



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP-MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GENOTİP 1 VE 3 TRICHOSPORON ASAHII KÖKENLERİNDE VİRÜLANS  
FAKTÖRLERİNİN VE ANTİFUNGAL AJANLARA DUYARLILIĞIN  
ARAŞTIRILMASI**

**Uzm.Dr.Canan EVCİ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2015**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP-MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GENOTİP 1 VE 3 TRICHOSPORON ASAHII KÖKENLERİNDE  
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE ANTİFUNGAL AJANLARA DUYARLILIĞIN  
ARAŞTIRILMASI

Uzm.Dr.Canan EVCİ

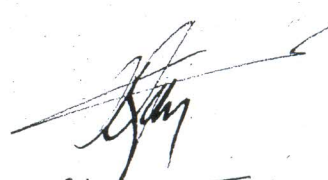
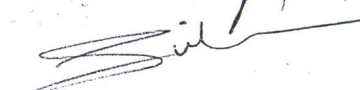
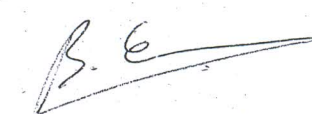

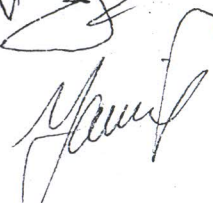
(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Cüneyt ÖZAKIN

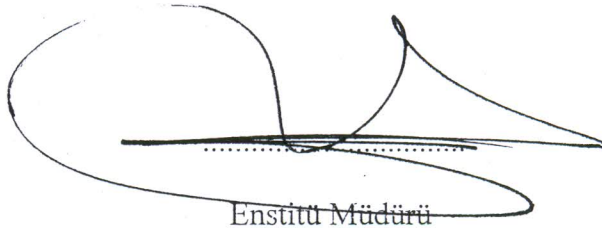
Bursa-2015

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE,

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Canan EVCİ tarafından hazırlanan "Genotip 1 ve 3 *Trichosporon asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığın araştırılması" konulu Doktora tezi 28/01/2015 günü, 14:00-16:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Cüneyt ÖZAKIN	
Üye	Prof. Dr. Güher GÖRAL	
Üye	Prof. Dr. Beyza ENER	
Üye	Prof. Dr. Ünal EGELİ	
Üye	Doç. Dr. Yasemin ÖZ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03.02.2015 tarih, 2015/05 sayılı toplantısında alınan 06 numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET .....	II
İNGİLİZCE ÖZET .....	III
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2. Risk faktörleri .....	5
2.3. <i>Trichosporon</i> türlerinin oluşturdukları klinik tablolar .....	5
2.4. <i>Trichosporon</i> türlerinin genel mikrobiyolojik özellikleri .....	7
2.5. <i>Trichosporon</i> türlerinin identifikasyonunda moleküler yöntemler .....	9
2.6. <i>Trichosporon</i> türlerinin taksonomik özellikleri .....	10
2.7. Fungal enfeksiyonlarda patogenez.....	11
2.8. Virülans faktörleri .....	14
2.9. Sistemik etkili antifungal ajanlar .....	20
2.10. Antifungal duyarlılık testleri.....	23
2.11. Trikosporozda tedavi .....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	29
3.1. <i>Trichosporon</i> kökenleri ve identifikasyonu .....	29
3.2. Kökenlerin virülans özelliklerinin belirlenmesi .....	29
3.3. <i>In vitro</i> antifungal duyarlılık testleri.....	32
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
6. EKLER.....	47
7. KAYNAKLAR .....	51
8. TEŞEKKÜR.....	62
9. ÖZGEÇMİŞ .....	63

## ÖZET

Bu çalışmada *Trichosporon asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığın araştırılması amaçlandı.

İdrar, kan ve plevra sıvısı örneklerinden izole edilen 21 *Trichosporon asahii* kökeninin asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz enzim aktiviteleri, epitel hücrelerine adezyonu, hücre yüzey hidrofobisitesi ve slime üretimi araştırıldı. Çalışmaya alınan 21 kökenin hiçbirinde asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesi saptanmaz iken tüm kökenlerde esteraz aktivitesi pozitif bulundu. Yüzey hidrofobisitesi, mikroküre yöntemi ile %76 ile %100 arasında bulundu. Epitel hücrelerine %51 ile %287 arasında bağlanarak adeziv özellik gösterdikleri saptandı. Slime üretimini belirlemek için modifiye tüp testi yapıldı. Kökenlerin %52.4'ünde orta, %28.6'sında zayıf, %19'unda kuvvetli slime üretimi saptandı.

Amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofunginin, 21 *T asahii* izolatına karşı *in vitro* aktivitesi, CLSI M27-A2 referans mikrodilüsyon yöntemi ve E test yöntemi ile belirlendi. İzolatların tümünün amfoterisin B MİK değerleri  $\geq 2.0$   $\mu\text{g/mL}$  idi. İtrakonazol ve özellikle de vorikonazol, tüm izolatlara *in vitro* olarak en etkili ilaç bulundu. Ekinokandin olan kaspofungin, *T asahii* kökenlerine karşı aktivite göstermedi.

*T asahii*'nin virülans faktörleri ve antifungal ajanlara duyarlılıkları hakkında literatürdeki veriler henüz yetersiz olduğundan, bu sonuçların literatürdeki mevcut verilere katkı sağlayabileceği düşünüldü.

**Anahtar sözcükler:** *Trichosporon asahii*, virülans faktörleri, antifungal duyarlılık, mikrodilüsyon, Etest

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES OF GENOTYPE 1 AND 3 *TRICHOPORON ASAHII* STRAINS

In this study, we aimed to investigate the virulence factors and susceptibility to antifungal agents of *Trichosporon asahii* strains.

Acid proteinase, phospholipase, esterase enzyme activities, epithelial adhesion, cell surface hydrophobicity and slime production of a total of 21 *Trichosporon asahii* strains from urine, blood and pleura fluid were investigated. In this study, in none of the 21 strains acid proteinase and phospholipase activities could be detected, while all were found to be esterase positive. Cell surface hydrophobicity were found between 76% and 100% by using microspheres assay. Adhesive properties by the binding to epithelial cells were between 51%-287%. Establishing the production of slime, modified tube assay was performed. 52.4% of strains were found to be moderate producers (++), 28.6% of strains were weakly positive (+) and 19% of strains were defined as strongly positive producers.

*In vitro* activities of amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungine against 21 isolates of *T asahii* were determined by the CLSI M27-A2 reference microdilution method and Etest method. All isolates exhibited amphotericin B MICs  $\geq 2.0$   $\mu\text{g/mL}$ . Itraconazole and voriconazole were the most potent agents *in vitro* against all isolates, particularly voriconazole. The echinocandin, caspofungin, demonstrated no activity against *T asahii*.

Since the current data on virulence factors and antifungal susceptibilities of *T asahii* is insufficient already, these results may contribute to the present data in the literature.

**Key words:** *Trichosporon asahii*, virulence factors, antifungal susceptibility, microdilution, Etest

## 1. GİRİŞ

Funguslar doğada yaygın olarak bulunurlar. İmmünsüprese konakta genellikle hızlı ilerleyen, çeşitli organ ve sistemleri tutan invaziv seyirli enfeksiyonlara yol açma potansiyeli gösterirler. Son yirmi yıl içinde kanser, immün yetmezlik, kollajen doku hastalıklarında, organ nakli olanlarda, genel durumu kötü hastalarda yaşam sürelerinin uzaması, invaziv girişimlerin artması, geniş spektrumlu çoklu antibiyotik kullanımının, steroid kullanımının artması gibi nedenlerden ötürü immünsüprese hasta sayısının artmasına paralel olarak; fungal etkenlerin neden olduğu enfeksiyonların oluşturdukları mortalite ve morbidite de giderek artmaktadır (1, 2).

Nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan etkenlerin yaklaşık %10'unu oluşturan funguslar içinde en sık izole edilen etkenler *Candida* ve *Aspergillus* türleridir (3). Son 20 yıl içinde özellikle hematolojik malignitesi olan nütropenik hastalarda, antifungal ajanlara karşı direnç gösteren ve nadiren enfeksiyon oluşturan diğer mantar etkenleri artan sıklıkla izole edilmeye başlanmıştır (4-6). *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* gibi sık görülen fırsatçı etkenlerin haricinde “nadir görülen ancak önemi giderek artan fungal etkenler” olarak tanımlanan mikroorganizmalarla oluşan ciddi, yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar daha sık görülmeye başlamıştır (6, 7). Klinisyenlerin ve mikrobiyoloji uzmanlarının gözden kaçırmaması gereken husus; bağışıklık sistemi baskılanmış bir konak için herhangi bir fungusun, öldürücü bir enfeksiyon etkeni olabileceği ve bu etkenin laboratuvarında izole edildiğinde kontaminan olarak düşünülmemesi gerektiğidir. Fungal bir etkenle oluşan ciddi bir enfeksiyonun tanısı, klinik şüphe ile birlikte kültür ve histopatolojik inceleme için uygun materyalin alınmasına bağlıdır. Etkenin kültürde izolasyonu ve identifikasyonu tanıda oldukça önemlidir. Bazı fungal etkenler standart antifungal ajanlara dirençli olduğundan alternatif antifungal ilaç kullanımını ya da ek bir cerrahi girişimi de gerektirebilir (7).

*Trichosporon* türleri nadir görülen ancak sıklığı giderek artan fungal etkenler arasında yer almaktadır. *Trichosporon* türleri doğada (toprak, su, bitkiler) yaygın olarak bulunurlar. İnsanda deri, solunum yolları, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde flora üyesi olarak yer alabilirler (8). Kutanoz enfeksiyonlara yol açabildikleri gibi özellikle

hematolojik malignite, Edinsel Bağışıklık Yetmezlik Sendromu (AIDS), yanık, solid tümörlü olgularda, sistemik, lokalize ya da dissemine enfeksiyona neden olabilmektedirler. İmmünsüprese olmayan konakta da nadiren enfeksiyon oluşturabilirler. Göz cerrahisi sonrası, protezi bulunan, intravenöz ilaç kullanan ya da periton diyalizi olan hastalarda olgu sunumları tarzında bu tip enfeksiyonlar nadir de olsa bildirilmektedir (9).

*Trichosporon* türü funguslar enfeksiyon etkeni olarak seyrek görülmele birlikte; antifungal tedaviye nispeten dirençli etkenlerdir (8). Konakta prognozu kötü, mortalitesi yüksek (%80) enfeksiyonlar oluştururlar. Etkenin hızlı ve doğru identifikasyonu, tedavi başarısında ciddi rol oynamaktadır (10).

*Trichosporon* genusunda yer alan türlerden insanda hastalık etkeni olarak *T asahii* ve *T mucoides* sistemik enfeksiyonlara, *T cutaneum* ve *T asteroides* yüzeysel enfeksiyonlara, *T ovoides* ve *T inkin* saçlı deri ve genital bölgede ak piedraya neden olabilmektedir. Buna ek olarak *Trichosporon* türlerinin yaz tipi aşırı duyarlılık (summer type hipersensitivity) pnömonisine neden oldukları da gösterilmiştir (11-12).

Son yıllarda artan izolasyon sıklıkları nedeniyle *Trichosporon* türlerinde virülans faktörleri ve antifungal duyarlılık üzerine yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

*Candida* türlerinde adezyon (mukoza epitel hücrelerine yapışma), dimorfizm (hif üreterek fagositoza direnç gösterme), toksin ve enzim (proteinazlar, fosfolipazlar ve lizofosfolipazlar) üretimi gibi bazı virülans faktörlerinin patogeneizde rol oynadığına ilişkin çalışmalar mevcuttur (13). Ancak çok daha nadir olarak görülen; özellikle immünsüprese konakta mortalitesi yüksek enfeksiyonlara yol açan *Trichosporon* kökenleri için bu konuda çok sınırlı sayıda yayın vardır (14).

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'ın (eski adıyla National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS), M27-A3 dökümanında (15), *Candida* ve *Cryptococcus* türlerinde *in vitro* mikrodilüsyon antifungal duyarlılık yöntemleri ve duyarlılık sınırlarına (breakpoint değerleri) ilişkin detaylı bilgi olmasına rağmen *Trichosporon* kökenleri ile ilgili bir standardizasyon yer almamaktadır.



Bu alışmada *Trichosporon asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığın araştırılması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Trichosporon* kelimesi, Yunanca saç anlamına gelen “*Trichos*” ve spor anlamına gelen “*sporon*” kelimesinin birleşiminden türemiştir. İlk *Trichosporon* klinik izolatu, 1867 yılında ak piedra nodüllerinden yapılan kültürde izole edilmiştir. Behrend 1890 yılında etkeni detaylıca tanımlayarak *Trichosporon ovoides* olarak adlandırmış ve insanlarda yüzeysel mikoz etkeni fungal izolatları gruplandırmıştır. Bundan sonra da diğer *Trichosporon* türleri rapor edilmeye başlanmıştır. Vuillemin 1902 yılında tüm *Trichosporon* türlerini artrosporlu maya anlamında *Trichosporon beigeli* olarak tanımlamıştır. Beurmann 1909 yılında bir cilt lezyonundan aldığı örnekten kültür yaparak etkene *Oidium cutaneum* adını vermiştir. Ota tarafından 1926 yılında aynı etken *Trichosporon cutaneum* olarak yeniden adlandırılmıştır. Diddens ve Lodder 1942 yılında *T beigeli* ve *T cutaneum*'un aynı tür olduğunu belirtmişlerdir. *T beigeli* yıllarca çevresel ve saprofitik bir fungus olarak ve ak piedra'nın etkeni olarak bilinmiştir. *Trichosporon* türleri ile oluşan sistemik enfeksiyon ise ilk olarak 1970 yılında serebral abseli bir hastada tanımlanmış ve *T cutaneum* üremesi olarak raporlanmıştır (8).

### 2. 1. Epidemiyoloji

*Trichosporon* türleri *Candida* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlara benzer şekilde yaşamı tehdit eden fungemi ve dissemine enfeksiyonlara yol açabilmektedir (16). ARTEMIS Global Antifungal Sürveyans Programı verilerine göre, klinik örneklerden izole edilen non *Candida* mayalar içinde *Trichosporon* türleri en sık izole edilen etkenler arasında %10.7 sıklıkla 3. sırada yer almaktadır (17). Hematolojik malignitesi olan hastalarda mayalarla gelişen fungemilerde, *Candida* türlerinden sonra en sık rastlanan etken *Trichosporon* türleridir. Amfoterisin B ve ekinokandinlere dirençli olmaları ve kötü prognoza sahip olmaları karakterize özellikleridir. İnvaziv fungal enfeksiyonlara yol açan başlıca *Trichosporon* türleri daha önceleri *T beigeli* olarak tanımlanan *T asahii*, *T asteroides*, *T cutaneum*, *T inkin*, *T mucoides*, *T ovoides*'dir (18). *Trichosporon* türleri (*T asteroides*, *T cutaneum*, *T inkin*, *T ovoides*) invaziv enfeksiyonlar dışında, ak piedra olarak adlandırılan yüzeysel enfeksiyonların; *T asahii*, *T dermatidis* türleri ise Japonya'da yaygın

olarak görülen yaz tipi aşırı duyarlılık pnömonisinin etkeni olarak da gösterilmişlerdir (6, 8).

## 2.2. Risk Faktörleri

*Trichosporon* türleri solid organ ve hematolojik kök hücre transplant alıcılarının yanı sıra; en sık lösemi olmak üzere immünkompromize hastalarda fatal enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. Risk faktörlerinden en sık görülenleri aşağıda sıralanmıştır (6, 18);

1. Nötropeni
2. Kortikosteroid kullanımı
3. İmmünsüpresyon
4. Cerrahinin neden olduğu mukoza bütünlüğünde bozulma
5. Vasküler kateter takılması
6. Mukozit ve enterite yol açan sitotoksik kemoterapi
7. İleri derecede yanık
8. Edinsel immün yetmezlik sendromu
9. Kalp damar cerrahisi

Hematolojik maligniteli hastalarda invaziv trikosporoz ve geotrikoz konusunda en geniş, çok merkezli çalışma Girmene ve ark. (19) tarafından yapılmıştır. *Trichosporon* ve *Geotrichum* enfeksiyonlarına ait yirmi yıllık bir süreyi kapsayan dönemdeki veriler incelendiğinde; dünyada 287 trikosporoz ve 99 geotrikoz olgusu ile ilgili verilere ulaşılmıştır. Trikosporoz ile ilişkili görülen altta yatan koşullardan en sık görülenlerinin, hematolojik hastalık varlığı, periton diyalizi olmak ve solid tümör varlığı olduğu saptanmıştır (19).

## 2.3. *Trichosporon* Türlerinin Oluşturdukları Klinik Tablolar

*Trichosporon* türleri toprakta, suda, insan cilt ve gastrointestinal sistem normal florasında bulunabilir. Yüzeysel, subkutan ya da sistemik enfeksiyonlar oluşturabilirler.

