

Trichosporon spp. Suşlarında Bazı Virülans Faktörlerin Araştırılması

Investigation of Some Virulence Factors in *Trichosporon* spp. Strains

Feyza DEMİR¹, Semra KUŞTİMUR²

¹ Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Van.

¹ Van Regional Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Van, Turkey.

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 22.05.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.08.2014

ÖZET

Son yıllarda, kronik hastalığı olan kişilerin yaşam süresinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, cerrahi girişimler ve sitotoksik ilaç tedavisi uygulamalarının artmasına paralel olarak mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı da artmış ve önceleri kontaminant/kolonizasyon olarak değerlendirilen *Trichosporon*, *Fusarium* ve *Geotrichum* gibi mantarlar özellikle nötropenik hastalarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaya başlamıştır. Bu çalışmanın amacı, *Trichosporon* türlerinde, fungal virülans faktörlerinden olan salgısal asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz, koagülaz ve hemolitik aktivite varlığının araştırılmasıdır. Çalışmaya, 24 (%60)'ü *Trichosporon asahii*, 6 (%15)'si *T.inkin* ve 10 (%25)'u diğer türler (biri adet olmak üzere *T.aquatile*, *T.asteroides*, *T.coremiiforme*, *T.cutaneum*, *T.dermatis*, *T.faecale*, *T.japonicum*, *T.montevideense*, *T.mucoide*, *T.ovoides*) olmak üzere toplam 40 *Trichosporon* suşu dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması; mısır unu agar besiyerinde mikroskopik morfoloji (blastospor, artrospor, klamidiospor, yalancı hif ve gerçek hif) ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API ID32C; bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Asit proteinaz aktivitesi %1'lik sığır serum albumini içeren agar ile, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarısı içeren katı besiyeri ile, esteraz aktivitesi Tween 80 içeren katı besiyeri ile, hemolitik aktivite %5-10 koyun kanlı Sabouraud dekstroza agar ile değerlendirilmiştir. Koagülaz enzim aktivitesi ise insan ve tavşan plazmaları ile kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, 40 *Trichosporon* spp. suşunun hiçbirisinde salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitesi tespit edilmemiş; buna karşın tüm *Trichosporon* suşlarında esteraz enzim aktivitesi pozitif olarak saptanmıştır. Hemolitik enzim aktivitesi ise, ikisi *T.asahii*, biri *T.japonicum* olmak üzere üç suşta “+++”, 12 suşta (9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.asteroides*, 1 *T.montevideense*) “++” olmak üzere toplam 15 (%37.5) suşta pozitif olarak bulunmuştur. Hemolitik enzim aktivitesi pozitif olan 15 izolatın 11'i *T.asahii* olmakla birlikte, türler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Koagülaz enzim aktivitesi değerlendirildiğinde; insan plazması ile yapılan testlerde suşların %5 (2/40; 1 *T.asahii*, 1 *T.inkin*)'i tavşan plazması ile yapılan testlerde ise

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Feyza Demir, Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Süphan Mahallesi Edremit Yolu 1. km, Van, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 432 215 7601, **E-posta (E-mail):** feyzademir2009@hotmail.com

%27.5 (11/40; 9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.montevideense*)'i pozitif sonuç vermiştir. Çalışmamızın verileri, *Trichosporon* suşlarında saptanan esteraz, hemolizin ve koagülaz üretiminin, enfeksiyonların patogene-zinde rolü olabileceğini düşündürmekle birlikte, bu konu ile ilgili yapılması gereken geniş kapsamlı klinik ve mikolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: *Trichosporon*; virülan faktörleri.

