite esteraz enzimi üretimidir. Çalışma kapsamına aldığımız tüm *T.asahii* suşlarının (%100) esteraz aktivitesi pozitif bulunmuş, ancak *T.asahii*'nin esteraz aktivitesini araştırmaya yönelik herhangi bir yayın bulunmadığından literatürle kıyaslama olanağımız olmamıştır.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer virulans faktörü, izolatların hidrofobisite özellikleridir. 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 sürülmüştür³². Bizim çalışmamızda da hidrokarbon adezyon yöntemi ile *T.asahii* suşlarının hidrofobisite özelliklerinin saptanamaması veya düşük düzeyde saptanması literatür verileriyle uygunluk göstermektedir.

Yüzey hidrofobik özelliğinin saptanmasında ikinci yöntem olarak Hazen ve arkadaşları²⁷ tarafından uygulanan polistiren mikroküre yönteminde mikroskopik olarak inceleme yapıldığı için maya ve hifal formları gözlemlenebilirliği nedeniyle, güvenilirliğinin spektrofotometrik okumaya dayanan hidrokarbon adezyon yöntemine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Mikroküre yöntemi ile hidrokarbon adezyon yöntemine göre daha yüksek oranlarda hidrofobik özelliğinin 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* suşları ile ortam farklılıklarının hidrofobisite üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda en önemli gözlemlerden birisi, mantarların hifal formlarının maya formlarına göre daha fazla adeziv ve hidrofobik olmalarıdır²⁷. Çalışmamızda kullanılan *T.asahii* suşları da hifal form oluşturmaya ve bu nedenle daha yüksek oranda boncuk bağlamaya eğilimli olduklarından, mikroküre deneyinde yüksek hidrofobisite sergilemişlerdir. Literatürde *T.asahii* dahil *Trichosporon* türlerinde yüzey hidrofobik özelliğinin araştırılmasına dair bir çalışmaya rastlanmadığından, sonuçlarımız yalnızca *Candida* türlerinin kullanıldığı az sayıda çalışmaları ile kıyaslanabilmektedir.

Çalışmamızda modifiye tüp aderens yöntemi ile "slime" üretimi açısından orta pozitif saptanan 10 *T.asahii* suşunun sekizinin idrar ve birer tanesinin de periton sıvısı ve nefrostomi izolatları olduğu, zayıf pozitif saptanan 18 suşun hepsinin ise idrar izolatu olduğu görülmüştür. İdrar dışı klinik izolatlar az sayıda olduğu için çalışma kapsamına alınan *T.asahii* suşlarının izole edildikleri klinik örneğe göre "slime" üretimleri yönünden kıyaslamaları yapılamamıştır. Ek olarak literatürde *T.asahii* suşlarını "slime" üretimi açısından inceleyen, kıyaslama yapabileceğimiz daha başka çalışmalara da rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda çoğu idrardan izole edilen *T.asahii* suşlarında patojenitede rol alabilecek olası virulans faktörlerinden; esteraz aktivitesi tüm suşlarda saptanırken, yüzey hidrofobisitesi ve "slime" üretimi özellikleri değişen düzeylerde belirlenmiştir. Araştırmamızın amacı doğrultusunda suşlarımız yalnızca

mikrobiyolojik açıdan değerlendirmeye alınmıştır. Bu nedenle saptanan olası virulans faktörlerinin, *T.asahii*'nin neden olduğu enfeksiyonların patogeneğinde rolü olup olmadığının söylenebilmesi mümkün değildir. Saptanan faktörlerin patojenitedeki gerçek etkilerinin ortaya konulması açısından, klinik verilerle birlikte değerlendirmelerin yapılacağı çalışmalara gerek olmasına rağmen, bu çalışmada elde edilen verilerin, *T.asahii* türünün virulansı hakkında literatüre katkıda bulunacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Segal BH, Bow EJ, Menichetti F. Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16: 935-64.
2. Gueho E, Improvisi L, Hoog de GS, Dupont B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses* 1994; 37: 3-10.
3. Middelhoven WJ. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. *Mycoses* 2003; 46: 7-11.
4. 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* 1999; 37: 1985-93.
5. Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1458-60.
6. Hilmioglu S. Derinin yüzeyel mantar enfeksiyonları, s: 1025-9. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999; Güneş Kitabevi, Ankara.
7. Larone DH. Medically Important Fungi: A Guide To Identification, pp: 140-2. 2002, 4th ed, ASM Press, New York.
8. Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5467-71.
9. Chowdhary A, Ahmad S, Khan ZU, Doval DC, Randhawa HS. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: a case report and an update. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22: 16-22.
10. 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* 2004; 48: 237-42.
11. Fournier S, Pavageau W, Feuillade M, et al. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 892-6.
12. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Yang R, Li R, Nishimura K. Identification of the first isolates of *Trichosporon asahii* var. *asahii* from disseminated trichosporonosis in China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44: 17-22.
13. 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. 1993, Ankara.
14. Çerikçioğlu N, Topçu AW. *Candida* türleri, s: 1797-809. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2002, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
15. Vartivarian SE. Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanisms of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 30-6.
16. Monod M, Borg-von ZM. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol* 2002; 81: 114-28.

17. Rudek W. Esterase activity in *Candida* species. J Clin Microbiol 1978; 8: 756-9.
18. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. Infect Immun 1996; 64: 2936-40.
19. Yücesoy M, Marol S. *Candida* türlerinin esteraz aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bül 2003; 37: 59-63.
20. Çerikçioğlu N, Alaçam R. *Candida* suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerlerinde gösterilmesi. Mikrobiyol Bül 1993; 27: 344-51.
21. Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. Mycoses 1991; 34: 217-20.
22. Keçeli SA, Budak F. *Candida* türlerinde esteraz aktivitesi. Mikrobiyol Bül 2004; 38: 99-103.
23. Sliifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol 2000; 38: 4626-8.
24. Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 1984; 22: 289-95.
25. Hazen KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect Immun 1989; 57: 1894-900.
26. Miyake Y, Fujita Y, Minagi S, Suginaka H. Surface hydrophobicity and adherence of *Candida* to acrylic surfaces. Microbios 1986; 46: 7-14.
27. Hazen KC, Hazen BW. A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations. J Microbiol Methods 1987; 6: 289-99.
28. Çerikcioglu N, Över Hasdemir U, San T, Salik E, Söyletir G. Simple and reliable detection of slime production of *Candida* spp. directly from blood culture bottles; comparison of visual tube method and transmission electron microscopy. Mycopathologia 2004; 158: 279-84.
29. Hazen KC, Plotkin BJ, Klimas DM. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Infect Immun 1986; 54: 269-71.
30. Sugita T, Ichikawa T, Matsukura M, et al. Genetic diversity and biochemical characteristics of *Trichosporon asahii* isolated from clinical specimens, houses of patients with summer-yype-hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. J Clin Microbiol 2001; 39: 2405-11.
31. 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 2002; 46: 89-93.
32. Kennedy MJ, Sandin RL. Influence of growth conditions on *Candida albicans* adhesion, hydrophobicity and cell wall ultrastructure. J Med Vet Mycol 1988; 26: 79-92.