### Yüzeysel Enfeksiyonlar

**1-Ak piedra:** *Trichosporon* türleri tarafından oluşturulan benign yüzeysel lezyonlardır. Etkilenen saçlı deride beyaz ya da parlak kahverengi nodüller şeklinde görülür. Sakal,

bıyık, koltuk altı ve genital bölgede de enfeksiyon oluşturabilirler. *T asteroides* ve *T cutaneum*, yüzeysel cilt enfeksiyonlarına neden olurlar. Pubik bölgede *T inkin*, saçta ise *T ovoides* genellikle etkendirler (7, 8).

**2-Onikomikoz:** En sık izole edilen onikomikoz etkeni *Trichosporon*, *T cutaneum*'dur (8).

**3-Tinea pedis:** *T loubieri*'nin de insanlarda yüzeysel enfeksiyonlarla ilişkili olduğu son zamanlarda rapor edilmiştir (8).

**4-Diğer lokal enfeksiyonlar:** Göz cerrahisi sonrası, protezi bulunan, intravenöz ilaç kullanımı olan ya da periton diyalizi alan hastalarda olgu sunumları tarzında enfeksiyonlar nadir de olsa bildirilmiştir (9).

### **Alerjik Hastalıklar**

*T asahii* ve *T dermatitis*, Japonya'da yaz tipi aşırı duyarlılık pnömonisinin etkeni olarak rapor edilmektedir. *Trichosporon* türleri Batı ve Güney Japonya'da çok sıcak, yağışlı ve nemli yaz sezonunda, artrokonidyalardan tekrarlayan inhalasyonu ile Tip III ve Tip IV alerji ile yaz tipi aşırı duyarlılık pnömonisine yol açmaktadırlar. Başlangıçta oluşan immünkompleks aracılı akciğer hasarını hücre sel doku hasarı izlemektedir (8).

### **İnvaziv Enfeksiyonlar**

*Trichosporon* türleri ile invaziv enfeksiyonlar, respiratuvar ve gastrointestinal sistem kolonizasyonu sonrasında ve sıklıkla da santral venöz kateterlerin kullanımı sonrasında gelişmektedir (8). Kateterle ilişkili ya da kateterle ilişkili olmaksızın gelişen bu fungemiler, genellikle nütropenik hastalarda görülmektedir. Yaygın hematojen yayılım, pozitif kan kültürleri ve çok sayıda cilt lezyonları ile belirgin hale gelebilmektedir (7). Hepatik kandidoza benzer bir tablo olan kronik hepatik trikosporoz, nütropenin düzeldiği dönemde ortaya çıkabilmektedir. Ekinokandin grubu antifungal ilaç ile tedavi altında iken gelişen invaziv *Trichosporon* enfeksiyonları da (breakthrough enfeksiyon) bildirilmiştir (18). Trikosporoz çoğunlukla kanser, diyabet, nütropeni gibi altta yatan immünsüpresyon durumunda gelişmektedir. Ancak Rastogi ve ark. (20) tarafından immünsüprese olmayan bir konakta gelişen *T asahii*'nin etken olduğu bir meningoensefalit ve pnömoni olgusu bildirilmiştir.

Yaygın trikosporozda hematolojik yayılım sonucu aşağıdaki klinik tablolara ilişkin bulgular oluşabilmektedir (6);

1. Renal yetmezlik
2. Pulmoner infiltratlar
3. Multiple kutanöz lezyonlar
4. Koriyoretinit
5. Septik şok
6. Kronik hepatik trikosporoz

#### **2.4. *Trichosporon* Türlerinin Genel Mikrobiyolojik Özellikleri**

*Trichosporon* türleri standart mikolojik besiyerlerinde kolayca üreyebilirler (21). Geniş bir sıcaklık aralığında (25-40°C) üreme yeteneğine sahip olup ortalama üreme sıcaklıkları 30°C'dir (14). *Trichosporon* türlerinin bilinen seksüel üreme evreleri yoktur (21). Katı besiyerinde 30°C'de, 48-72 saatte; makroskopik olarak düzgünden buruşuğa kadar değişebilen; krem renginde, yumuşak kıvamlı ve parlak koloniler oluştururlar (14).

*Trichosporon* basidiomycetous bir maya genusudur. Mikroskopik olarak *Trichosporon* türleri hiyalen septalı hifler ve yalancı hifler, bu hifler boyunca oluşmuş oval veya köşeli 2-4 x 3-9 µm boyutunda artrosporlar veya blastosporlar şeklinde görülürler (14, 22). Hifler ile birlikte blastosporların varlığı, *Trichosporon* türlerini *Geotrichum* türlerinden farklı kılar. Az sayıda blastospor oluşturmaları halinde *Geotrichum* kökenlerinden mikroskopik olarak ayırt edilmeleri güç olabilir. Bu durumda, Malt extract broth besiyerinde, oda sıcaklığında, 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında artan blastospor üretimi ile ayırt etmek kolaylaşır (21). Diğer bir ayırıcı nokta da üreaz aktiviteleridir (22).

*Trichosporon* türleri karbonhidratları fermente etmezler, üreaz pozitifler (21). Farklı karbonhidratları asimile edebilirler (8).

#### **Karbonhidrat Asimilasyon Testleri**

Karbonhidrat asimilasyon testleri, mantarların oksijen varlığında spesifik bir karbonhidratı tek karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını saptayan testlerdir. *Trichosporon* türleri çeşitli kompleks şekerleri asimile edebilirler (Tablo-1).

**Tablo-1: Klinik Olarak Önemli *Trichosporon* Türlerinin Özellikleri (21)**

Özellik		<i>T asahii</i>	<i>T asteroides</i>	<i>T cutaneum</i>	<i>T inkin</i>	<i>T loubieri</i>	<i>T mucoides</i>	<i>T mycotoxinivorans</i>	<i>T ovoides</i>
Şeker Asimilasyonu	Melibiose	-	-	+	-	+	+	+	-
	Raffinose	-	-	+	-	+	+	+	V
	L-Rhamnose	+	-	+	-	V	+	+	+
	L-Arabinitol	+	+	+	-	V	+	W	-
	Galactitol	-	-	-	-	-	+	+	-
	Ribitol	V	V	+	-	?	+	?	-
	Sorbitol	-	V	+	-	V	+	+	-
	Xylitol	V	+	+	-	V	+	W	V
Diğer Özellikler	37°C'de üreme	+	V	-	+	+	+	+	+
	42°C'de üreme	-	-	-	V	+	-	-	-
	Urease	+	+	+	+	+	+	+	+
	% 0.01 cycloheximide	+	V	-	V	+	+	+	+
	% 0.1 cycloheximide	-	V	-	-	+	+	+	-
	Appressoria (Lam kültüründe)	-	-	-	+	-	-	-	+
	Fusiform dev hücreler	-	-	-	-	+	-	+	-

Ticari olarak mevcut biyokimyasal ve enzimatik panellerden API ID32C (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) ve VITEK ID-YST (bioMerieux, Vitek, Hazelwood), maya mantarlarının identifikasyonunda kullanılmaktadır. API ID32C kiti daha geniş bir veri tabanına sahiptir ve 69 türü tanımlamaktadır. Ancak 69 türden 11'inde tür doğrulaması için ek testleri gerektirmektedir. VITEK sistemi ise 15 saatlik inkübasyon süresi ön gördüğünden 48-72 saat inkübasyon gerektiren API ID32C sisteminden daha avantajlı olarak gözükmemektedir. Bu ticari kitlerin avantajı ile dezavantajları hakkında sınırlı sayıda veri mevcuttur ve bu kitlerin kullanımı ile oluşan yanlış identifikasyonlar da rapor edilmiştir (23).

API 20C AUX sistemi, mantarların identifikasyonu için karbonhidrat asimilasyonu yöntemini esas alan ticari bir kittir. Bu sistemle *T asahii* ve *T inkin* kolayca identifiye

edilebilir. Ancak diğer türlerin API 20C AUX sistemi ile identifikasyonu güçtür ve çeşitli sıcaklıklarda üreme gibi diğer yöntemlerle desteklenmesi gerekir. Örneğin genellikle yüzeysel enfeksiyonlara yol açan *T cutaneum*, 35°C'de üreyemez; *T loubieri* ise 42°C'de kolayca üreyebilir (22).

### **İdentifikasyonda Kullanılan Diğer Testler**

Üreaz, fenol oksidaz, nitrat asimilasyon testleri, mantarların cins ve tür düzeyinde identifikasyonunu sağlayan diğer testlerdir (22).

Dissemine *Trichosporon* enfeksiyonlarında, *Cryptococcus neoformans*'ın kapsül antijeni ile benzer antijenik yapıya sahip olduklarından, kriptokok lateks testi pozitif bulunabilir (24).

Pek çok fungusun hücre duvarında (1,3)- $\beta$ -D-glukan yer almaktadır. *Candida* enfeksiyonlarının yanı sıra *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Saccharomyces* ve *Acremonium* enfeksiyonu varlığında da (1,3)- $\beta$ -D-glukan testi pozitifliği görülebilmektedir. Ancak *Cryptococcus* ve *Zygomycetes* enfeksiyonlarında pozitiflik saptanmamaktadır (18).

### **2.5. *Trichosporon* Türlerinin İdentifikasyonunda Moleküler Yöntemler**

*Trichosporon* türlerinin konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunda, genellikle hücre ve koloni morfolojisi ile biyokimyasal özellikleri temel alınır; güç ve zaman alıcı olup tecrübe gerektirir. Her zaman kesin bir netice de vermeyebilir (22, 23). DNA'yı temel alan moleküler yöntemler ise *Trichosporon* türlerinin identifikasyonu ve tanımlanmasında alternatif ve daha faydalı yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır (9, 23). Sekans analizini temel alan moleküler yöntemler, fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerin çoğuna alternatif olarak; hızlı, daha etkili ve doğru sonuçlar vermektedir (22). Spesifik nükleotid sekanslarının değerlendirilmesi, taksonomik problemlerin çözümünde kesin bir yöntem olabilir. Ancak rutin laboratuvarlar için maliyeti hala oldukça yüksektir (8).

Ribozomal RNA (rRNA)'nın Internal transcribed spacer 1 ve 2 (ITS1 ve ITS2) bölgelerinin sekans analizi, mantarların tür düzeyinde identifikasyonunda etkin bir şekilde kullanılmıştır (22, 23)

Sugita ve ark. (25), 26S ve 5S rRNA genleri arasında lokalize olan intergenic spacer (IGS) bölgesi farklılıklarının, ITS bölgesi farklılıklarından daha belirgin olduğunu göstermişlerdir (Şekil-1). *Trichosporon* genusundaki yakın türlerin ayrılmasında IGS sekans analizinin, ITS sekans analizinden daha üstün olduğu bildirilmiştir (26).

Ancak DNA sekans analizi, daha kesin sonuçlar vermesine rağmen birçok laboratuvar için ulaşılabilir bir teknik değildir. Böylece *Trichosporon* kökenlerinin tür düzeyinde identifikasyonunda, rutin kullanım için daha pratik bir yaklaşıma ihtiyaç vardır (22).

## 2.6. *Trichosporon* Türlerinin Taksonomik Özellikleri

*Trichosporon* türleri septal porların ultra yapısal analizi, guanin- sitozin içeriği, DNA reassociation değerleri, nütrisyonel profil, rRNA'nın 26 S bölge sekansları gibi yeni taksonomik kriterlere dayanılarak tekrar sınıflandırılmıştır (6). *T beigelii* taksonu yerine *T cutaneum*, *T asahii*, *T asteroides*, *T mucoides*, *T inkin*, *T ovoides* olmak üzere 6 insan patojeni tanımlanmıştır. Sugita ve ark. Tarafından (27), rRNA'nın ITS1 ve 2 gen bölgelerinin sekans analizi yapılmış; *Trichosporon* genusu 17 tür ve 5 varyete'den oluşacak şekilde sınıflandırılmıştır. rRNA'nın 26S ve 5S genleri arasında lokalize IGS1 bölgesinin 2002 yılında yapılan sekans analizi sonucu *Trichosporon* genusunda 25 tür ön görülmüş; bunlardan 8'inin insanlarda olası patojen olduğu belirtilmiş; *T domesticum* ve *T montevideense* olmak üzere iki yeni tür tanımlanmıştır (25). Aynı grup 2004 yılında, Middehoven tarafından önerilen 5 yeni türün (*T vadense*, *T smithiae*, *T dehoogii*, *T scarabaeorum*, *T gamsii*) de dahil olduğu, 36 *Trichosporon* türünü tanımlamışlardır. Aynı zamanda Trichosporonales order'ı, Gracile, Porosum, Cutaneum, Ovoides olmak üzere, 4'e ayrılmıştır. Aynı yıl Brassicae de bunlara eklenmiştir (8). Nükleotid sekanslarının karşılaştırmalı analizlerinde IGS1 bölgesinde, ITS bölgesine oranla daha fazla varyasyon saptanmıştır. Bu nedenle *Trichosporon* identifikasyonunda IGS sekans analizinin daha uygun olduğu belirtilmiştir (25). Dünyanın farklı bölgelerinden 16'si klinik olarak anlamlı olmak üzere, 50 *Trichosporon* türü tanımlanmıştır (28).





**Şekil-1: *Trichosporon* rRNA loküsünün şematik görünümü (25)**

IGS 1 bölgesindeki farklılıklara dayanılarak *Trichosporon* türlerinde 9 farklı genotip (genotip 1-9) tanımlanmıştır (26). Bu genotiplerin dağılımı coğrafi olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Japonya'da en sık genotip 1, ABD'nde genotip 3 ve 5, İspanya'da genotip 1 ve 5 görülmektedir (26, 29). Kalkancı ve ark.(26), Türkiye'de farklı merkezlerden izole edilmiş toplam 87 *T. asahii* kökeninde IGS sekans analizi ile yaptıkları genotiplendirme çalışmasında %79.3 oranında genotip 1 tespit etmişler; genotip 5, 3, 6, 4 ve 9'u sırasıyla %8, %6.9, %3.4, %1.1 ve %1.1 oranlarında saptamışlardır.

## 2.7. Fungal Enfeksiyonlarda Patogenez

Mantar hücreleri ile konak hücreleri arasındaki etkileşim oldukça karmaşıktır. Sağlıklı kişilerde, cilt ve mukoza yüzeylerinde kolonize olabilirler; gastrointestinal sistem, oral kavite ve vajende kommensal olarak bulunabilirler. Genellikle orofaringeal, özafajial, vulvovajinal ve kutanöz yüzeysel enfeksiyonlar oluştururlar (30). Ayrıca doku hasarı sonrasında epitelden doğrudan penetre olarak ya da kateter, dental implantlar, protezler, santral sinir sistemi şantları gibi cisimler üzerinde oluşturdukları biyofilmler yoluyla doğrudan kan dolaşımına geçebilirler (31). Kan dolaşımı ile akciğer, böbrek, kalp, karaciğer, dalak, beyin gibi tüm iç organlara yayılabilir; fungemi ve yaşamı tehdit eden septik bir tabloya yol açabilirler (32).

Klinik tablonun oluşumu ve seyrinde, konak immünitesi ile fırsatçı patojen mantar arasındaki denge ve bu dengedeki bozulma önemli rol oynar (31, 32). Konak bağışıklık sistemi normal olan olgularda yüzeysel mantar enfeksiyonları ile sonuçlanan durum; bağışıklık sistemini etkileyen altta yatan risk faktörleri olan konakta, konak hücresel savunma mekanizmalarının yetersiz kalması ile birlikte mantarın kan dolaşımına geçişi ile sonuçlanır (32).

Enfeksiyon aşamasında konak ve mantar hücreleri ile ilgili birçok farklı faktör rol oynamasına rağmen mutlak temel rol oynayan bir komponent henüz tanımlanmamıştır. Fungal enfeksiyonun ciddiyeti ve prognoz, temel olarak patojenin konak immün yanıtının üstesinden gelme yeteneğine ve oluşturacağı doku hasarına bağlıdır. Konak immün yanıtının bozulması, kontrolsüz olması ya da aşırı reaktif olması invazif mikoz seyrinin ciddiyetini ve prognozu doğrudan etkilemektedir (18).

Kandidozda konak savunmasında hem antikor hem de hücre aracılı immün yanıt rol oynamaktadır. Organizmanın kolonizasyonu için ilk şart konak epitel hücre yüzeyine adezyondur; bunu penetrasyon ve dokulara invazyon izler (32).

Fagositik hücreler (nötrofiller ve mononükleer fagositler) doğal bağışıklığın efektör hücreleridirler. Bu hücreler oksidatif ve oksidatif olmayan mekanizmalar ile *Candida* hiflerine zarar verirler. Nötropeni dissemine kandidozda başlıca risk faktörüdür (18).

Solunum yolundan alınan *C neoformans* ilk olarak akciğerlerdeki fagositik hücreler (dendritik hücreler ve alveolar makrofajlar) ile karşılaşır. Fagositoz, fungal DNA ve solübl glikoantijenlere maruz kalma, sitokin ve kemokin salınımına ve maya hücrelerinde yıkıma yol açar (18).