ABSTRACT

The frequency of fungal infections have increased recently in parallel to prolonged survival of patients with chironal infections, common use of the broad-spectrum antibiotics and cytotoxic drugs and surgical interventions. Fungi such as *Trichosporon*, *Fusarium* and *Geotrichum* that were previously evaluated as contaminant/colonization, become important causes of morbidity and mortality especially in neutro-penic patients. The aim of this study was to investigate the presence of virulence factors such as acid proteinase, phospholipase, esterase, coagulase and hemolytic activity among *Trichosporon* species. A total of 40 *Trichosporon* strains, of them 24 (60%) were *T.asahii*, 6 (15%) were *T.inkin* and 10 (25%) were the other species (one of each of *T.aquatile*, *T.asteroides*, *T.coremiiforme*, *T.cutaneum*, *T.dermatis*, *T.faecale*, *T.japonicum*, *T.montevideense*, *T.mucoides*, *T.ovoides*) were included in the study. Identification of the isolates was performed according to microscopic morphology (blastospores, arthrospores, pseudohy-phae and true hyphae) on corn meal agar media, and carbohydrate assimilation patterns (API ID32C; bioMérieux, France). Secretory acid proteinase, phospholipase and esterase activities of the strains were evaluated by 1% bovine serum albumin containing agar, by egg yolk containing solid medium, and by Tween 80 containing solid medium, respectively. Hemolytic activity of the isolates were evaluated by 5-10% sheep blood Sabouraud dextrose agar. Coagulase enzyme activity was determined by using human and rabbit plasma. In our study, all of the 40 *Trichosporon* spp. strains were found negative in terms of acid proteinase and phospholipase enzyme activity, however all were positive for esterase enzyme activity. Hemolytic enzyme activity were identified in a total of 15 (37.5%) strains, being “+++” in three strains (2 *T.asahii*, 1 *T.japonicum*), and “++” in 12 isolates (9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.asteroides*, 1 *T.montevideense*). Although 11 of those 15 positive strains were *T.asahii*, there was no statistical difference between the species in terms of hemolytic enzyme activity ($p > 0.05$). Coagulase enzyme activity was detected in 5% (2/40; 1 *T.asahii*, 1 *T.inkin*) of the strains with human plasma and in 27.5% (11/40; 9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.montevideense*) with rabbit plasma. In conclusion, our data indicated that esterase, coagulase and hemolytic activities detected in *Trichosporon* spp. might play role in the pathogenesis of *Trichosporon* infections, however, further large-scaled clinical and mycological studies are needed to prove this relation.

Key words: *Trichosporon*; virulence factors.

GİRİŞ

Son yıllarda, kronik hastalığı olan kişilerin yaşam süresinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, cerrahi girişimler ve sitotoksik ilaç tedavisi uygulamalarının artması gibi nedenlerle mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı da artmış, özellikle nötropenik hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak karşımıza çıkmaya başlamış-tır¹. *Trichosporon*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Geotrichum* gibi cinsler önceleri kontaminant-kolonizasyon olarak değerlendirilirken, günümüzde duyarlı hastalarda, yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara yol açmaları nedeniyle önem kazanmışlardır¹⁻³.

Trichosporon cinsi mayalar *Basidiomycota* sınıfı, *Hymenomycetes* takımı, *Trichosporonales* ailesinde yer almakta olup doğada toprak, su, hava ve bitkilerde yaygın olarak bulunur.

İnsanlarda ise gastrointestinal ve genitoüriner kanalın normal flora üyesi veya geçici olarak deri ve solunum sistemine kolonize olabilir^{4,5}. Günümüzde tanımlanmış 50 tür olup bunlardan sekizinin (*T.asahii*, *T.asteroides*, *T.cutaneum*, *T.inkin*, *T.mucoides*, *T.ovoides*, *T.japonicum*, *T.loubieri*) insanda enfeksiyona yol açtığı gösterilmiştir^{2,4}. *Trichosporon* türleri, Sabouraud veya patates dekstroza agarda 25-40°C'de 5-7 günde ürer. Koloni morfolojisi; düzgünden buruşuğa kadar değişebilen, krem renginde, yumuşak kıvamlı ve parlak renktedir; bekledikçe düzensiz kıvrımlar oluşturarak kireç görünümünde koloniler ortaya çıkar⁶. Mikroskopik incelemede (mısır unu agarda 25°C'de 72 saatlik inkübasyon sonrası) hiyalen septalı hifler ve etrafında oval-köşeli artrospor veya blastospor görülmektedir³. Tek hücreli ve genellikle kübik, fıçimsı veya uzun görümlü artrokonidyumların varlığı, diğer maya türlerinden ayırimda önemli yer tutmaktadır⁷.