Lokal fagositoz (doğal immün yanıt) fungal enfeksiyonun kontrol altına alınmasında ilk işlem olmasına rağmen hücre aracılı bağışıklık (kazanılmış bağışıklık) başlıca konak savunma mekanizmasını oluşturur. Naif T helper hücrelerinin (Th0) aktivasyonu farklı efektör hücrelere farklılaşmalarına neden olur. Th1 ve Th2 immün yanıtı arasındaki denge, immünkompromize konakta gelişen fungal enfeksiyonun seyir ve prognozunda esas rolü oynamaktadır. Efektör T hücreler içinde başlıcaları Th1 ve Th2 olmasına rağmen regülatuar T hücreleri (Tregs) ve Th17 gibi yeni T hücreleri de tanımlanmıştır. Transforming growth faktör  $\beta$  (TGF $\beta$ ), interlökin 6 (IL-6) ve interlökin 23 (IL-23) varlığında, Th0, Th17'ye dönüşmektedir. Th17'nin uzamış inflamasyon ve *Candida* ile *Aspergillus* enfeksiyonlarında patojen klirensinde bozulma ile ilişkili olduğu saptanmıştır (18).

*Trichosporon* hücre duvarından glukuronoksilomannan (GXM) eksprese edilmektedir. *Trichosporon* hücre duvarında bulunan GXM, antijenik ve biyokimyasal olarak *C neoformans*'ın eksprese ettiği GXM'a benzerlik gösterir. GXM monosit fagositozunu inhibe etmektedir. *C neoformans*'da olduğu gibi fungemili hastalardan izole edilen *Trichosporon* kökenlerinin de GXM antijenlerini yüksek konsantrasyonda eksprese ettikleri gösterilmiştir (6).

İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )'nın yanı sıra monosit ve granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ile yapılan *in vitro* çalışmalar, *Trichosporon*'a karşı fagositozda artışı göstermektedir. Bu da rekombinant sitokinler ve özellikle de GM-CSF ile adjuvan immünoterapi için olası bir rolü düşündürmektedir (6).

### **Epitel Hücre İnvazyonu**

Mantarlar içinde en sık etken olarak tanımlanan tür olması sebebiyle organizmanın epitel hücreleri ile etkileşimi üzerine detaylı çalışmalar *C albicans* ile yapılmıştır.

Yüzeysel enfeksiyonlarda en karakteristik histopatolojik bulgu mantar hücrelerinin epitel hücreleri içindeki varlığıdır. Organizmanın hücre içi yerleşiminin organizmayı konak immün yanıtından koruduğu düşünülmektedir (30).

Oral epitel hücrelerine invazyonda iki mekanizma tanımlanmıştır. Birinci mekanizma, organizma tarafından aspartil proteinaz (SAP; secreted aspartyl proteinases) gibi litik enzimlerin üretimidir. Bu enzimlerin epitel hücre yüzeyinde oluşturdukları litik etki ile organizmanın epitel hücreleri içine girişinin sağlandığı ileri sürülmektedir. SAP'ın özellikle keratinize epitel hücrelerine invazyonda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli SAP genlerinde mutasyon olan *C albicans* mutantlarının vajinal ve oral epitel hücrelerinde oluşturdukları hasarın daha az olduğu *in vitro* gösterilmiştir. *Candida* SAP'ı muhtemelen, organizmanın konak hücreleri arasındaki geçişini artırarak doku penetrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (30).

Epitel hücrelerine invazyonda bir diğer mekanizma epitel hücre endositozunun indüksiyonudur. *C albicans* epitel hücrelerini, psödopotlar oluşturmaları yönünde indüklemekte; epitel hücre mikrofilamanlarının organizma çevresinde birikimi ile oluşan

psödopotlar organizmayı çevrelemekte ve hücre içine girişi sağlamaktadır. Hem maya hem de hif formundaki organizmalar bu süreci tetiklese de hifler bu süreçte daha etkin gözükmetedir (30).

*C. albicans*'ın virülansında anahtar faktörün, oval yapıdaki blastosporların filamentöz yapıdaki hiflere dönüşümü olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar hiflerin, mikroorganizmanın invaziv formu olduğunu göstermiştir. Çünkü blastosporlar epitel hücreleri arasında ve yüzeyinde yer alırken; hifler epitel hücresi içinde bulunmaktadır (30).

### **Endotel Hücre İnvazyonu**

Duyarlı kişilerde *Candida* türleri gastrointestinal mukozadan translokasyon ya da intravasküler kateter yoluyla kan dolaşımına geçebilmektedir. Organizmanın kan dolaşımından hedef organlara ulaşabilmesi için kan damarı boyunca sıralanmış endotel hücrelerini geçmesi gerekmektedir. Bu süreçte üç mekanizma rol oynamaktadır. İlk mekanizma organizmanın bir lökosit tarafından fagosite edilerek diapedez yoluyla kan damarı boyunca sıralanmış endotel hücrelerine girişidir. İkinci mekanizma organizmanın endotel hücreleri arasından geçişidir. Böylesi bir durum muhtemelen, kan damarlarında endotel hücrelerinin fenestralı yapıda olduğu böbrek gibi organların damar yataklarında mümkündür. Üçüncü bir mekanizma da organizmanın endotel hücreleri tarafından endositozudur (30). *C. albicans* hiflerinin Als 3 (Agglutinin-like sequence 3) adlı bir "invasin-like protein"i eksprese ettiği; bu proteinin de endotel hücre yüzeyindeki N-cadherin ve diğer proteinlere bağlanabildiği gösterilmiştir. Yüzey proteinlerine bağlanma en azından iki farklı endotel hücre proteininde fosforilasyonu indüklemektedir. Bu da endotel hücre mikrofilamanlarının tekrar düzenlenmesi ile psödopot oluşumu ve endositozun başlamasına yol açmaktadır (26).

### **2.8. Virülans Faktörleri**

Patogeneizde mikroorganizma ile ilişkili virülans faktörleri içinde hidrolitik enzimlerin salınımı, antijenik değişkenlik, konak hücre ve dokularına ve yabancı maddelere adezyon, dimorfik değişim (maya-hif), fenotipik değişim ya da farklı hücre fenotiplerine dönüşüm yer almaktadır. Birçok virülans faktörünün ekspresyonu *in vitro*

olarak çevresel parametreler ile düzenlenir; *in vivo* olarak enfeksiyonun evresine, ayrıca konak ve dokularına göre de değişkenlik gösterir (33) (Şekil-2).

Trikosporoz patogeneğinde ise konakla ilişkili risk faktörleri yanında etkene ait virülans faktörlerinin de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Virülans faktörlerine ilişkin çalışmalar çok az sayıda olup çalışmalar daha çok *Candida* türlerinde yapılmıştır.

### Adezyon

Birçok patojen mikroorganizmada olduğu gibi *Candida* türlerinde de konak doku hücrelerine bağlanma patogeneğinde en önemli aşamadır. Etkenin hücrelere bağlanmasına “adezyon”, bu özelliğe de “adeziv özellik” denir. Kolonizasyonun ve enfeksiyonun başlangıcında “adezyon” ilk basamaktır. *C. albicans*'ın konak hücrelerine (epitel ve endotel hücreleri, solübl faktörler, hücre dışı matriks) ve implant maddelerine adezyonunda, adezinler olarak tanımlanan hücre duvarı komponentlerinin aracılık ettiği birçok aderans mekanizması etkin rol oynamaktadır (34).

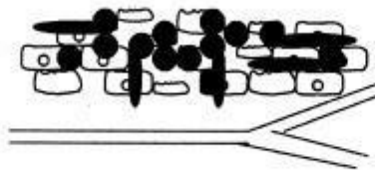
Evre 1: Kolonizasyon  
Epitele adezyon



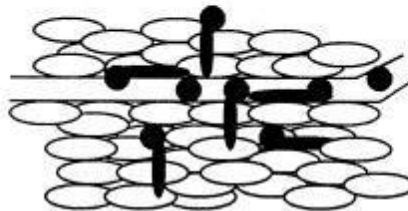
Evre 2: Yüzeysel enfeksiyon  
Epitel penetrasyonu  
Konak proteinlerinin degradasyonu



Evre 3: Derin yerleşimli enfeksiyon  
Doku penetrasyonu  
Vasküler invazyon  
İmmün saklanma ya da kaçış



Evre 4: Dissemine enfeksiyon  
Endotel adezyonu  
Diğer konak dokularının enfeksiyonu  
Koagülasyonun aktivasyonu



### Virülans Faktörleri

Adezinler  
Hidrolitik enzimler  
Hif oluşumu  
Fenotipik değişim  
Moleküler benzerlik?

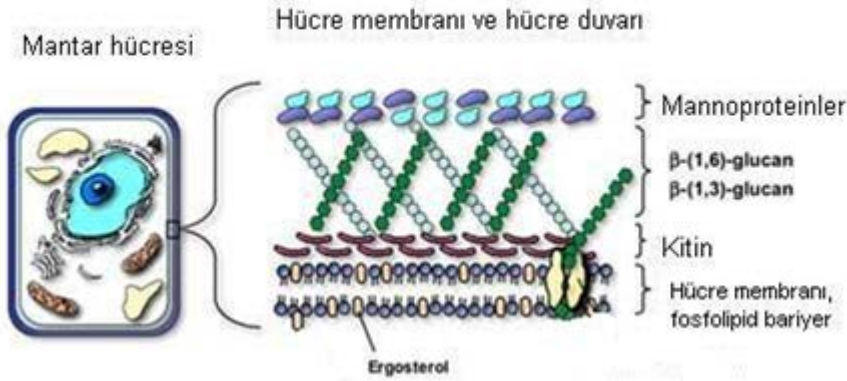
Hidrolitik enzimler  
Hif oluşumu

Hidrolitik enzimler  
Hif oluşumu  
Konak benzerliği?  
İmmünomodülatörler?

Adezinler  
Hidrolitik enzimler  
Hif oluşumu  
Fenotipik değişim  
Antioksidanlar?  
İmmünomodülatörler?

**Şekil-2: *C. albicans* patogeneğinde çeşitli virülans faktörlerinin rolü (33)**

Adezyonda esas rolü hücre duvarı ve hücre zarı üstlenmektedir. Hücre duvarı maya formu mantarların karakteristik biçimini sürdürmesinden; konak, çevre ve diğer mikroorganizmalar ile etkileşiminden ve *C albicans*'in patogenezinde sorumlu en önemli virülans faktörü olarak tanımlanır. Hücre duvarı polisakkarit (%47-60  $\beta$  glukan, %30 mannan, %0.5-9 kitin), protein (%6-25) ve lipitten (%1-7) oluşmaktadır (34) (Şekil-3).



**Şekil-3: Mantar hücre duvarı yapısı (34)**

*Candida* türlerinin ağız ve vajina epiteline *in vitro* yapışma yeteneğinin incelendiği bir çalışmada, *C albicans*'in mukoza yüzeylerine yapışma yeteneğinin daha fazla olduğu; bunun yanında *C tropicalis* ve *C stellatoidea*'nin de anlamlı ölçüde adezyon gösterdikleri; bu özelliğin *C parapsilosis*'de zayıf olduğu; *C guilliermondii*, *C krusei* ve *C kefir*'de ise bulunmadığı gözlemlenmiştir. *Candida* türleri arasındaki bu farklılık adezyon ile patojenisite ilişkisine işaret etmektedir (13).

Hücre zarı hücrelerin yaşamları için son derece önemli, hücreyi dış ortamdan ayıran ve çok sayıda işlevleri olan bir bariyerdir. Lipid ve protein moleküllerinin kovalen olmayan bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturdukları bir yapıdır. Lipid molekülleri hücre zarının yaklaşık %50'sini oluşturur. Hücre zarında bulunan tüm lipid molekülleri (fosfolipid, kolesterol ve glikolipidler) "amfifilik" özelliktedir; hidrofilik (su seven, polar) ve hidrofobik (su sevmeyen, non-polar) uçları vardır. Hücre zarında en fazla bulunan lipid molekülü fosfolipidlerdir. Hücrenin yüzey hidrofobisitesini sağlar. Yağ asitlerinin uzunluğu arttıkça yüzey hidrofobisitesi artar (35).

Mikroorganizmaların ökaryotik hücrelere bağlanması tamamen hücre-hücre ilişkisine dayanan bir olaydır. Mikroorganizmalar ökaryot hücreler gibi negatif yüzey potansiyeline sahiptirler. İki hücre birbirine yaklaştığında bu nedenle birbirini iter. Bu itici güce karşı gelen çekici kuvvetler, “non-spesifik” ve “spesifik” çekici kuvvetler olarak tanımlanır. Mikroorganizma yüzeyindeki hidrofobik moleküller non-spesifik olarak negatif yüklü iki yüzeyin itici kuvvetine karşı koyarak mikroorganizmaların mukoza hücresine yaklaşmasını sağlar. Böylece mikroorganizma yüzeyinde bulunan ligandlar mukoza hücresinde bulunan reseptörlerle geri dönüşümsüz şekilde antijen-antikor ilişkisinde olduğu gibi spesifik olarak bağlanır (36).

### **Adezinler ve Adezyon Molekülleri**

*C albicans*'ın hücre duvarının yüzey kısmında epitel ve endotel hücrelerine, serum proteinlerine, hücre dışı matriks proteinlerine adezyondan sorumlu reseptörler bulunur. Bu adezinler Als protein ailesi, Hwp1p, Eap1p, Csh1p, Iff4, Ywp1 ve diğer hücre yüzey proteinleridir (31, 37). *C albicans* hücre duvarı  $\beta$  glukanlar ( $\beta$  -1,3 ve  $\beta$  -1,6 bağları içeren, dallı glikoz rezidü primerleri), kitin ( $\beta$  -1,4 bağları içeren N-asetil D-glukozamin polimerleri), mannoproteinler, az miktardaki diğer proteinler ve lipidlerden oluşur. Bilinen tüm reseptörler mantar hücre duvarı ile sıkı ilişki içindedir. Als protein ailesi, *Candida* adezinlerinin iyi bilinen bir örneğidir (31). Als protein ailesi 8 glikozilfosfotidilinositol (GPI) bağlı hücre yüzey proteinini kodlamaktadır ve konak hücrelerine adezyonda rol oynamaktadır. *C albicans* delesyon mutantları ile yapılan çalışmalarda Als2, Als3 ve Als4'ün, epitel hücrelerine adezyonda rol aldığı gösterilmiştir (37). Hwp1 (hyphal wall protein 1) bir GPI proteinidir. *C albicans* hifleri yüzeyinden eksprese edilir ve oral epitel hücrelerine adezyonda rol alır. Son zamanlarda Hwp1'in aynı zamanda Als1 ve Als3'e de bağlandığı, böylece bir *C albicans*'ın hifinin diğerine adezyonunda da rol aldığı gösterilmiştir. Bu self adezyon biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizmadır (37).

Bazı adezinler tercihen *C albicans*'ın spesifik bir formundan eksprese edilmektedir. Örneğin Als3 ve Hwp1 yalnızca hiflerden eksprese edilmekte, maya fazındaki organizmadan eksprese edilmemektedir. Als1 ise belli koşullarda yalnızca maya formundan eksprese edilmekte, hif formu oluşumu başladıktan sonra yalnızca kısa bir süre salınmaktadır. Eap1 ise hem maya hem hif formlarından salınmaktadır. Böylece *C albicans*'ın farklı formlarının epitel hücrelerine bağlanmasında farklı adezinler rol

almaktadır. Ayrıca adezinler kendi içlerinde etkileşime girerek multimerler oluşturabilmektedirler (37).

### **Ekstrasellüler Enzimler**

Proteaz, lipaz, fosfolipaz gibi hidrolitik enzimlerin üretimi ve sekresyonu önemli virülans faktörleri olarak tanımlanmaktadır. Bu enzimler nütrisyonda rol alırlar fakat aynı zamanda ekstrasellüler proteinlerde parçalanma ve hücre membranında hasarlanma, doku hasarı, konak hücrelerine yayılım, demir temini, konak immün sisteminin üstesinde gelme ve fungal patojenitede de önemli rolleri vardır. Birçok hidrolitik enzim *C albicans* için tanımlanmıştır (31).

**Fosfolipaz:** Hücre zarına bağlı veziküllerde bulunur, doku invazyonunda oldukça etkin rol oynamaktadır. Hücre zarında bulunan gliserofosfolipidlerin ester bağlarının hidrolizi yoluyla fosfolipidlerin yıkımına yol açar. Bu enzimlerin aktivasyonu ile yıkılan fosfolipidlerden oluşan ürünler biyolojik membranların bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Sekrete edilen dört tip fosfolipaz vardır (Fosfolipaz A, B, C, D) (31, 38). Kandan izole edilen *C albicans* hücrelerinin kommensal kökenlere göre daha fazla miktarda fosfolipaz ürettiği gösterilmiştir (31).