Mantar enfeksiyonlarının patogenezinde rol alan virülans faktörleri, işlevlerine göre "kolonizasyonu başlatan ve ilerleten" ve "konağa zarar veren" ürünler olarak sınıflanabilir. Bu faktörlerden bazıları; hif oluşumu, yüzeyel antijenik yapılar, fenotipik ve genotipik değişim gösterebilmesi, yüzeyel hidrofobisite, adezinler, toksinler ve hidrolitik enzimler, kapsül ve hücre duvarı bileşenleridir⁸. Literatürde *Trichosporon* türlerinde virülans faktörlerini araştıran çalışma sayısı sınırlıdır⁹⁻¹¹. Ichikawa ve arkadaşları⁹, 61 *T.asahii* izolatında olası virülans faktörlerini (fenotipik değişim ve ekstraselüler hidrolitik enzim aktivitesi) araştırmışlar ve bu izolatlarda dört farklı fenotip saptamışlardır. Dağ ve arkadaşlarının¹⁰ 48 *T.asahii* izolatı ile yaptıkları çalışmada, asit proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivitesi, *slime* üretimi ve yüzeyel hidrofobisite araştırılmıştır. Sun ve arkadaşları¹¹ ise, 23 *T.asahii* izolatında asit proteinaz ve fosfolipaz enzimlerini ve hemolitik aktivite varlığını araştırmışlardır. Bu çalışmada, *Trichosporon* türlerinde, mantarların virülans faktörleri olarak kabul edilen asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz, hemolizin ve koagülaz enzim aktivite varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmaya, 2010-2012 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Laboratuvarına maya tiplendirmesi için gelen kültür örneklerinden, mısır unu agar-da morfolojik inceleme ve karbonhidrat asimilasyon testlerinin (ID 32C; bioMérieux, Fransa) uygulanması sonrası *Trichosporon* spp. olarak tanımlanan 20 suş (14 *T.asahii*, 6 *T.inkin*) ile Prof. Dr. Takashi Sugita'dan (Japonya) temin edilen 20 suş (10 *T.asahii* ve birer adet olmak üzere *T.aquatile*, *T.asteroides*, *T.coremiiforme*, *T.cutaneum*, *T.dermatis*, *T.faecale*, *T.japonicum*, *T.montevideense*, *T.mucoides*, *T.ovoides*) olmak üzere toplam 40 *Trichosporon* suşu alındı.

Salgısal Asit Proteinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla %1'lik sığır serum albumini içeren agar (SSAA) kullanıldı. Suşlar Sabouraud dekstroza agar (SDA)'a pasajlanarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden steril serum fizyolojik kullanılarak 0.5 McFarland'a göre süspansiyonlar hazırlandı. SSAA üzerine 10 µl maya süspansiyonundan damlatıldı ve 37°C'de altı gün süreyle inkübe

edildi (Üreme sürecinde proteinaz aktivitesi sonucunda koloni çevresinde bulunan prote-inlerin yıkımına bağlı olarak, bu bölgelerde şeffaf bir lizis zonu oluşur). Testin değerlendirilmesinde, bu lizis zonun mm cinsinden genişliği ölçülerek proteinaz aktivitesinin düzeyi belirlendi. Eğer koloni çevresinde lizis zon oluşumu yok ise negatif (-), lizis zonu 1-2 mm ise orta pozitif (+) ve 3-5 mm ise kuvveti pozitif (++) olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak, salgısal asit proteinaz üreten standart *C.tropicalis* NRRLY 12968 suşu kullanıldı ve deney her bir suş için 3 kez tekrar edildi^{12,13}.

Fosfolipaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Trichosporon suşları, içerisinde yumurta sarısı bulunan, pH 4.2 olarak ayarlanmış katı besiyeri ile değerlendirildi. Bu amaçla suşlar SDA'a pasajlanarak 37°C'de 18-24 saatlik inkübe edildi. Üreyen kolonilerden steril serum fizyolojik kullanılarak 0.5 McFarland'a göre süspansiyonlar hazırlandı. Her bir petriye maya süspansiyondan 10 µl alınarak besiyeri yüzeyine ekim yapıldı ve 37°C'de dört gün inkübe edildi. Fosfolipaz enzim aktivitesi değerlendirilirken, kolonilerin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) esas alındı. Fosfolipaz aktivitesi, kolon çapının (a), koloni ile birlikte presipitasyon halkasının toplam çapına (b) oranı (a/b) olarak hesaplandı. Pz değeri > 1.00 ise negatif; 0.9-1.00 ise (+) pozitif; 0.89-0.8 ise (++) pozitif; 0.79-0.7 ise (+++) pozitif ve < 0.69 ise (+++++) pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *C.albicans* ATCC 10231 suşu kullanıldı. Deney her suş için 3 kez tekrarlandı¹³⁻¹⁵.

Esteraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla Tween 80 içeren ve pH 6.8 olan katı besiyeri kullanıldı. Suşlar SDA'ya pasajlanarak 24 saat 37°C'de inkübe edildi ve besiyerinde üreyen kolonilerden steril eküvyon ile Tween 80 agara 10 mm çapında daire biçiminde ekim yapıldı. 30°C'de 10 gün inkübe edilerek plaklar her gün arkadan ışık verilerek incelendi (Esteraz enzim varlığında serbest kalan yağ asitleri besiyerinin içeriğinde bulunan kalsiyum iyonları ile birleşerek çözünmeyen kalsiyum kristalleri oluşturur). Üreyen koloni etrafında opak kristallerin çökmesi esteraz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak *C.glabrata* ATCC 90030 suşu kullanıldı. Deney her suş için 3 kez tekrarlandı^{16,17}.

Hemolitik Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla %5-10 koyun kanlı SDA (Orbak, Ankara) kullanıldı. Suşlar SDA besiyerine pasajlanarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden steril serum fizyolojik kullanılarak 0.5 McFarland'a göre süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonlardan 10 µl'lik miktar alınarak besiyerine 5 mm çap oluşturacak şekilde ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de 48 saat süre ile %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. Koloniler etrafında oluşan ışığı geçiren saydam halkalar hemoliz zonu olarak belirlendi. Hemolitik aktivite; koloni çapının, koloni çapı ile şeffaf zonun toplamına oranı ile belirlendi ve Hz olarak ifade edildi. Hz değeri 1 ise negatif; 0.9-1 ise (+); 0.89-0.8 ise (++); 0.79-0.7 ise (+++) ve < 0.69 ise (+++++) olarak değerlendirildi^{18,19}.

Koagülaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu amaçla insan ve tavşan plazması kullanıldı. Suşlar SDA'ya pasajlanarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Steril tüplere 300 µl insan ve tavşan plazması konuldu. Üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak tüplerdeki plazma ile süspanse edilerek 37°C'de inkübe edildi. Pıhtılaşma varlığı 2, 4, 6 ve 24. saatlerde kontrol edildi. Pozitif kontrol olarak, koagülaz üreten standart *S.aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı ve deney her bir suş için 3 kez tekrar edildi^{20,21}.

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 15.0 versiyonu kullanılarak ki-kare testi ile değerlendirildi; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *Trichosporon* suşlarının SDA ve mısır unu Tween 80 agarda gözlenen koloni yapıları ve mikroskopik görünimleri Resim 1'de verilmiştir. *Trichosporon* suşları SDA'da buruşuk, zeminden kabarık, beyaz veya krem rengi koloniler oluşturmuş; mısır unu Tween 80 (MU-T80) agarda ise suşların psödohif ve hif oluşturduğu, değişik şekilli blastokonidyumlar ile kübik, uzun görünümlü artrokonidyalılar oluşturduğu gözlenmiştir (Resim 1).

Çalışmamızda, test edilen toplam 40 *Trichosporon* suşunda salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim üretimine rastlanmamıştır (Tablo I, Resim 2, 3). Buna karşın suşların 3'ü 1. gün, 18'i 2. gün, 12'si 3. gün ve 7'si 4. gün olmak üzere tümü pozitif esteraz aktivitesi göstermiştir (Resim 4).

Suşların hemolitik aktiviteleri değerlendirildiğinde; 3 suшта (2 *T.asahii*, 1 *T.japonicum*) hemolitik aktivite 0.71-0.75 (+++), 12 suшта (9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.asteroides*, 1 *T.mentevideense*) 0.83- 0.88 (++), 25 suшта ise negatif sonuç izlenmiştir (Tablo I, Resim 5).