*C albicans*'ın ekstrasellüler fosfolipaz salgıladığı ilk kez Werner (1966) ve Costa ve ark. (1967) tarafından yumurta sarısı içeren besiyerinde saptanmıştır. Daha sonra lesitinli ve koyun kanlı agarda da aynı aktivasyon gösterilmiştir (38-40). 1975 ve 1977 yıllarında yapılan diğer çalışmalarda da bu aktivitenin fosfolipaz A ve lizofosfolipaz enzimleri ile olduğu saptanmıştır (40).

Önceden sadece fosfolipaz A ve lizofosfolipaz bilinmekte iken; 1985 yılından sonra fosfolipaz B elde edilmiş; *C albicans*'ın fosfolipaz aktivitesinde en önemli rolü fosfolipaz B'nin oynadığı ve fosfolipazın etkenin dokuya invazyonundaki rolü gösterilmiştir (40).

*In vitro* fosfolipaz aktivitesini ölçmeye yönelik çalışmaların çoğunda radioimmünassay (RIA) başta olmak üzere çeşitli yöntemler denenmiştir. Ancak bu yöntemlerin uygulama güçlüğü, deneyimli eleman gerektirmesi nedeniyle kullanımı sınırlı olmuştur. 1982 yılında Price ve ark. yumurta sarısı içeren katı bir besiyerinde fosfolipaz



aktivitesini göstermeyi başarmış, bu yöntemin modifiye şekli birçok çalışmada kullanılmıştır (41-44).

**Proteinaz:** Virülansta rolü olan, hücre dışına salınan bir diğer enzim SAP'dır. İlk kez 1964 yılında Staib tarafından tanımlanmıştır. Amonyum içermeyen, azot kaynağı olarak sadece protein bulunduran besiyerlerinde üretilen *Candida* türlerinin bu enzimi salgıladıkları saptanmıştır. Asit pH'da (pH:2.5-4) aktivasyon göstermesi nedeniyle "asit proteinaz", çok miktarda aspartik asit rezidüleri içermesinden ötürü "aspartat proteinaz", pepstain A ile inhibe olduğu için de "karboksil peptidaz" gibi adlarla tanımlanmıştır (36).

SAP gen ailesi benzer fonksiyonel özellik gösteren ancak moleküler ağırlık, izoelektrik nokta, optimal aktivite için pH gibi farklı moleküler özellikler gösteren enzimleri kodlayan en az 10 farklı geni (SAP1-SAP10) içermektedir. SAP aktivitesi için optimal pH 2 ile 7 arasında değişmektedir (31).

### **Slime Faktörü (Yapışma Faktörü)**

Slime faktörü mikroorganizma tarafından salgılanan, metal ve plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan bir faktördür. Kalınlığı birkaç milimetreye varan bu biyofilm tabakası *in vivo* katı yüzeylere yapışma özelliği gösterip, damar içi kateter ve protez uygulamalarında enfeksiyöz komplikasyonlara zemin hazırlamaktadır. Ekstrasellüler, amorf şekilli, glikokaliks yapıda (%40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşan) bir maddedir (45).

Kateter ilişkili kandidemi olgularında slime faktörü ile etken katetere yapışmakta, kolonize olmakta, saatler ya da günler içinde fibrinojen, fibrin, fibronektin ve vitronektin gibi konağa ait ekstrasellüler matriks proteinleri ile etkileşerek biyofilm tabakaları oluşturmaktadır (46-48). Slime faktörü polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisinin inhibisyonu ile opsonizasyon ve fagositoza zıt etki gösterir. Ayrıca bu hücrelerin degranülasyonunu indükleyebildiği ve oksijene bağımlı metabolik aktivitelerini inhibe edebildiği belirtilmektedir (49). Slime faktörü sadece damar içi kateter uygulamalarında değil üriner kateter, endotrakeal tüp, ortopedik implantlar, prostetik kalp kapakları, peritoneal diyaliz kateterleri gibi malzemelere de yapışmada rol oynamakta ve ilişkili enfeksiyonlara zemin oluşturmaktadır (48).

Katater (üriner, periton diyaliz ve santral venöz) ile ilişkili invaziv *Trichosporon* enfeksiyonlarında, katetere adezyon ve biyofilm oluşturma özelliği konak immün yanıtı, antifungal ajanlardan kaçış ve enfeksiyonun klinik seyrinde etkili faktörlerdir (28). Bonaventura ve ark tarafından (50), kan kültüründen izole edilen 4 *T. asahii* kökeninde 30 dakika inkübasyon sonrasında, *Candida* biyofilm oluşumuna benzer şekilde polistren yüzeye adezyonun gerçekleştiği elektron mikroskopik inceleme ile gösterilmiştir. 72. saatin sonunda oluşan olgun biyofilm tabakasının, 25-40 µm kalınlığında, polisakkarit bir matriks içinde tomurcuklanan maya ve filamentöz formda hücrelerden oluştuğu tespit edilmiştir.

### **Diğer Virülans Faktörleri**

Adezyon yeteneği, fosfolipaz, preoteinaz ve slime faktörü üretimi gibi virülans faktörlerinin yanı sıra, çimlenme borusu ve hif oluşumu (dimorfizm), fenotipik değişim, yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı toksinler de kandidoz gelişiminde önemli diğer virülans faktörleri olarak bilinmektedir.

Bu çalışmada etken olarak izole edilmiş *Trichosporon* kökenlerinde olası virülans faktörlerinden asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz gibi ekstrasellüler enzimlerin ve adezyonda rol oynadığı düşünülen yüzey hidrofobisite ve epitel hücrelerine bağlanma özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **2.9.Sistemik Etkili Antifungal Ajanlar**

İlk kez 1950’li yıllarda mikozlarda sistemik kullanıma giren **amfoterisin B**, poliyen grubundan bir antifungal ilaçtır (51). Mantar hücre zarının ergosterol molekülüne bağlanıp membran geçirgenliğini artırarak etki eder. Geçirgenlik artışının yarattığı sitoplazmik içeriğin kaybı hücre ölümü ile sonuçlanır (52). *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus* ve diğer fırsatçı küf mantarları ile mukormikoz etkenleri ve bazı protozoon enfeksiyonlarında etkilidir (53). Geniş etki spektrumu ve fungusidal etkisi nedeniyle ciddi fırsatçı enfeksiyonlarda altın standart bir ilaçtır. Ancak

parenteral kullanımında sıklıkla görülen bulantı, ateş ve renal toksisite gibi yan etkileri deoksikolat şeklindeki klasik formun kullanımını sınırlamaktadır. Günümüzde amfoterisin B'nin yan etkisi daha az olan çeşitli lipit bileşikleri de mevcuttur (54).

**Azoller** sentetik fungostatik ürünlerdir. Etki spektrumları geniş olup, ergosterol sentezini inhibe ederler. Fungusun sitokrom p-450 enzimlerinden birine bağlanmaları; lanosterolün C-14 $\alpha$  demetilasyonunda inhibisyona, C-14 $\alpha$  demetilsterollerin birikimine ve ergosterol konsantrasyonunda azalmaya yol açar. Sonuç olarak fungal üreme ve replikasyon inhibe olur (52, 55).

İmidazol türevi olan **ketokonazol**un sistemik kullanımı 1981 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır. Ancak ketokonazolün oral emiliminin değişkenlik göstermesi, intravenöz verilememesi, kan-beyin bariyeri geçişinin zayıf olması, fungostatik etkisi, ilaç etkileşimleri ve ciddi yan etkileri kullanımını sınırlamıştır (55).

Azol halkasında 2 azot içeren imidazollerden sonra 3 azot içeren yeni triazoller geliştirilmiştir. Bunlar daha az hormon inhibisyonu yapmaları (sitokrom p-450 inhibisyonu ile testosteron ve kortizol sentezinde azalma), daha az ilaç etkileşimleri, parenteral formlarının bulunması, daha geniş spektrumları, vücut sıvılarına daha iyi dağılımları, daha az gastrointestinal yan etki ve hepatotoksisite oluşturma potansiyelleri gibi tercih edilebilir özelliklere sahiptirler. İlk triazol 1990 yılında kullanılmaya başlanan **flukonazoldür**. Sistemik ve yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir ilaçtır. Oral yolla alındığında gastrointestinal sistemden emilimi oldukça iyi olup, %80'inden fazlası dolaşıma geçer ve sadece %10'u serum proteinlerine bağlanır. Doku dağılımı iyidir ve vücuttan %60-75 oranında idrar ile, %8-10 oranında ise dışkı ile değişmeden atılır (55). **İtrakonazol** ikinci triazol olarak 1992 yılında kullanıma girmiştir. Küf mantarlarına etkisi flukonazole göre daha fazladır. Ayrıca flukonazole intrensek dirençli olan *C krusei* ve *C glabrata* gibi türlere de diğer türlerden daha az olmakla beraber etkilidir. Ancak farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri flukonazolden kötüdür. Oral absorpsiyonu zayıf olup, mide pH'sı yüksek olduğunda emilimi hiç olmaz. Damar içi kullanıma uygun preparatları geliştirilmiş ise de fazla etkinlik sağlanamamıştır. Serum proteinlerine yüksek oranda bağlandığından doku dağılımı daha zayıftır.

Flukonazole göre daha geniş etki spektrumu olmasına rağmen diğer olumsuz özellikleri nedeniyle fazla kullanım alanı bulamayan itrakonazolden sonra ikinci jenerasyon triazol (vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) geliştirilmişlerdir. Geniş spektrumlu ve oral kullanımları olan ajanlardır. Vorikonazol, *Candida spp*, *C neoformans*, küf mantarları, dimorfik mantarlar ve dermatofitler gibi klinik olarak önemli birçok patojen gruba etkili olmasına karşın zigomiset grubundan mantarlara etkili gözükmemektedir. *Candida* türlerine karşı etkinliği flukonazol ve itrakonazolden birkaç kat daha fazladır. Ancak flukonazol ve itrakonazol ile çapraz direnç söz konusudur. Oral ve parenteral kullanımı vardır. İnvaziv aspergillozda amfoterisin B'den daha etkili olduğu ve daha iyi tolere edildiği yönünde bulgular vardır (56). Ancak yine de ilaç etkileşimleri ve yan etkileri nedeniyle ideal bir azol değildir. Dozla ilişkili geçici görsel bozukluklar %10 oranında rapor edilmiştir (55). Posakonazol itrakonazolün hidrosile edilmiş bir analogudur. Geniş spektrumlu olup, zigomisetler ve bazı koyu pigmentli küf mantarları da dahil olmak üzere fırsatçı ve endemik fungal patojenlere karşı etkilidir. *In vitro* olarak *Aspergillus* türlerine oldukça etkin olup, flukonazolle karşılaştırıldığında *Candida* türlerine karşı en az 8 kat daha fazla etkili olduğu saptanmıştır. Hayvan çalışmalarında, vorikonazol gibi posakonazolün de amfoterisin B, flukonazol ve itrakonazolden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ravukonazol özellikle *C krusei* ve *C neoformans*'a karşı olmak üzere flukonazol ve itrakonazolden daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir. *In vitro* olarak *Fusarium* türlerine etkili değildir (55). Posakonazol sitokrom P450 3A4'ü selektif olarak inhibe ettiğinden, diğer yeni triazol türevleri gibi sitokrom P450 enzim aktivitesini inhibe etmez ve ilaç etkileşimleri daha azdır (57).

Hücre zarına etkili olan poliyen ve azol grubu antifungaller dışında son yıllarda hücre duvarı sentezini inhibe eden ilaçlara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Mantar hücre zarında bulunan ergosterolün memeli hücre zarında bulunan kolesterol ile benzerlik göstermesi yan etkilerin daha fazla oluşmasına yol açmaktadır. Bu nedenle mantar hücre duvarına etkili ilaçların üretilmesi gündeme gelmiş ve 2000'li yıllarda ekinokandin sınıfından ilk ticari preparat olan **kaspofungin** kullanıma girmiştir. Kaspofungin, *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *Pneumocystis jiroveci*'nin kist formunun da dahil olduğu birçok mantarın hücre duvarının bir komponenti olan  $\beta$ -(1,3)-D-glukan sentezini inhibe ederek etkilidir (58). Yeni ekinokandin türevlerinden **mikafungin** ve **anidulafunginin**, *Candida*

ve *Aspergillus* türleri ile azollere dirençli *Candida* türlerine etkili olduğu gösterilmiştir (59, 60).

## 2.10. Antifungal Duyarlılık Testleri

Amfoterisin B'nin uzunca süre tek ilaç olması ve mantar enfeksiyonlarının daha seyrek görülmesi gibi nedenlerle antifungal duyarlılık testleri, antibakteriyel duyarlılık testlerinde ulaşılan standartları henüz yakalayamamıştır. Ancak zaman içinde daha az toksik ve daha etkili ajanların kullanıma girmesinin yanı sıra antifungal ajanlara karşı direnç gelişmesi; hekimi tedavi rejiminin seçiminde karar verme noktasına getirmiş ve duyarlılık testlerinin standartlaşması ile ilgili çalışmalar büyük ölçüde artmış ve hızlanmıştır.

Standart yöntemin geliştirilmesi: İlk kez 1982 yılında ABD'nde NCCLS tarafından kurulan bir alt-komite standartlaştırma çalışmalarına başlamıştır. Öncelikle anket yapılarak konu ile ilgili veri toplanması planlanmış ve bu anketin sonuçları 1986 yılında yayınlanmıştır (61). Anket sonuçlarına göre; konuya ilginin olduğu ancak elde edilen duyarlılık sonuçlarının laboratuvar içi ve laboratuvarlar arasında uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Ankete katılan merkezlerin en fazla tercih ettikleri yöntem makrodilüsyon yöntemi olduğu için çalışmalar bu yöntemin standardizasyonuna yoğunlaşmış ve antifungal duyarlılık testlerinde karşılaşılabilecek sorunlar tartışılmıştır. Bu sorunlar Tablo-2'de kısaca özetlenmiştir (61, 62).

Bundan sonraki süreçte makrodilüsyon yöntemi için çeşitli kollaboratif çalışmalar yapılmış; inokulum miktarı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, antifungal ilaç dilüsyonları, besiyeri içeriği ve pH'sı, minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesi (end-point) gibi konularda tekrarlanabilirliği olan ve laboratuvarlar arası uyumu yüksek bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır (63-69). Sonuçta 1992 yılında NCCLS tarafından antifungal duyarlılıkla ilgili ilk sirküler M27-P yayınlanmıştır (70). Bu sirkülerde sadece *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için makrodilüsyon yöntemiyle amfoterisin B, flusitozin, ketokonazol ve flukonazol duyarlılığının araştırılması önerilmektedir.

Yöntemin laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi uyumu kapsamlı bir çalışma ile de doğrulanmış olup; sirkülerde yer alan önemli parametreler Tablo-3’de gösterilmiştir (70).

**Tablo-2: Antifungal Duyarlılık Testleri İle İlişkili Problemler**

<b>Mikroorganizma ile ilişkili problemler</b>	<b>Antifungal ajanla ilişkili problemler</b>	<b>Antifungal ajanın MİK*’nu etkileyen test koşulları</b>	<b>Klinik korelasyon</b>
◆ Yavaş üreme hızı	◆ Eriyebilirlik	◆ Besiyerinin içeriği ve pH’sı	<i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i>
◆ Hif / maya formu	◆ Kimyasal stabilite	◆ İnokulumun hazırlanma şekli ve miktarı	korelasyon
	◆ Üremenin kısmi olarak inhibisyonu	◆ İnkübasyon sıcaklığı ve süresi	
	◆ Etki mekanizması	◆ End-point kriterleri	

\*MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

Ancak makrodilüsyon zaman alıcı ve laboratuvarlara yük getiren bir yöntemdir. Bu nedenle bu tekniğin mikrodilüsyon yöntemi ile korelasyon çalışmaları gündeme gelmiş (71-73) ve NCCLS 1995 yılında mikrodilüsyon formatının da bulunduğu ikinci sirkülerini yayınlamıştır (74). Mikrodilüsyon yönteminde sonuçların gözle değerlendirilmesi tavsiye edilmekle beraber daha sonra spektrofotometrik ve kolorimetrik değerlendirme yöntemleri de geliştirilmiştir (75-77). Bu sirkülere mikrodilüsyon formatının yanı sıra kalite kontrol suşları ile ilgili çalışmalardan elde edilen veriler de eklenmiştir (78, 79).

Üzerinde çalışılması gereken önemli bir nokta da *in vitro* duyarlılık testlerinin *in vivo* sonuçlar ile korele olmasıdır. Korelasyon sağlanmadığı takdirde yöntemin her hangi bir yarar sağlaması mümkün değildir (51, 69, 80, 81). Büyük ölçüde standardize edilen yöntemin *in vivo* korelasyonu ile ilgili çalışmalar bu aşamada hızlanmış ve 1997 yılında yayınlanan NCCLS M27-A sirkülerinde flukonazol ve itrakonazol için breakpoint değerleri belirlenmiştir (82-84). Ancak amfoterisin B için problemler devam etmektedir.

Amfoterisin B çok dar aralıklarda etkin olduğundan duyarlı ve dirençli suşların ayrımı zordur. Besiyeri olarak RPMI 1640 yerine antibiyotik medium 3'ün kullanılması daha olumlu sonuçlar vermiştir (85, 86). Tüm bu yeni gelişmelerin ışığında, 2002 yılında NCCLS tarafından M27-A2 sirküleri yayınlanarak amfoterisin B için antibiyotik medium 3'ün de kullanılabilmesi ve besiyerlerine %2 glikoz eklemenin MİK değerlerini belirlemede yararlı olabileceği bilgileri ilave edilmiştir (87). Bununla beraber amfoterisin B için duyarlılık sınırları tam olarak kesinleşmemiştir.

**Tablo-3: NCCLS M27-P Dökümanında Önerilen Parametreler (70)**

<ul style="list-style-type: none"><li>◆ Besiyeri: RPMI 1640 (MOPS'lu, pH:7.0)</li><li>◆ İnokulumun hazırlanması (spektrofotometrik yöntem)</li><li>◆ İnokulum miktarı: <math>0.5 \times 10^3</math>-<math>2.5 \times 10^3</math> hücre/mL</li><li>◆ İnkübasyon sıcaklığı: 35°C</li><li>◆ İnkübasyon süresi: 48 saat (<i>C neoformans</i> için 72 saat)</li><li>◆ İlaç çözücülerini: (AmB ve Keto için DMSO, Flu ve 5-FC için distile su)</li><li>◆ İlaç dilüsyonları:<ul style="list-style-type: none"><li>AmB: 0.0313-16 µg/mL</li><li>5-FC: 0.125-64 µg/mL</li><li>Keto: 0.0313-16 µg/mL</li><li>Flu: 0.125-64 µg/mL</li></ul></li><li>◆ MİK değerlerinin belirlenmesi (end-point)<ul style="list-style-type: none"><li>MİK-0: Amfoterisin B: Üremenin tamamen engellenmesi (berrak tüp)</li><li>MİK-1: Flusitozin: Üremenin %90 inhibisyonu</li><li>MİK-2: Azoller: Üremenin %80 inhibisyonu (kontrol tüpünün 4/5 sulandırılmasıyla elde edilen bulanıklık)</li></ul></li></ul>
--

Kısaltmalar: MOPS: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, AmB: Amfoterisin B, Keto: Ketokonazol, Flu: Flukonazol, 5-FC: Flusitozin, DMSO: Dimetil sülfoksit, MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

CLSI tarafından en son yayınlanan M27-A3 dökümanında ise, *Trichosporon* türlerine ilişkin bir standardizasyon ve antifungal duyarlılık breakpoint değerleri yer almamıştır (15).

Tüm bu gelişmelere rağmen *in vitro* antifungal duyarlılık testlerinde arzu edilen noktaya gelinmediği açıktır. Verilen antifungal tedavi (doz, süre, uygulama yolu), konak faktörleri (altta yatan hastalık, CD4<sup>+</sup> hücre sayısı ve diğer risk faktörleri), ilacın farmakokinetik özellikleri, hastanın tedaviye uyumu, klinik yanıtı belirleyebilecek önemli faktörlerdir (51, 81). İdeal bir duyarlılık testinde olması gereken *in vitro-in vivo* korelasyon tam olarak sağlanamadığından, antifungal duyarlılık testlerinin günümüzde rutin kullanımı tavsiye edilmemekte; bu konuda güçlü klinik verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Antifungal duyarlılığı belirlemede kullanılan diğer yöntemler: CLSI tarafından önerilen makro ve mikro dilüsyon yöntemleri yaygın kullanım alanı bulsa da yeni arayışlar her zaman devam etmiştir.

*Agar difüzyon testleri:* Agarda yapılan testler basit ve ekonomik olup; çok sayıda organizma ile aynı anda kolayca çalışılabilme olanağı verdiği için birçok laboratuvar tarafından tercih edilmektedir. Bakteriyolojide daha yaygın olarak kullanılan bu tekniklerde inokulum miktarı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi mantarlar için önemli faktörlerdir. Üremenin kısmi inhibisyonu ya da belirgin inhibisyon zonu içinde persiste eden koloniler nedeniyle inhibisyon çapının ölçümü güçlük oluşturan en önemli noktadır. Ayrıca test edilen antifungal ajanların fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle agar ile etkileşime girmeleri de mümkündür. Agar kimyasal olarak tanımlanmış bir materyal değildir ve katyon konsantrasyonları gibi basit özelliklerindeki varyasyonlar farklı kaynaklardan elde edilen agarlarda değişik sonuçlar doğurabilir. Tüm bu olumsuzlukların ötesinde amfoterisin B ve azollerin dilüe formda ya da kuru olarak antibiyotik diski içinde saklandıklarında özelliklerinin değişebildiğini düşünenler de vardır (88). Ancak bu problemlere rağmen disk difüzyon yöntemi ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Flukonazol diskleri kullanım alanı bulmuş, ticari olarak temin edilebilmekte ve CLSI'nin standart yöntemi ile uyumlu sonuçlar vermektedir (89-91).

E test yöntemi de agarda çalışılan, ticari olarak temin edilebilen kantitatif bir difüzyon yöntemidir. Çeşitli konsantrasyonlarda antifungal ajan emdirilmiş plastik bir şeritten agarlı besiyerine ilacın difüzyonu sağlanarak MİK değerinin saptanması mümkün



olur. Kolay ve pratik bir test olmakla beraber pahalıdır. Henüz tam olarak standardizasyonu sağlanamamışsa da CLSI'nin referans yöntemi ile yüksek düzeyde uyum gösteren sonuçlar bildirilmektedir (89, 90, 92).

Konvansiyonel antifungal ilaçlara dirençli *Trichosporon* enfeksiyonlarında artış olduğu rapor edilmesine rağmen, *Trichosporon* türlerinin yeni antifungal ajanlara *in vitro* duyarlılığının araştırıldığı çalışma sayısı çok azdır. *Trichosporon* türleri için standardize duyarlılık testlerinin olmamasının yanı sıra genus içinde farklı türlerin identifikasyonundaki güçlükler bu konudaki bilginin sınırlı olmasına yol açmaktadır (8).

CLSI'nin M27-A3 dökümanında (15), *Candida* ve *Cryptococcus* türlerinde *in vitro* antifungal duyarlılık yöntemleri ve breakpoint değerlerine ilişkin detaylı bilgi olmasına rağmen *Trichosporon* kökenleri ile ilgili herhangi bir açıklama yer almamaktadır.

*Trichosporon* kökenlerinde antifungal ajanlara *in vitro* duyarlılık verileri oldukça sınırlıdır ve genellikle az sayıda klinik kökeni içerir (7, 22, 8, 93). The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından önerilen antifungal duyarlılık test kılavuzunda da yalnızca *Candida* türleri için bilgi olup, *Trichosporon* türleri için herhangi bir açıklama yoktur (8).

Bazı yazarlar, broth mikrodilüsyon yönteminin, farklı klinik kökenlerinde MİK varyasyonlarının dar olması nedeniyle amfoterisin B'ye dirençli izolatları saptamada yeterli olmadığını belirtmektedirler. Bu nedenle MİK breakpoint değerleri, amfoterisin B için saptanamamıştır. Etest yönteminin amfoterisin B'ye karşı duyarlılığın saptanmasında, CLSI yöntemine alternatif olarak faydalı olabileceği belirtilmektedir (8).

### **2.11.Trichosporonozda Tedavi:**

Trikosporonozda, amfoterisin B ile antifungal tedavi tartışmalıdır. Laboratuvar çalışmaları *Trichosporon* kökenlerinin bu ilaca karşı çoğunlukla dirençli olduğunu göstermektedir. Bazı kökenler güvenli serum ilaç konsantrasyonları ile inhibe edilebilmesine rağmen, nötropenik hastalarda fungusidal aktivite gösterilememiştir (8).

Amfoterisin B'nin, *Trichosporon* türlerine karşı amfoterisin B, flukonazol ya da her ikisinin kombinasyonu ile klinik başarısızlıklar rapor edilmektedir ve genellikle nötropeni varlığında sonuç umut verici değildir (7). *T. asahii*'nin çoklu dirençli doğası nötropenik

olmayan hastalar için de bir tehdit oluşturmaktadır. Amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol ve flusitosin dirençli bir kökenin nötropenik olmayan hastalarda nozokomiyal yayılımı rapor edilmiştir (21). Yeni triazoller *Trichosporon* türlerine karşı flukonazolden daha etkin görünmektedir. Vorikonazol Akut Myeloid Lösemili (AML) bir hastada görülen dissemine *T asahii* enfeksiyonunda başarı ile kullanılmıştır (7).

Ekinokandinlerin ise *Trichosporon* türlerine karşı aktivitesi zayıftır ve trikosporoz tedavisinde tavsiye edilmemektedirler. Ekinokandinlerle tedavi edilen hastalarda, breakthrough *Trichosporon* enfeksiyonları rapor edilmektedir (8).

*In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, vorikonazolün dissemine *Trichosporon* enfeksiyonu olan akut lösemi ve myelodisplastik sendromlu hastaların tedavisinde faydalı olduğunu göstermektedir (8). Paphitou ve ark. (94) trikosporoz tedavisinde yeni triazollerin (vorikonazol, ravukonazol, posakonazol) amfoterisin B'ye göre daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada *Trichosporon* kökenlerinin virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. *Trichosporon* Kökenleri ve İdentifikasyonu

Bu çalışmada daha önce sekans analizi (IGS1 bölgesi) yapılmış ve genotip 1 ve 3 olarak belirlenmiş *T. asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin ve antifungal ajanlara duyarlılığın belirlenmesi amaçlandı.

1997- 2007 yılları arasında hastanemizde yatan hastaların idrar, kan ve plevra sıvısı örneklerinde üremiş olan ve etken olduğu düşünülen 21 köken bu çalışmada kullanıldı. %10 gliserin içeren Sabouraud dextrose sıvı besiyerinde -20°C’de saklanan kökenler, çalışma öncesinde, canlandırma ve saflığın sağlanması amacıyla Sabouraud Dekstroz Agar (SDA; Oxoid) besiyerine pasaj yapıldı. Plaklar 35°C’de 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen mikroorganizmalar tekrar SDA besiyerine pasaj yapıldı. 48 saatlik inkübasyonun sonunda kökenlerin saflığından emin olunduktan sonra identifikasyon amacıyla koloni görünümü, mısır unlu tween 80’li agar besiyerinde morfolojik özellikleri, üreaz aktivitesi, karbonhidratları asimilasyon paternleri (API ID 32 C (bioMerieux, France)) değerlendirildi. *Trichosporon asahii* olarak tanımlanan kökenler çalışmaya alındı.

#### 3.2. Kökenlerin Virülans Özelliklerinin Belirlenmesi

##### Asit Proteinaz Aktivitesinin Tayini

Proteinaz aktivitesinin ölçümünde plak yöntemi uygulandı (95). SDA’da üretilen kolonilerden Yeast extract pepton dextrose (YEPD) sıvı besiyerine (Ek:1) pasaj yapıldı. 30°C’de 4 saat inkübasyon sonrasında McFarland 0.5 yoğunluğunda süspansiyon elde edildi. Bu süspansiyondan 10 µL alınarak tek azot kaynağı olarak %1 oranında sığır serum albümini içeren pH:5.0 olan katı besiyeri (Ek:2) üzerine yerleştirilmiş 6 mm çapındaki steril kağıt diskler (Whatman No 2) üzerine damlatıldı. Yedi gün süreyle 30°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda proteinin parçalanması ile lizis zonunun oluşup

oluşmadığına bakıldı. Bu şekilde proteolitik aktivitesi olan kökenler belirlenmeye çalışıldı. Deney her köken için 3 kez tekrarlandı. Pozitif kontrol olarak *C albicans* CBS 2730, *C albicans* ATCC 10231 kökenleri kullanıldı.

### **Fosfolipaz Aktivitesinin Tayini**

Price ve ark.'nın, Samaranyake tarafından modifiye edilen yöntemi kullanıldı (41, 42). SDA'da 48 saat inkübasyon sonucu üreyen kolonilerden steril serum fizyolojik içinde McFarland 0.5 yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. %8 oranında yumurta sarısı içeren pH:4.3 olan besiyerine (Ek:3) kalibre öze ile (0.01 mL) yüzeye değdirilmek suretiyle ekim yapıldı. 37°C'de 4 gün süreyle inkübe edildikten sonra lizis zonu değerlendirildi. Fosfolipaz aktivitesi (Pz değeri) koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı. Pz aktivitesi 1 olanlar fosfolipaz aktivitesi olumsuz, <1 olanlar olumlu olarak değerlendirildi. Deney her köken için 3 kez tekrarlandı. Pozitif kontrol olarak *C albicans* CBS 2730, *C albicans* ATCC 10231 kökenleri kullanıldı.

### **Esteraz Aktivitesinin Tayini**

Bu amaçla Tween 80 içeren ve pH:6.8 olan katı besiyeri (Ek:4) kullanıldı (96). SDA'da 48 saat inkübasyon sonucu üreyen kolonilerden steril eküvyon dokundurularak alındı, tween 80 içeren katı besiyerine daire şeklinde (yaklaşık 10 mm çapında) ekim yapıldı. Plaklar 30°C'de 10 gün süreyle inkübe edildi, her gün arkadan ışık verilerek incelendi. Tween 80 agarda inokülasyon bölgesinin etrafında tween 80'in hidrolizi sonucu ortaya çıkan yağ asidinin kalsiyum ile birleşerek opak kristaller halinde çökmesi pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirildi. Deney her köken için 3 kez tekrarlandı.

### **Yüzey Hidrofobisite Deneyi (Polistiren Mikroüre Yöntemi)**

Maya yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi için Hazen ve ark.'nın polistiren mikroüre yöntemi uygulandı (97). SDA'da üreyen kolonilerden 250 mL'lik erlenmayer içindeki 500 mM galaktoz içeren 50 mL YNB (Ek:5) besiyerine pasaj yapıldı. Çalkalayıcı etüvde 37°C sıcaklıkta, 48 saat süreli iki inkübasyon sonrasında elde edilen süspansiyon 2500 devirde, 4°C'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek soğuk 0.05 M sodyum fosfat

tampon çözeltisi (pH:7.2) ile 3 kez yıkandı. Elde edilen çökelti Thoma lamında sayılarak  $2 \times 10^6$  hücre/mL olacak şekilde sulandırıldı.

Hidrofobik ilişkiye uygun  $0.801 \pm 0.001$   $\mu\text{m}$  çapında, negatif yüklü polistiren lateks boncuklar (Sigma) kullanıldı. Stok boncukların 9  $\mu\text{L}$ 'si soğuk sodyum fosfat tampon çözeltisinin 1 mL'si ile sulandırılarak kabaca  $9.02 \times 10^8$  boncuk/mL'lik süspansiyon hazırlandı.

Hazırlanan soğuk maya süspansiyonundan 0.1 mL ve soğuk boncuk süspansiyonundan 0.1 mL alınarak elde edilen karışım hızla oda ısısına getirilecek 30 sn vorteks ile karıştırıldıktan sonra bir damla lam üzerine alınıp lamel kapatılarak 40x objektif ile incelendi. Her bir köken için 100 maya hücresi sayıldı. Maya hücrelerinin 3 veya daha fazla boncuk bağlanmış olanlarının yüzdesi hidrofobik özellik olarak belirlendi. Her bir köken için 3 kez tekrarlanarak, deneylerin ortalaması alındı. L.J.Douglas'dan alınmış adeziv özellikleri iyi bilinen *C albicans* GDH 2346 (Glasgow, UK) kökeni pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### **Epitel Hücrelerine Bağlanma Deneyi**

Kökenlerin adezyon özelliklerini belirlemek için, yanak mukoza hücrelerinden yararlanıldı (98). Aynı kişiden yanak iç kısmına steril eküvyon sürülerek epitel hücreleri toplandı, steril 0.1 M fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, pH:7.2) (Ek:6) çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Thoma lamında sayılarak  $1 \times 10^5$  epitel hücresi/mL olacak şekilde sulandırıldı.

SDA'da üreyen kolonilerden 250 mL'lik erlenmayer içindeki 500 mM galaktoz içeren 50 mL YNB besiyerine (Ek:5) pasaj yapıldı. Çalkalayıcı etüvde  $37^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, 48 saat süreli iki inkübasyon sonrasında elde edilen süspansiyon 2500 devirde  $4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika süreyle santrifüj edilecek 0.1 M PBS (Ek:6) ile 3 kez yıkandı. Elde edilen çökelti Thoma lamında sayılarak  $1 \times 10^7$  hücre/mL olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

Yoğunluğu ayarlanmış maya ve epitel hücreleri 0.1'er mL olacak şekilde karıştırıldı. Elde edilen karışım  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcı etüvde 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında por çapları 12  $\mu\text{m}$  olan şeffaf polikarbonat filtrelerden (millipore) süzülerek 60 mL 0.1 M PBS ile yıkandı. Böylece epitel hücreleri ve epitel hücrelerine

bağlı mayalar filtre üzerinde tutulurken bağlanamayanların porlardan süzülmesi sağlandı. Şeffaf filtre üzerine metanol döküldü, 15 dakika beklenerek tespit edildi. Kristal viyole ile boyandıktan sonra üzerine lamel kapatılarak 40x'lık objektifte incelendi. Her filtrede 100 epitel hücresi ve bunlara bağlanan maya hücreleri sayıldı. L.J.Douglas'dan alınmış adeziv özellikleri iyi bilinen *C albicans* GDH 2346 (Glasgow, UK) kökeni pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### **Modifiye Tüp Aderans Testi ile Slime Faktör Üretimini Tespiti**

*Trichosporon* kökenlerinin slime faktör üretilip üretilmediği, Christensen ve ark.'nın stafilokoklar için tanımladıkları yöntemin (99) *Candida*'lara uyarlanması ile geliştirilen modifiye tüp aderans yöntemi ile (100) test edildi.