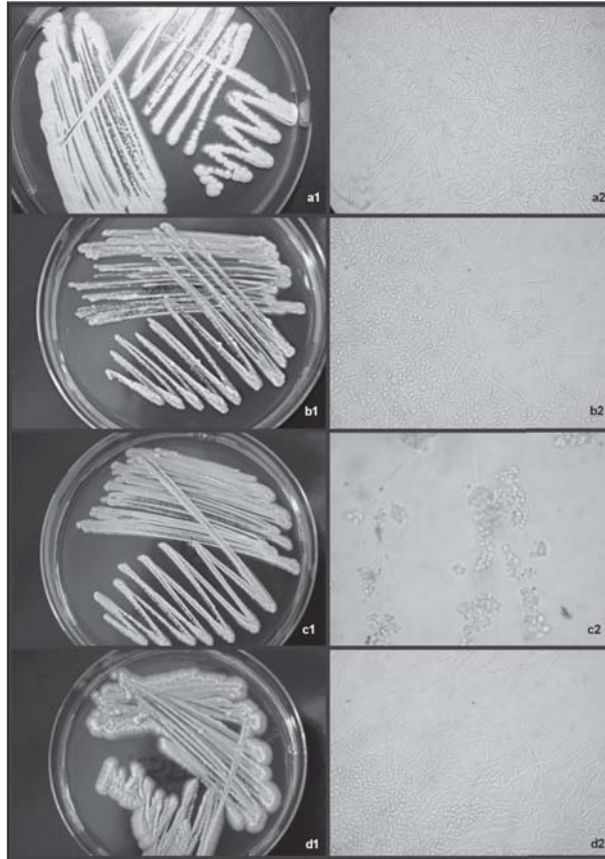
Çalışmaya alınan 40 *Trichosporon* suşunun 11 (9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.mentevideense*)'inde tavşan plazmasında koagülaz aktivitesi pozitif, 29'unda negatif bulunmuştur. İnsan plazması kullanıldığında ise, 2 (1 *T.asahii*, 1 *T.inkin*) suş koagülaz-pozitif sonuç vermiştir (Tablo I, Resim 6).

TARTIŞMA

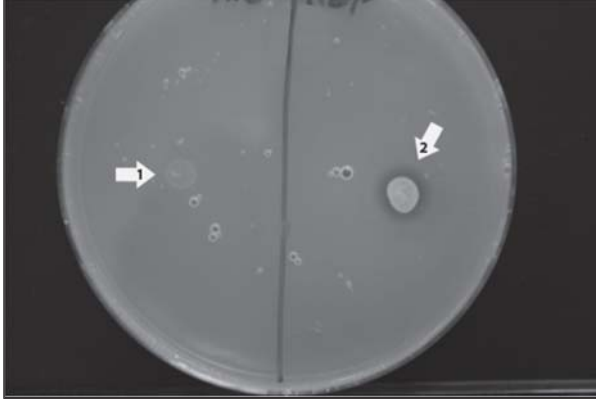
Duyarlı hasta gruplarında, özellikle de hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda, antifungal ilaçlara dirençli mantar enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkan *Trichosporon* türlerinde, tedavi güçlükleri nedeniyle mortalite oranı yüksek olarak görülmektedir⁵. Global antifungal surveyans çalışmasında (ARTEMİS), 8717 izolatın %32.9'u *Cryptococcus*, %11.7'si *Saccharomyces*, %10.6'sı *Trichosporon* ve %4.1'i *Rhodotorula* olarak tanımlanmış; kandida dışı mayalar içinde *Trichosporon* türlerinin üçüncü sırada yer aldığı vurgulanmıştır²². Girmenia ve arkadaşlarının²³ İtalya'da yaptıkları çok merkezli bir çalışmada, hematoloji kliniklerinde görülen 52 *Trichosporon-Geotrichum* enfeksiyonu arasında trikosporonoz olarak tanımlanan olgularda mortalite oranının %64.7 olduğu bildirilmiştir.

Tablo I. *Trichosporon* Suşlarında Saptanan Enzim Aktiviteleri (n= 40)

	Asit proteinaz	Fosfolipaz	Esteraz	Hemolitik aktivite	Koagülaz	
					İnsan plazması	Tavşan plazması
Pozitif sayı (%)	0	0	40 (100)	15 (37.5)	2 (5)	11 (27.5)
Negatif sayı (%)	40 (100)	40 (100)	0	25 (62.5)	38 (95)	29 (72.5)



Resim 1. *Trichosporon* suşlarının makroskobik ve mikroskobik görünüşleri (a1: *T. asahii* SDA koloni morfolojisi; a2: *T. asahii* MU-T80 agarda mikroskopik morfolojisi; b1: *T. dermatis* SDA koloni morfolojisi; b2: *T. dermatis* MU-T80 agarda mikroskopik morfolojisi; c1: *T. japonicum* SDA koloni morfolojisi; c2: *T. japonicum* MU-T80 agarda mikroskopik morfolojisi; d1: *T. mucoides* SDA koloni morfolojisi; d2: *T. mucoides* MU-T80 agarda mikroskopik morfolojisi).

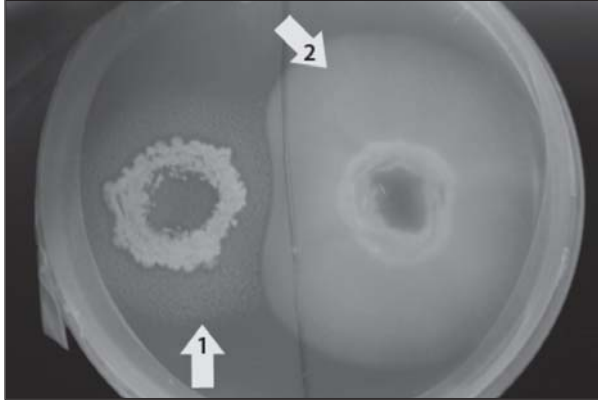


Resim 2. Salgısal asit proteinaz enzim aktivite testi (1 no'lu ok: Asit proteinaz negatif *Trichosporon* suşu; 2 no'lu ok: Asit proteinaz pozitif *Candida tropicalis* NRRLY 12968 suşu).

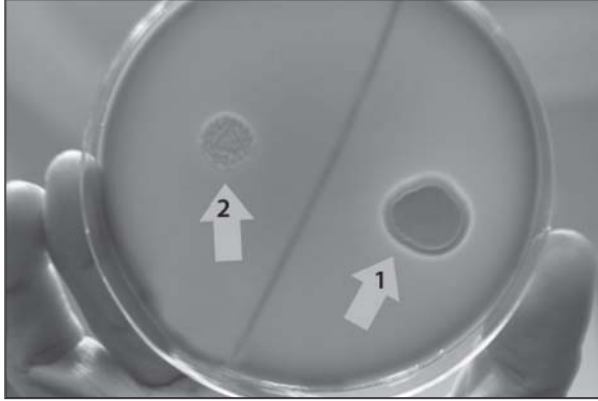


Resim 3. Fosfolipaz enzim aktivite testi (1 no'lu ok: Fosfolipaz negatif *Trichosporon* suşu; 2 no'lu ok: Fosfolipaz pozitif *Candida albicans* ATCC 10231).

Sunulan bu çalışmanın amacı, *Trichosporon* enfeksiyonlarının patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülen virülans faktörlerinden olan salgısal asit proteinaz, fosfolipaz ve esterase enzimleri, hemolitik aktivite ve pıhtılaşma faktörü olan koagülaz aktivitesinin araştırılmasıdır. Çalışmaya dahil edilen 20'si klinik izolat ve 20'si koleksiyon suşu olmak üzere toplam 40 *Trichosporon* spp. suşunun hiçbirisinde salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktiviteleri tespit edilmemiştir (Tablo I). Benzer olarak, Ichikawa ve arkadaşlarının⁹ 61; Sun ve arkadaşlarının¹¹ 23; Dağ ve arkadaşlarının¹⁰ ise 48 *T. asahii* suşu ile yaptıkları çalışmalarda, suşların hiçbirinde salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitesi saptanmamış ve bu sonuçlar çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. Buna karşın Gülenç ve arkadaşları²⁴, klinik örneklerden izole edilen ve *T. cutaneum* olarak tanımlanan iki suşta proteinaz aktivitesini; Melville ve arkadaşları²⁵ da 11 *Trichosporon* suşunun sekizinde proteinaz, yedisinde ise fosfolipaz aktivitesini pozitif olarak bildirmişlerdir. Junqueira ve