SDA'da 35°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucu üreyen *Trichosporon* kökenlerinden bir öze dolusu alınarak cam deney tüplerindeki 10 mL Saboraud dekstrozu besiyerine (SDB) (%8 glikoz içeren) (EK:7) pasaj yapıldı. 35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası SDB yavaş biçimde dökülerek tüpler 5'er mL distile su ile iki kez yıkandı. Oluşan slime tabakasını göstermek üzere 5 mL kristal viyole boyası ile bir dakika süre ile boyandı. Havada kurutulan tüplerin iç çeperinde renkli, gözle görünür bir film tabakasının varlığı slime üretimi bakımından olumlu yorumlandı. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar zayıf pozitif (+), orta pozitif (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi.

### **3.3. *İn vitro* Antifungal Duyarlılık Testleri**

#### **CLSI'nin M27-A2 Referans Mikrodilüsyon Yöntemi**

Farklı hastalara ait 21 *Trichosporon asahii* izolatının amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin duyarlılığı CLSI'nin referans mikrodilüsyon yöntemi (M27-A2) (87) ile incelendi. Değerlendirmeler 24. ve 48. saatlerde yapıldı.

#### **Antifungal Stok Solüsyonların Hazırlanması**

Amfoterisin B (Sigma Chemical Co.), flukonazol (Pfizer S.A.), itrakonazol (Janssen S.A.), vorikonazol (Pfizer S.A.), kaspofungin (Merck Pharmaceutical Co. Ltd.)

ham maddeleri üretici firmadan temin edilmiş olup, -20°C’de derin dondurucuda toz halinde saklandı. Amfoterisin B, itrakonazol ve vorikonazol stok solüsyonları dimetilsülfoksit (DMSO; Merck) içinde, flukonazol ve kaspofungin stok solüsyonları ise steril distile su içinde çözülerek hazırlandı. Amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin stok solüsyonları 1600 µg/mL, flukonazol stok solüsyonu ise 5120 µg/mL konsantrasyonda hazırlanarak 1’er mL hacimde ependorf tüplere dağıtılarak kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

### **Besiyerinin Hazırlanması**

CLSI’ın referans yönteminde önerilen sentetik besiyeri olan L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren, sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Angus) son konsantrasyonu 0.165 mol/L olacak şekilde 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS; Sigma) ile tamponlanarak hazırlandı. Besiyerinin pH’sı 1 M NaOH ile 6.9-7.1’e ayarlandı (Ek:8).

### **Antifungal İlaç Dilüsyonlarının Hazırlanması**

İlaç dilüsyonları CLSI’ın M27-A2 Mikrodilüsyon yöntemi (87) esas alınarak amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin için 0.06-32 µg/mL, flukonazol için ise 0.25-128 µg/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı ve U tabanlı steril mikroplate’lere 100’er µL hacimde dağıtıldı. Kullanılana kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

### **Maya Süspansiyonunun Hazırlanması**

SDA’da üreyen kolonilerden öze ile alınarak 5 mL steril serum fizyolojik içinde süspanse edildi. Süspansiyonun bulanıklığı 530 nm dalga boyunda filtre kullanılarak spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 20 D, ABD) ile ayarlandı. Bu şekilde  $1-5 \times 10^6$  hücre/mL içeren maya stok solüsyonu hazırlanmış oldu. Bu stok solüsyon RPMI 1640 sıvı besiyeri (Ek:8) ile 1/2000 oranında sulandırılarak  $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$  hücre/mL içeren maya süspansiyonu elde edildi.

## **Maya Süspansiyonunun Antifungal İlaç Dilüsyonlarına Eklenmesi**

Antifungal ilaç dilüsyonlarının dağıtıldığı mikropate çukurcuklarına 100'er µL maya süspansiyonundan eklendiğinde iki kat daha dilüsyon sağlanarak  $0.5-2.5 \times 10^3$  hücre/mL yoğunluk elde edildi. Antifungal ilaç dilüsyonları ise amfoterisin B, itrakonazol ve vorikonazol için 0.03-16 µg/mL, flukonazol için ise 0.12-64 µg/mL arasında dağılım gösterdi.

35°C'de 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda çukurcuklarda oluşan bulanıklık antifungal ilaç dilüsyonu içermeyen çukurcuktaki (üreme kontrolü) üreme ile karşılaştırılarak gözle değerlendirildi. Amfoterisin B için bulanıklığın tamamen ortadan kalktığı en düşük ilaç konsantrasyonu (MİK-0), azoller ve kaspofungin için ise bulanıklıkta %50 oranında azalmanın olduğu ilaç konsantrasyonu (MİK-2) minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlendi.

Çalışmaya kalite kontrol kökenleri olarak *C parapsilosis* ATCC 22019 ve *C krusei* ATCC 6258 dahil edildi.

### **E test Yöntemi**

Amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin ve posakonazol duyarlılığı E test yöntemi ile incelendi.

### **Antifungal şeritler**

Amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin ve posakonazol için E test stripleri (AB Biodisk, Sweden), kullanılabildiği kadar -20°C derin dondurucuda saklandı.

### **Besiyeri**

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlanan MOPS tamponlu, % 1.8 glikoz ve % 1.8 agar içeren RPMI 1640 sentetik besiyeri (Ek:9), 15 cm çaplı petri kutularına 60 mL hacimde dağıtıldı.



## **Yöntem**

Steril serum fizyolojik içinde McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan maya süspansiyonu steril eküvyonla besiyeri üzerine homojen olarak yayıldı. Yaklaşık 15 dakika kuruması beklendikten sonra üzerine E test şeritleri yerleştirildi. 35°C’de 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda değerlendirildi. Oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun şerit üzerinde karşılığı olan en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. Değerlendirmeler 24. ve 48. saatlerde yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Genotip 1 ve 3 *Trichosporon asahii* kökenlerinin plak yöntemi ile asit proteinaz aktivitesi, fosfolipaz aktivitesi, Tween 80 agarda ise esteraz aktivitesi araştırıldı. *Trichosporon* kökenlerinin tümünde asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesinin negatif olduğu, esteraz aktivitesinin ise pozitif olduğu saptandı (Tablo-4, 5).

**Tablo-4: *T asahii* Kökenlerinin Genotip ve Virülans Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

İzolat No	Materyal	Genotip	Proteinaz	Fosfolipaz	Esteraz	Hidrofobisite (%)	Adezyon*	Slime Oluşumu**
2988	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	83	78	+
6704	Kan	1	Negatif	Negatif	Pozitif	89	141	++
8153	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	95	120	+
8259	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	91	287	+
10990	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	100	271	++
11052	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	79	241	++
12668	İdrar	3	Negatif	Negatif	Pozitif	100	53	+++
12828	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	76	129	++
13389	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	99	164	++
13637	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	83	239	+
13678	Plevra sıvısı	1	Negatif	Negatif	Pozitif	98	266	+++
13836	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	98	140	+
14861	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	95	219	++
14904	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	100	145	++
15793	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	94	66	++
16048	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	100	51	++
17416	İdrar	3	Negatif	Negatif	Pozitif	97	170	++
17430	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	100	53	+
19162	İdrar	3	Negatif	Negatif	Pozitif	99	76	+++
21830	İdrar	3	Negatif	Negatif	Pozitif	98	234	+++
21880	İdrar	1	Negatif	Negatif	Pozitif	99	96	++

\* Her filtrede 100 epitel hücresine bağlanan maya hücre sayısı, \*\* + zayıf pozitif, ++ orta pozitif, +++ kuvvetli pozitif

**Tablo-5: *T asahii* Kökenlerinin Virülans Özellikleri**

	Proteinaz	Fosfolipaz	Esteraz	Hidrofobisite	Adezyon	Slime		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	Zayıf n (%)	Orta n (%)	Kuvvetli n (%)
<b>Negatif</b>	21 (100)	21 (100)	0	0	0	0	0	0
<b>Pozitif</b>	0	0	21 (100)	21 (100)	21 (100)	6 (28.6)	11 (52.4)	4 (19)

Polistiren Mikroküre Yöntemi ile *Trichosporon asahii* kökenlerinin yüzey hidrofobisite özellikleri %76-100 arasında belirlendi (Tablo-4). Epitel hücrelerine bağlanma deneyi ile adezyon özellikleri %51-287 arasında saptandı (Tablo-4). Tüp Aderans Yöntemi ile kökenlerin %28.6'sının zayıf düzeyde, %52.4'ünün orta düzeyde, %19'unun kuvvetli düzeyde slime oluşturduğu belirlendi (Tablo-4, 5).

Referans mikrodilüsyon yöntemi ile 24. ve 48. saatte okunan amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin MİK değerlerinde *Trichosporon asahii* kökenlerinin üreme hızları nedeniyle farklılıklar olabildiği görüldü (Tablo-6). Mikrodilüsyon referans yöntemi ile amfoterisin B MİK aralığının dar olduğu (2-8 µg/mL) tespit edildi (Tablo-6, 7). İzolatların tümünün amfoterisin B MİK değerlerinin  $\geq 2$  µg/mL olduğu görüldü (Tablo-6).

**Tablo-6: *T asahii* Kökenlerinde Mikrodilüsyon Yöntemi ile Belirlenen MİK Değerleri**

İzolat No	Genotip	Amfoterisin B (µg/mL)		Flukonazol (µg/mL)		İtrakonazol (µg/mL)		Vorikonazol (µg/mL)		Kaspofungin (µg/mL)	
		24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat
2988	1	1	2	2	2	0.5	0.5	0.125	0.125	16	16
6704	1	2	4	1	1	0.25	0.5	0.032	0.125	16	16
8153	1	1	2	4	8	0.064	0.125	0.064	0.064	16	16
8259	1	1	2	8	8	0.125	0.125	0.125	0.125	16	16
10990	1	0.5	2	2	2	0.25	0.5	0.064	0.032	16	16
11052	1	1	2	4	4	0.25	0.125	0.064	0.064	16	16
12668	3	2	8	2	2	0.5	0.5	0.125	0.125	16	>16
12828	1	1	2	32	32	0.125	0.125	0.032	0.064	16	16
13389	1	2	2	4	2	0.25	0.25	0.125	0.25	16	16
13637	1	0.25	2	4	2	0.5	0.5	0.064	0.125	16	16
13678	1	0.25	2	1	2	0.5	0.25	0.064	0.064	16	16
13836	1	0.25	2	2	4	0.5	0.25	0.064	0.125	16	>16
14861	1	1	2	2	2	0.25	0.25	0.064	0.125	16	>16
14904	1	1	2	2	2	0.5	0.25	0.064	0.125	16	16
15793	1	1	2	2	2	0.5	0.5	0.064	0.125	16	16
16048	1	1	2	32	32	0.5	0.5	0.032	0.064	16	16
17416	3	2	8	32	32	0.5	0.5	0.125	0.064	16	16
17430	1	1	2	32	32	0.5	0.5	0.125	0.125	16	16
19162	3	2	8	32	32	0.5	1	0.125	0.125	16	>16
21830	3	1	2	32	32	0.064	1	0.125	0.125	16	>16
21880	1	1	4	32	32	0.125	0.5	0.064	0.064	16	>16

**Tablo-7: *T asahii* Kökenlerinde E Test Yöntemi ile Belirlenen MİK Değerleri**

İzolat No	Genotip	Amfoterisin B (µg/mL)		Flukonazol (µg/mL)		İtrakonazol (µg/mL)		Vorikonazol (µg/mL)		Kaspofungin (µg/mL)		Posakonazol (µg/mL)	
		24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat	24.Saat	48.Saat
2988	1	0.032	0.5	2	4	1	2	0.032	0.064	>32	>32	1	2
6704	1	0.25	2	2	2	0.5	1	0.032	0.064	>32	>32	0.5	1
8153	1	0.016	0.064	16	>256	0.5	0.5	0.064	0.064	>32	>32	1	1
8259	1	0.032	0.064	16	>256	1	1	0.032	0.25	>32	>32	1	2
10990	1	0.008	0.016	2	2	0.25	0.5	0.032	0.032	>32	>32	0.5	0.5
11052	1	0.032	0.5	4	8	0.5	1	0.064	0.125	>32	>32	1	1
12668	3	0.125	1	4	4	0.5	2	0.125	0.125	>32	>32	2	2
12828	1	0.064	0.064	2	4	0.25	0.5	0.064	0.064	>32	>32	0.25	0.5
13389	1	0.032	0.5	4	8	0.5	1	0.032	0.064	>32	>32	0.5	1
13637	1	0.032	0.25	8	8	1	1	0.064	0.064	>32	>32	1	1
13678	1	0.008	0.064	4	4	0.5	0.5	0.032	0.064	>32	>32	1	1
13836	1	0.016	0.25	4	8	1	1	0.032	0.064	>32	>32	1	1
14861	1	0.064	2	8	16	0.5	1	0.064	0.125	>32	>32	1	1
14904	1	0.032	1	4	8	1	1	0.064	0.125	>32	>32	1	1
15793	1	0.125	0.5	8	8	1	1	0.064	0.125	>32	>32	1	1
16048	1	0.064	1	8	8	0.5	0.5	0.064	0.125	>32	>32	0.5	0.5
17416	3	2	>32	4	4	1	1	0.064	0.064	>32	>32	1	1
17430	1	0.125	1	16	16	1	1	0.125	0.125	>32	>32	2	2
19162	3	0.032	0.064	8	16	1	1	0.125	0.125	>32	>32	1	1
21830	3	0.032	0.032	4	8	1	1	0.125	0.125	>32	>32	0.5	1
21880	1	0.064	0.125-1	8	16	1	1	0.25	0.25	>32	>32	1	2

Referans Mikrodilüsyon Yöntemi ile 48. saatte yapılan değerlendirmede azoller içerisinde en yüksek MİK değerleri flukonazole karşı saptandı (MİK aralığı: 1-32 µg/mL). En düşük MİK değerlerine ise vorikonazol ve itrakonazol duyarlılığında rastlandı. MİK aralıkları vorikonazol için 0.032-0.25 µg/mL, itrakonazol için ise 0.125-1 µg/mL olarak saptandı. E test yöntemi ile posakonazol MİK aralığı, 0.5-2 µg/mL olarak belirlendi (Tablo-8).

**Tablo-8: *T asahii* Kökenlerinde Mikrodilüsyon ve E Test Yöntemleri İle Antifungal Duyarlılık Sonuçları**

Antifungal İlaç	Yöntem	24 saat			48 saat		
		MİK aralığı (µg/mL)	MİK <sub>50</sub> (µg/mL)	MİK <sub>90</sub> (µg/mL)	MİK aralığı (µg/mL)	MİK <sub>50</sub> (µg/mL)	MİK <sub>90</sub> (µg/mL)
Amfoterisin B	Mikrodilüsyon	0.25-2	1	2	2-8	2	8
	E test	0.008-2	0.032	0.125	0.016->32	0.5	2
Flukonazol	Mikrodilüsyon	1-32	4	32	1-32	2	32
	E test	2-16	4	16	2->256	8	16
İtrakonazol	Mikrodilüsyon	0.064-0.5	0.5	0.5	0.125-1	0.5	0.5
	E test	0.25-1	1	1	0.5-2	1	1
Vorikonazol	Mikrodilüsyon	0.032-0.125	0.064	0.125	0.032-0.25	0.125	0.125
	E test	0.032-0.25	0.064	0.125	0.032-0.25	0.125	0.125
Kaspofungin	Mikrodilüsyon	16	16	16	16->16	16	>16
	E test	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Posakonazol	E test	0.25-2	1	1	0.5-2	1	2

MİK<sub>50</sub>: İzolatların %50'sinin üremesini inhibe eden ilaç konsantrasyonu

MİK<sub>90</sub>: İzolatların %90'ının üremesini inhibe eden ilaç konsantrasyonu

CLSI Mikrodilüsyon yöntemi ve E test yöntemleri ile elde edilen MİK değerleri  $\pm 1$  dilüsyon aralığı esas alınarak karşılaştırıldı. Amfoterisin B MİK değerlerinin belirlenmesinde her iki yöntem arasındaki uyum oranı 24. saatte yapılan değerlendirmede %4.8, 48. saatte ise %28.6 olarak saptandı. Her iki yöntemle de kaspofungin direncinin kolaylıkla belirlendiği görüldü. Vorikonazol ise uyumun en yüksek olduğu azol antifungal ajan olup, 24 ve 48. saatlerde yapılan değerlendirmelerde, uyum oranları sırasıyla %81 ve %85.7 olarak belirlendi (Tablo-9).