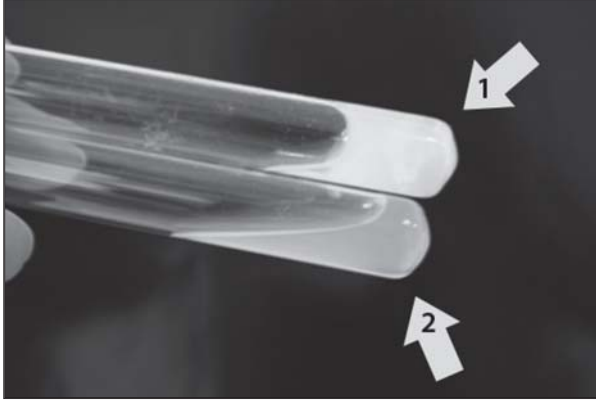
Resim 4. Esteraz enzim aktivite testi (1 no'lu ok: Esteraz pozitif *Trichosporon* suşu; 2 no'lu ok: Esteraz negatif *C. glabrata* ATCC 90030).



Resim 5. Hemolitik enzim aktivite testi (1 no'lu ok: *Trichosporon* suşunda pozitif hemolitik enzim aktivitesi; 2 no'lu ok: *Trichosporon* suşunda negatif hemolitik enzim aktivitesi).

arkadaşları²⁶, HIV pozitif hastalarda oral maya kolonizasyonunu araştırdıkları çalışmada, 33 hastanın tükürük örneğinde *Candida* spp. ile birlikte izole edilen iki *T. mukoides* suşu rapor etmişler ve bunlarda fosfolipaz aktivitesinin kuvvetli pozitif olduğunu ancak prote-inaz aktivitesinin bulunmadığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda değerlendirilen diğer virülans faktörü olan esteraz aktivitesi, 40 *Trichosporon* suşunun hepsinde pozitif olarak bulunmuştur (Tablo I). Dağ ve arkadaşları-nın¹⁰ 48 *T. asahii* suşu ile yaptıkları çalışmada, tüm suşlarda esteraz enzim aktivitesi gösterilmiş olup bu sonuç çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. İnsan derisinin stratum korneum tabakasında, esteraz enziminin substratları olan monoasilgliserol ve triasilgliserol gibi moleküllerin yüksek oranda bulunması, bu enzimin trikosporonoz patogeneğinde rol alabileceğini düşündürmektedir²⁷.



Resim 6. Koagülaz enzim aktivite testi (1 no'lu ok: Koagülaz pozitif *Trichosporon* suşu; 2 no'lu ok: Koagülaz negatif *Trichosporon* suşu).

Çalışmamızda, test edilen *Trichosporon* suşlarının %37.5 (15/40)'inde hemolitik aktivite varlığı saptanmıştır (Tablo I). Hemolitik aktivite pozitifliği; 11 *T.asahii* ve birer *T.inkin*, *T.asteroides*, *T.japonicum*, *T.mentevideense* türünde tespit edilmiş, *T.asahii* ile *asahii*-dışı *Trichosporon* türleri arasında hemolitik aktivite varlığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Sun ve arkadaşlarının¹¹ 23 *T.asahii* suşu ile yaptıkları çalışmada da değişen derecelerde hemolitik aktivite varlığı gösterilmiş olup bu sonuç çalışmamızla uyumlu bulunmuştur.

Çalışmaya alınan suşların koagülaz enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, tavşan plazması ile %27.5 (11/40; 9 *T.asahii*, 1 *T.inkin*, 1 *T.montevideense*), insan plazması ile %5 (2/40; 1 *T.asahii*, 1 *T.inkin*) oranında pozitiflik bulunmuştur. *T.asahii* ile *asahii*-dışı *Trichosporon* türleri arasında koagülaz enzim aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Fisher's Exact Test $p > 1$). Yapılan literatür taramasında, ulaşılabildiği kadarıyla, *Trichosporon* türlerinin koagülaz enzim aktivitesine yönelik bir yayına rastlanmamış, bu nedenle sonuçlarımızın karşılaştırılması mümkün olmamıştır. Ancak, klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* ve *albicans*-dışı *Candida* türleri ile yapılan diğer çalışmalarda, koagülaz enzim aktivitesinin değerlendirilmesi için tavşan plazmasının kullanılması daha uygun olduğu belirtilmektedir^{20,21}. Bizim çalışmamızda da, *Trichosporon* türleri için uygulanacak koagülaz testinin tavşan plazması ile yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, *Trichosporon* spp. suşlarında araştırılan virülans faktörlerinden salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitesi hiçbir suшта saptanmamış; esteraz aktivitesi (%100) tüm suşlarda pozitif olarak bulunmuş; hemolitik aktivite (%37.5) ile koagülaz enzim aktivitesi (%27.5) ise değişen düzeylerde tespit edilmiştir. Bu faktörlerin, *Trichosporon* enfeksiyonlarının patogeneziindeki rolü ve/veya önemi ile ilgili net verilerin elde edilmesi için geniş kapsamlı klinik ve mikolojik çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