**Tablo-9: CLSI Mikrodilüsyon Yöntemi ve E Test Yöntemleri İle Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması ( $\pm 1$  Dilüsyon Aralığı Esas Alındığında), Uyum % Oranları**

Antifungal İlaç	Uyum (%)	
	24.Saat	48.Saat
<b>Amfoterisin B</b>	4.8	28.6
<b>Flukonazol</b>	52.4	47.6
<b>İtrakonazol</b>	81	52.4
<b>Vorikonazol</b>	81	85.7
<b>Kaspofungin</b>	100	100

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *Trichosporon asahii* kökenlerinde virülans faktörlerinin varlığı araştırılmış, asit proteinaz ve fosfolipaz enzimi üretimine rastlanmamıştır. Ichikawa ve ark.'nın (101) 61, Dağ ve ark.'nın (14) 48 ve Sun W. ve ark.'nın (102) 23, Demir ve ark.'nın (103) 24 *T asahii* kökeni ile yaptıkları çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

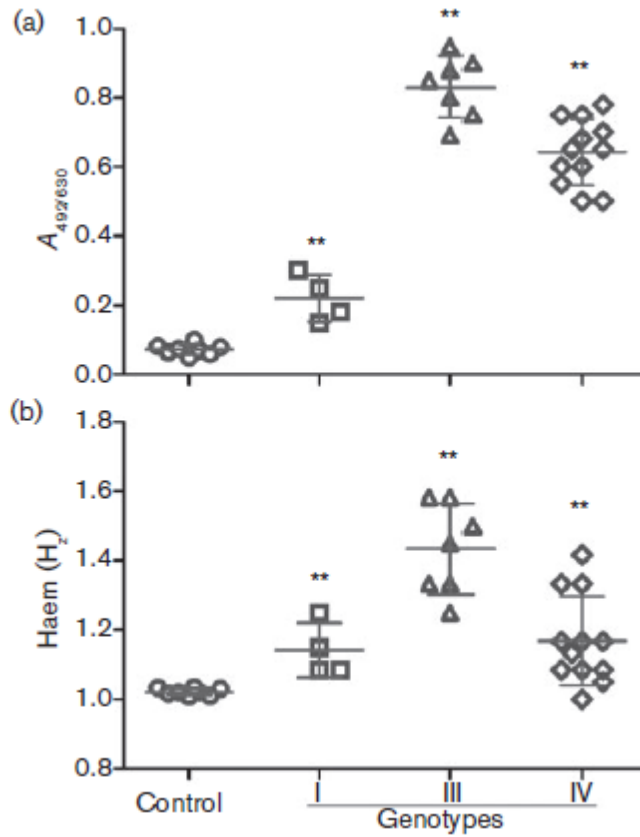
Virülans faktörü olarak esteraz aktivitesi araştırıldığında ise tüm *Trichosporon* kökenlerinde esteraz aktivitesinin pozitif olduğu; elde edilen sonuçların Dağ ve ark. (14), Demir ve ark.'nın (103) sonuçları ile uyumlu olduğu saptanmıştır. İnsan derisinin stratum korneum tabakasında, esteraz enziminin substratları olan monoaçilgliserol ve triaçilgliserol gibi moleküllerin yüksek oranda bulunması, bu enzimin patogeneizde rol alabileceğini düşündürmektedir (104).

*Trichosporon* kökenlerinin yüzey hidrofobisite özellikleri polistren mikroküre yöntemi ile belirlenmiştir. Kökenlerin %76-100 arasında yüzey hidrofobisite özelliği gösterdiği saptanmıştır. Dağ ve ark.'nın (14) çalışmasında da benzer sonuçlar edilmiş olup, klinik izolatlarda %70.4-92.7 arasında hidrofobisite özelliği saptanmıştır.

Çalışmamızda *T asahii* kökenlerinin adezyon özellikleri, epitel hücrelerine bağlanma deneyi ile araştırılmış, epitel hücrelerine bağlanma oranının %51-287 arasında değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Literatürde *Trichosporon* kökenlerinde bu konu ile ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

*Trichosporon* kökenlerinin biyofilm oluşturma özellikleri tüp aderans yöntemi ile araştırılmış olup; %28.6'sının zayıf düzeyde, %52.4'ünün orta düzeyde, %19'unun kuvvetli düzeyde slime oluşturduğu belirlenmiştir. Dağ ve ark.'nın (14) çalışmasında ise 48 *Trichosporon asahii* kökeninin 28'inde (%58.3) slime üretimi pozitif bulunurken, 20 kökenin slime oluşturmadığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda 21 *T. asahii* kökeninden Genotip 3 olduğu bilinen 3 *T. asahii* kökeninin kuvvetli düzeyde slime oluşturduğu saptanmıştır. Sun W. ve ark. (102) 23 *T. asahii* kökeninde biyofilm oluşumu ve hemolitik aktiviteyi araştırdıklarında, Genotip 3 kökenlerin, diğer genotiplerle karşılaştırıldığında (Genotip 1 ve 3), biyofilm oluşturma ve hemolitik aktivite açısından daha patojen göründüklerini belirtmişlerdir (Şekil 4). Ancak az sayıda kökende ortaya konulan bu hususu açıklamak için, IGS sekans analizi gibi moleküler yöntemlerle genotip özellikleri belirlenmiş kökenlerde virülans faktörlerinin araştırılacağı ek çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil-4 Farklı *T. asahii* genotiplerinde biyofilm oluşumu ve hemolizin üretimi (102)  
(a) Biyofilm oluşumu, (b) Hemolizin üretimi

Çalışmamızda Genotip 1 ve 3 *T. asahii* kökenlerinin antifungal ajanlara duyarlılıkları CLSI M27-A3 mikrodilüsyon ve Etest yöntemleri ile araştırıldı. *Candida* ve *Cryptococcus* türleri için CLSI M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi referans yöntem olarak

tanımlanmıştır, duyarlılık sınır değerleri belirlenmiştir (15). Ancak *T asahii* kökenleri için henüz bir standardizasyon söz konusu değildir.

CLSI M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen amfoterisin MİK aralıklarının dar olması, değerlendirme güçlüklerine neden olmaktadır. Bazı araştırmacılar amfoterisin B duyarlılığının belirlenmesinde CLSI yöntemi yerine ticari bir agar yöntemi olan E test yönteminin alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmektedirler (8). Bu çalışmada ise bu görüşün aksine referans mikrodilüsyon yöntemi ile amfoterisin B MİK değerleri kökenlerin tümünde  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  saptanmasına karşın; Etest yöntemi ile yalnızca 3 kökende  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir. Sınır MİK değeri  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olarak düşünüldüğünde, kökenlerin duyarlılıklarının belirlenmesinde, Etest yöntemi ile elde edilen MİK değeri sonuçlarının çelişkili olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda amfoterisin B için 24. ve 48. saatlerde okunan MİK değerleri arasında belirgin farklılık saptanmıştır. *Trichosporon* kökenlerinin üreme hızlarının *Candida* kökenlerine göre daha yavaş olması nedeniyle, 48. saatte yapılacak okumanın 24. saate göre daha doğru sonuç vereceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda *Trichosporon* kökenlerinin tümünde amfoterisin B MİK değerinin  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olduğu saptanmıştır. Rodrigues-Tudella ve ark. (9), EUCAST tarafından önerilen yöntem ile benzer sonuçlar ele etmişlerdir. 15 *Trichosporon* kökeninde amfoterisin B MİK değerinin  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olduğunu, kökenlerin tümünün *in vitro* olarak amfoterisin B'ye dirençli olduğunu göstermişlerdir. Arıkan ve Hasçelik (93), artmış amfoterisin B MİK değerlerini 43 *T asahii* kökeninde rapor etmişlerdir.

Bazı araştırmacılar *T asahii* dışındaki *Trichosporon* izolatlarının *T asahii* kökenleri ile karşılaştırıldığında amfoterisin B MİK değerlerinin daha düşük olduğunu belirtmektedirler (9, 94). Rodrigues-Tudella ve ark. (9) antifungal duyarlılık araştırdıkları *T asahii* kökenlerinde (n:15) amfoterisin B MİK değerlerinin  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde *T coremiiforme* (n:2) ve *T faecale* (n:4) kökenlerinin de amfoterisin B MİK değerlerinin yüksek olduğunu saptamalarına karşın test ettikleri diğer *Trichosporon* türlerinde (n:28), amfoterisin B MİK değerlerinin  $< 1$   $\mu\text{g/mL}$  olduğunu belirlemişlerdir. Aynı şekilde, Paphitou ve ark. (94) her ne kadar *in vivo* olarak



doğrulanmamış olsa da *Trichosporon* izolatlarının *T asahii* izolatları ile karşılaştırıldığında, *in vitro* olarak amfoterisin B MİK değerlerinin daha düşük olduğunu belirtmektedirler.

Klinik bir örnekten izole edilen *Trichosporon* kökeninin doğru identifikasyonu bu yüzden önemlidir. Farklı türler farklı antifungal duyarlılık paternine sahip olabilirler (7, 9, 94). *T asahii*, *T coremiiforme*, *T faecale* olarak tanımlanan bir klinik izolat *in vitro* olarak amfoterisin B direnci gösterirken, diğer *Trichosporon* türlerinin amfoterisin MİK değerlerinin daha düşük olması mümkün görünmektedir. Ancak bu hususta bir kanıya varılabilmesi için verilerin başka çalışmalarla da desteklenmesi gerekir. Herşeyden önce *in vivo-in vitro* uyumu gösterecek klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

*Trichosporon* enfeksiyonlarının tedavisinde amfoterisin B kullanımı bu laboratuvar verileri eşliğinde tartışmalıdır. *In vitro* duyarlılık çalışmaları *Trichosporon* izolatlarının pek çoğunun amfoterisin B'ye dirençli olabileceğini göstermektedir. Güvenilir ilaç serum konsantrasyonlarında bazı izolatlar inhibe edilebilmektedir. Ancak nütropenik hastalarda fungusidal aktivite sağlanamamaktadır (4). Dissemine trikosporozda mortalite oranı %80'in üzerindedir. İnvazif enfeksiyon gelişen ve amfoterisin B ile tedavi edilen 25 nütropenik hastanın yalnızca dördünde başarılı sonuç alınmıştır (105). Girmenia ve ark. (106) altta yatan hematolojik bir hastalığı olup invazif *Trichosporon* enfeksiyonu gelişen ve amfoterisin B ile tedavi edilen 55 hastanın tedavi sonuçlarını değerlendirmişler, sadece 13 (%24) hastada tedavide başarı sağlanabildiğini belirtmişlerdir. Kanser hastalarında nütropeniden çıkış ile birlikte klinik başarı da artmaktadır. Kullanılan antifungal ilaç dışında konağın enfeksiyona karşı immün yanıtı da büyük önem taşımaktadır (8).

Bu çalışmada flukonazol için yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Bu bulgu literatürle uyumludur. *T asahii* kökenlerinde triazol grubu antifungallerin *in vitro* etkileri karşılaştırıldığında flukonazol en düşük aktivite gösteren triazol grubu antifungal ilaçtır (26, 40, 93, 107). Arıkan ve Haşçelik (93) flukonazol ve itrakonazole karşı orta düzeyde duyarlılığı 43 *T asahii* kökeninde rapor etmişlerdir.

*T mucoides*, *T inkin*, *T ovoides* gibi diğer *Trichosporon* türleri, *T asahii* ya da *T cutaneum*'a göre flukonazole karşı daha duyarlı gözükmektedirler (90). *In vitro* duyarlılık testlerinde flukonazol MİK değeri düşük saptanan *T asahii* kökenlerinin etken olduğu

enfeksiyonlarda, flukonazol ile tedavi her zaman klinik başarı anlamına gelmemektedir (94).

Bu çalışmada *in vitro* olarak en etkili ilaç olarak vorikonazol saptanmıştır. Vorikonazol ve itrakonazol için düşük MİK değerleri saptanmıştır. Bu bulgu literatürle uyumludur. Klinik ve *in vitro* çalışmalar azollerin özellikle de vorikonazol ve posakonazolün *Trichosporon* türlerine karşı en etkili ajan olduklarını göstermektedir (7, 22, 28, 90, 94, 105, 107, 108).

Çalışmamızda E test yöntemi ile saptanan posakonazol MİK değerleri vorikonazole kıyasla biraz yüksek olmakla beraber genel olarak kökenler posakonazole duyarlı gözükmektedir.

Farklı çalışmalarda *T asahii* kökenleri için 48 saatlik inkübasyon sonrası MİK-2 okuma skoru ile flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol için elde edilen *in vitro* duyarlılık test sonuçları Tablo-11'de gösterilmiştir (26, 93, 94, 107, 109, 110).

*T asahii* dışındaki *Trichosporon* kökenlerinin, *T asahii* kökenlerine göre, flukonazol ve itrakonazole karşı *in vitro* olarak daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak yeni triazollere karşı aktivite incelendiğinde her ikisinin benzer düzeyde olduğu saptanmıştır (94).

Triazol grubu antifungaller, *Trichosporon* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen ilaçlardır (28). Kobaylarda *T asahii* ile oluşturulan invazif trikosporoz olgularının tedavisinde amfoterisin B'ye kıyasla vorikonazolün daha etkin olduğu, doku hasarının düzelmesini ve yaşam süresinin uzamasını sağladığı bildirilmektedir (111). Vorikonazolle başarılı bir şekilde tedavi edilen invazif trikosporoz olgu sunumları literatürde bulunmaktadır (28, 108, 112). Amfoterisin B ile tedavisi başarısızlıkla sonuçlanan ve vorikonazol ile tedavi edilen olgu sunumları da mevcuttur (108).

Çalışmamızda kaspofungin için yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Bu bulgu da literatürle uyumludur. Ekinokandin grubu antifungal ilaçlar *Trichosporon* türlerine *in vitro* aktivite açısından yetersizdir (7, 22, 6, 107, 108), *Trichosporon* enfeksiyonlarının

tedavisinde önerilmemektedir. Literatürde ekinokandin grubu antifungal ilaç ile tedavi altında iken gelişen *Trichosporon* enfeksiyonları da bildirilmektedir (113, 114).

**Tablo-11: Triazol Grubuna Karşı *T asahii* Suşları İçin Saptanan *İn Vitro* Duyarlılık Sonuçları ve Bizim Bulgularımızın Karşılaştırılması (MİK-2, 48 Saat)**

Yazarlar	İzolat sayısı	Parametre	Flukonazol (µg/mL)	İtrakonazol (µg/mL)	Vorikonazol (µg/mL)
Thompson ve ark.(109)	40	MİK Aralığı	0.25->64	-	0.06-0.5
		MİK <sub>50</sub>	1	-	0.25
		MİK <sub>90</sub>	2	-	0.25
Nanthawan ve ark.(110)	101	MİK Aralığı	4-64	0.5-2	0.05-0.25
		MİK <sub>50</sub>	8	1	0.125
		MİK <sub>90</sub>	64	1	0.25
Taj-Aldeen ve ark.(107)	15	MİK Aralığı	0.25-64	0.063-1	0.016-2
		MİK <sub>50</sub>	4	0.25	0.125
		MİK <sub>90</sub>	8	0.5	0.25
Kalkancı ve ark.(26)	87	MİK Aralığı	4-64	0.25-2	0.03-0.25
		MİK <sub>50</sub>	8	1	0.125
		MİK <sub>90</sub>	16	2	0.25
Arıkan ve ark.(93)	43	MİK Aralığı	0.25-16	0.06-4	-
		MİK <sub>50</sub>	2	0.5	-
		MİK <sub>90</sub>	8	1	-
Paphitou ve ark.(94)	24	MİK Aralığı	0.5->64	0.06->16	0.03->16
		MİK <sub>50</sub>	2	0.12	0.06
		MİK <sub>90</sub>	-	-	-
Bulgularımız	21	MİK Aralığı	1-32	0.125-1	0.032-0.25
		MİK <sub>50</sub>	2	0.5	0.125
		MİK <sub>90</sub>	32	0.5	0.125

Kaspofungin ve amfoterisin B'nin intrensek olarak *Trichosporon* spp.'ye karşı etkili olmadıkları düşünülmesine rağmen bir çalışmada test edilen neredeyse tüm *T. asahii* izolatlarında bu iki ilacın kombinasyonunun, sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır (115). Aynı durum bir ekinokandin olan mikafunginin amfoterisin B ile kombine edildiğinde de rapor edilmiştir (116). Serena ve ark. (117) *in vivo* fare modelinde mikafungin ve amfoterisin B kombinasyonunun dissemine trikosporozuza karşı etkili olduğunu; karaciğer, böbrek, dalak gibi iç organlarda fungal yıkımı önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Kaspofungin ve amfoterisin B kombinasyonunun gösterdiği sinerjik etkinin mekanizması açık değildir. Ekinokandinlerin amfoterisin B'nin hücre membranından içeri penetrasyonunu artırarak antifungal aktivite artışına neden oldukları ileri sürülmektedir (115).