1. Uzun Ö. İnvaziv fungal infeksiyonların değişen epidemiyolojisi, s: 23-33. Akova M, Akan H (ed), İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda İnvaziv Fungal İnfeksiyonlar. 2006, 1. Baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
2. Ener B. Nadir görülen fırsatçı mikozlar, s: 1105-9. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, Güneş Kitabevi, Ankara.
3. Kalkanci A, Sugita T, Arian S. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Med Mycol* 2010; 48(1): 141-6.
4. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(4): 682-700.
5. Gülşen H. *Trichosporon asahii* ve enfeksiyonlarına genel bakış. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 707-15.
6. Hilmioğlu S. Derinin yüzeysel mantar infeksiyonları, s: 1025-30. Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, Güneş Kitabevi, Ankara.
7. Yıldız O. Önemi artan bir infeksiyon etkeni: *Trichosporon*. *İnfeksiyon Derg* 2007; 21(Ek): 133-40.
8. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virulans faktörleri. *ANKEM Derg* 2012; 26(Ek 2): 261-9.
9. Ichikawa T, Sugita T, Wang L, et al. Phenotypic switching and beta-N-acetyl-hexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. *Microbiol Immunol* 2004; 48(4): 237-42.
10. Dağ A, Çerikçioğlu N. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *Trichosporon asahii* suşlarında bazı virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(3): 225-35.
11. Sun W, Su J, Xu S, et al. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol* 2012; 61(12): 1750-7.
12. Yücesoy M, Karaman M. Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2001; 35(3): 443-50.
13. Uğur A, Fındık G. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (Proteinaz, Slime ve Fosfolipaz) in-vitro araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17(4): 471-81.
14. Pekintürk N, Değerli K, Özkütük T ve ark. *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, esteraz ve slime aktivitelerinin enfeksiyon-kolonizasyon ayrımındaki rolleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32(1): 171-6.
15. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans* kökenlerinde bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg* 2001; 15(4): 517-25.
16. Keçeli S, Budak F. *Candida* türlerinde esteraz aktivitesi. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(1-2): 99-103.
17. Akyol V, Çerikçioğlu N. *Candida parapsilosis* klinik izolatlarının morfoliplendirmesi, genotiplendirmesi ve farklı morfoliplerde bazı virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(4): 605-17.
18. Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoğlu E. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, proteinaz ve hemolitik aktiviteleri. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(1): 71-7.
19. Ekşi F, Sözen E, Bayram A ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında slime üretimi ve hemolitik aktivitenin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008; 38(1): 27-32.
20. Yiğit N, Aktaş E, Ayyıldız A. Detection of coagulase activity in pathogenic *Candida* species. *J Int Med Res* 2008; 36(6): 1378-82.
21. Yiğit N, Aktaş E, Dagistan S, Ayyıldız A. Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. *EJIM* 2011; 43(1): 27-32.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2009; 47(1): 117-23.

23. Walsh TJ, Lee JW, Melcher GP, et al. Experimental *Trichosporon* infection in persistently granulocytopenic rabbits: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of an emerging opportunistic mycosis. *J Infect Dis* 1992; 166(1): 121-33.
24. Abacı Ö, Haliki A. *Candida albicans*'ın virulans faktörleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji* 2004; 2(9): 1-8.
25. Melville P, Benites N. Proteinase and phospholipase activities and development at different temperatures of yeasts isolated from bovine milk. *J Dairy Res* 2011; 7(8): 385-90.
26. Junqueira J, Vilela S, Rossoni RD, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(1): 17-24.
27. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun* 1996; 64(8): 2936-40.