Sonuç olarak *Trichosporon* kökenlerinin çoğunluğunun *in vitro* olarak amfoterisin B MİK değerlerinin yüksek olması sebebiyle, *Trichosporon* enfeksiyonlarının tedavisinde amfoterisin B kullanımı tartışmalıdır ve önerilmemektedir. Ekinokandinlerin ise *Trichosporon* kökenlerine karşı etkisiz olduğu saptanmıştır. Itrakonazol, vorikonazol, posakonazol gibi triazol grubu antifungal ilaçların ise, *Trichosporon* kökenlerine karşı *in vitro* olarak oldukça etkili oldukları gösterilmiştir. Bu sonuçlar eşliğinde amfoterisin B ve ekinokandinler, *Trichosporon* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmamalıdır. Triazololler ise tedavide ilk önerilecek ilaç olarak gözükmektedir.

Gelecekte *Trichosporon* türleri için identifikasyon ve antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyonun sağlanması, farklı *Trichosporon* türlerinin ve genotiplerinin oluşturduğu enfeksiyonlara ilişkin çalışmaların artması, yeni epidemiyolojik ve klinik verilerin elde edilmesi ile *Trichosporon* kökenleri ile oluşan enfeksiyonlarda optimal tedavi yaklaşımları belirlenecektir. Ancak tedavi başarısını belirleyecek en önemli faktörün konağın immünite durumu olduğu unutulmamalıdır.

## 6. EKLER

### 6.1. Yeast Eksrakt Pepton Dekstroz (YEPD) Sıvı Besiyeri:

Pepton.....	20 g
Maya özeti.....	10 g
Dekstroz.....	20 g
Distile su.....	1000 mL

Hazırlanan karışımdan tüplere 10'ar mL dağıtılarak otoklavda steril edilir.

### 6.2. %1 Sığır Serum Albumini İçeren Besiyeri:

Dekstroz.....	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.5 g
Agar .....	20 g
Distile su.....	900 mL

İçerik pH'sı 5'e ayarlanıp otoklavda steril edilir. Donmaması için 60°C ısıya ayarlanmış su banyosuna konur. Sığır albumini, por çapı 0.45 µm membran filtreden geçirerek steril edildikten sonra ana besiyerine %1 oranında eklenir. 7 cm çapındaki petri kutularına karışımdan 10'ar mL dökülerek donması beklenir.

### 6.3. %8 Yumurta Sarısı ve Sitrik Asit Disodyum Fosfat Tampon Solüsyonu İçeren Besiyeri

Sabauraud Dextrose Broth (Difco).....	7.5 g
NaCl (1 M) .....	14.625 g
CaCl <sub>2</sub> (0.005 M).....	0.14 g
Distile su.....	105 mL

İçerik beherde ısıtılarak karıştırılır. Üzerine 125 mL sitrik asit disodyum fosfat tampon çözeltisi konarak pH 4.3'e ayarlanır. %1.5 oranında agar eklenerek otoklavda steril edilir. Yumurta sarısı konmadan önce donmaması için steril olan ana besiyeri 60°C'lik su banyosunda tutulur. Steril koşullarda alınmış yumurta sarısı boncuklu balonda iyice karıştırılarak 500 devirde 15 dk çevrilir. Üst kısmından 20 mL alınarak ana besiyerine katılır. 9 cm çaplı petrilere 10'ar mL dökülerek dondurulur.

#### **Sitrik Asit Disodyum Fosfat Tampon Çözeltisi**

$\alpha$ - 0.1 M  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  ..... 5.25 g/125 mL

$\beta$ - 0.2 M  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ .....8.9 g/125 mL

a ve b çözeltileri uygun miktarlarda hafif ısıtıcılı karıştırıcıda karıştırılarak, pH'sı 4.2'ye ayarlanır (Toplam 125 mL olacak şekilde).

#### **6.4. Tween 80 İçeren Besiyeri**

Bacto peptone (BD Biosciences, Sparks, Md.).....10 g.  
NaCl.....5 g.  
CaCl<sub>2</sub>.....0.1 g.  
Agar.....15 g.  
Distile su.....1000 mL

Otoklavda steril edilir, yaklaşık 50°C iken 5 mL otoklav ile steril edilmiş Tween 80 (Sigma, St. Louis, Mo) eklenir. 9 cm çaplı petri plaklarına 25 mL hacimde dökülür. Besiyerinin son pH'sı 6.8'dir.

#### **6.5. Yeast Nitrogen Base (YNB) Besiyeri (500 mM Galaktoz İçeren) (pH:5.4)**

Galaktoz .....90 g  
Susuz YNB (Difco).....1.675 g  
Distile su.....1000 mL

250 mL'lik erlenmayer kaplara 50'şer mL dağıtılır. 100°C'de 30 dk. kaynatılarak steril edilir.

### **Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi (0.05 M) (pH:7.2)**

a-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....7.53 g/1000 mL

b-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....8.95 g/1000 mL

a ve b çözeltileri uygun miktarlarda karıştırılarak tampon çözelti hazırlanır.

### **6.6. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su, pH: 7.2 (PBS, 0.1 M)**

$\text{NaCl}$ ..... 8 g

$\text{KCl}$ ..... 0.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... 1.15 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 0.4 g

Distile su.....1000 MI

### **6.7. Saboraud Dekstroz Broth Besiyeri (%8 glikoz içeren)**

Pepton (Oxoid).....10 g

Distile su.....1000 mL

Glikoz.....80 g

Pepton ve 800 mL distile su karıştırılarak otoklavda steril edilir. 200 mL distile su içerisinde eritilen glikoz, 0.2 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edildikten sonra karışıma ilave edilir.

### **6.8. Mikrodilüsyon İçin MOPS Tamponlu RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması**

Toz halindeki 34.53 g MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid), 900 mL distile su içinde karıştırılarak eritilir. 1 M NaOH ilave edilerek, oda ısısında, pH'sı 7.0 olacak şekilde ayarlanır. Toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır. Bunun 800 mL'si, otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak steril edilir. Kalan 200 mL'si ise, 10.4 g toz halindeki RPMI besiyeri (L-glutamin ve fenol kırmızılı, bikarbonat içermeyen) eklendikten

sonra 0.2 µm por çaplı filtre ile süzülerek steril hale getirilir. İki solüsyonun karıştırılmasıyla hazırlanan besiyeri +4°C’de saklanır.

#### **6.9. E Test için MOPS Tamponlu RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması**

Toz halindeki 34.53 g MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid), 900 mL distile su içinde karıştırılarak eritilir. 1 M NaOH ilave edilerek, oda ısısında, pH’sı 7.0 olacak şekilde ayarlanır. Toplam hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanır. Bunun 450 mL’si içine, 10.4 g toz halindeki RPMI besiyeri (L-glutamin ve fenol kırmızılı, bikarbonat içermeyen) eklenir ve 0.2 µm por çaplı filtre ile süzülerek steril hale getirilir. Kalan 450 mL içi 18 g pürifiye agar (Oxoid) ve 18 g D-glikoz (Sigma) eklenir ve otoklavda 121°C’de 15 dakika tutularak steril edilir. Yaklaşık 45-50°C’da, iki solüsyon birbiri ile karıştırılır ve hazırlanan besiyeri 15 cm çaplı petri kutularına 25’er mL hacimde dağıtılır.



## 7. KAYNAKLAR

1. PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invazive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 133-163, 2007.
2. WARNOCK DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 48: 1-12, 2007.
3. ENER B. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak mantarlar. Editörler: USTAÇELEBİ Ş, TÜMBAY E. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, sayfa 1123-1128, 1999.
4. SEGAL BH, BOW EJ, MENICHETTI GF. Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. *Infectious Disease Clinical North America*, 16 (4): 935-964, 2002.
5. JAHAGIRDAR BN, MORRISON VA. Emerging fungal pathogens in patients with hematologic malignancies and marrow/stem-cell transplant recipients. *Seminars in Respiratory Infections*, 17(2): 113-120, 2002.
6. WALSH TJ, GROLL A, HIEMENZ J, FLEMING R, ROILIDES E, ANAISSIE E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 48-66, 2004.
7. PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4419-4431, 2004.
8. CHAGAS-NETO TC, CHAVES GM, COLOMBO AL. Update on the Genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*, 166 (3): 121-132, 2008.
9. RODRÍGUEZ-TUDELA JL, MELLADO E, CANO V, TAPIA C, PERKINS A, GOMEZ-LOPEZ A, RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (10): 4026-4034, 2005.
10. DIAZ MR, FELL JW. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the Genus *Trichosporon*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3696-3706, 2004.
11. AHMAD S, AL-MAHMEED M, KHAN ZU. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 639-646, 2005.

12. SUGITA T, IKEDA R, NISHIKAWA A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5467-5471, 2004.
13. YÜCEL A, KANTARCIÖĞLU AS. *Candida*'ların patojenik belirtgenleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 30 (3): 172-185, 2000.
14. DAĞ A, ÇERİKÇİÖĞLU N. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *Trichosporon asahii* suşlarında bazı virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 40: 225-235, 2006.
15. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition, M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute / 01-Jan-2008 / 40 pages
16. WOLF DG, FALK R, HACHAN M, THEELEN B, BOEKHOUT T, SCORZETTI G, SHAPIRO M, BLOCK C, SALKIM IF, POLACHECK I. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (12): 4420-4425, 2001.
17. PFALLER MA, DIEKEMA DJ, RINALDI MG, BARNES R, HU B, VESELOV AV, TIRABOSCHI N, NAGY E, GIBBS DL. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1735-1745, 2007.
18. MICELI MH, DIAZ JA, LEE SA. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11: 142-151, 2011.
19. GIRMENIA C, PAGANO L, MARTINO B, D'ANTONIO D, FANCI R, SPECCHIA G, MELILLO L, BUELLI M, PIZZARELLI G, VENDITTI M, MARTINO P; GIMEMA INFECTION PROGRAM. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (4): 1818-1828, 2005.
20. RASTOGI VL, NIRWAN PS. Invasive trichosporonosis due to *Trichosporon asahii* in a non-immunocompromised host: a rare case report. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25 (1): 59-61, 2007.
21. HAZEN KC, HOWELL SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. Editors: PFALLER MA, WARNOCK MA, MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, LANDRY ML, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Pres, Washington DC, page 1762-1781, 2007.
22. LI HM, DU HT, LIU W, WAN Z, LI RY. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. *Mycopathologia*, 160: 217-225, 2005.

23. LEAW SN, CHANG HC, SUN HF, BARTON R, BOUCHARA JP, CHANG TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 693-699, 2006.
24. MCMANUS EJ, BOZDECH MJ, JONES JM. Role of the latex agglutination test for Cryptococcal antigen in diagnosing disseminated infections with *Trichosporon beigelii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 151: 1167-1169, 1985.
25. SUGITA T, NAKAJIMA M, IKEDA R, MATSUSHIMA T, SHINODA T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5): 1826-1830, 2002.
26. KALKANCI A, SUGITA T, ARIKAN S, YUCESYOY M, ENER B, OTAG F, KIRAZ N, KUSTİMUR S, SANCAK B, EVCİ C, EMEKTAS G. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Medical Mycology*, 48 (1): 141-146, 2010.
27. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6): 1985-1993, 1999.
28. COLOMBO AL, PADOVAN AC, CHAVES GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4): 682-700, 2011.
29. RODRIGUEZ-TUDELLA JL, GOMEZ-LOPEZ A, ALASEZ-LOPEZ A, ALASTRUEY- IZQUIERDO A, MELLADO E, BERNAL-MARTINEZ L, CUENCA-ESTRELLA M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 58 (4): 435-440, 2007.
30. FILLER SG, SHEPPARD DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *Plos Pathogens*, 12 (2): 1099-1105, 2006.
31. KARKOWSKA-KULETA J, RAPALA-KOZIK M, KOZIK A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56 (2): 211-224, 2009.
32. MISHRA NN, PRASAD T, SHARMA N, PAYASI A, PRASAD R, GUPTA DK, SINGH R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (3): 201-235, 2007.
33. NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (3): 400-428, 2003.

34. CHAFFIN WL, LOPEZ-RIBOT JL, CASANOVA M, GOZALBO D, MARTINEZ JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1): 130-180, 1998.
35. ALBERTO B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Membrane structure, *Molecular Biology of the Cell*, 3<sup>rd</sup> ed. Garland Publishing Inc, New york, London, page 477-506, 1994.
36. GÜRCAN Ş. Kandidemi etkeni çeşitli *Candida* türlerinde virülansın *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi. Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2000.
37. ZHU W, FILLER SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 12 (3): 273-282, 2010.
38. BARRETTE-BEE K, HAYES Y, WILSON RG, RYLEY JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology*, 131: 1217-1221, 1985.
39. GHANNOUM MA. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 39: 55-59, 1998.
40. BANNO Y, YAMADA T, NOZAWA Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of the three enzymes and some biological properties. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 23 (1): 47-54, 1985.
41. SAMARANYAKE LP, RAESIDE JM, MACFARLANE TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 22: 201-207, 1984.
42. ENER B, BABACAN F, JOHANSSON CB. *In vitro* detection of phospholipase activity in *Candida* species. *Medical Bulletin*: 55-60, 1991.
43. ENER B, ESKİTÜRK A, AYDIN Ö, DELİALİOĞLU N, BEKİROĞLU N, QUINT W. Çeşitli *Candida albicans* izolatlarını suş düzeyinde tiplendirmede virülans faktörlerinin rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 30: 391-398, 1996.
44. ARIKAN S, SANCAK B, HASÇELİK G, GÜNALP A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Flora*, 3: 240-243, 1998.
45. CENGİZ AT. *Staphylococcus*. Editörler: USTAÇELEBİ Ş, TÜMBAY E. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, sayfa 339-347, 1999.
46. RAAD II. The pathogenesis and prevention of central venous catheter-related infections. *Middle East Journal of Anesthesiology*, 12: 381-403, 1994.
47. SHIN JE, KEE SJ, SHIN MG, KIM SH, SHIN DH, LEE SK, SUH SP, RYANG DW. Biofilm production by isolates *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1244-1248, 2002.

48. DOUGLAS LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology, 11: 30-36, 2003.
49. YÜCESOY M. *Candida* türlerinde slime üretiminin incelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 14: 65-70, 2000.
50. BONAVENTURA GD, POMPILIO A, PICCIANI C, LEZZI M, D'ANTONIO d, PICCOLOMINI R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: Development, architecture, and antifungal resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 3269-3276, 2006.
51. SHEEHAN, ESPINEL-INGROFF A, MOORE LS, WEBB CD. Antifungal susceptibility testing of yeasts: A brief overview. Clinical Infection Disease, 17: 494-500, 1993.
52. DE PAUW BE. Is there a need for new antifungal agents? Clinical Microbiology and Infection, 6: 23-8, 2000.
53. TÖRE O. Antifungal ilaçlar. Editör: KILIÇTURGAY K. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Bursa, sayfa 380-391,1994.
54. PURKINS L, WOOD N, GREENHALGH K, ALLEN MJ, OLIVER SD. Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. British Journal of Clinical Pharmacology, 56: 17-23, 2003.
55. MAERTENS JA. History of the development of azol derivatives. Clinical Microbiology and Infection, 10: 1-10, 2004.
56. DONNELLY JP, DE PAUW BE. Voriconazole - a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. Clinical Microbiology and Infection, 10: 107-117, 2004.
57. HERBRECHT R. Posaconazole: a potent, extended-spectrum triazole anti-fungal for the treatment of serious fungal infections. International Journal of Clinical Practice, 58: 612-624, 2004.
58. SABLE CA, NQUYEN BY, CHODAKEWITZ JA, DINUBILE MJ. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. Transplant Infectious Diseases, 4: 25-30, 2002.
59. PETTENGELL K, MYNHARDT J, KLUYTS T, LAU W, FACKLAM D, BUELL D, FK463 SOUTH AFRICAN STUDY GROUP. Successful treatment of oesophageal candidiasis by micafungin: a novel systemic antifungal agent. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 20: 475-481, 2004.
60. PFALLER MA. Anidulafungin: an echinocandin antifungal. Expert Opinion Investigational Drugs, 13: 1183-1197, 2004.

61. CALHOUN DL, ROBERTS GD, GALGIANI JN, BENNETT JE, FEINGOLD DS, JORGENSEN J, KOBAYASHI GS, SHADOMY S. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology*, 23: 298-301, 1986.
62. GALGIANI JN. Antifungal susceptibility tests. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 1867-1870, 1987.
63. PFALLER MA, BURMEISTER L, BARTLETT MS, RINALDI MG. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1437-1441, 1988.
64. PFALLER MA, RINALDI MG, GALGIANI JN, BARTLETT MS, BODY BA, ESPINEL-INGROFF A, FROMPTLING RA, HALL GS, HUGHES CE, ODDS FC. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1648-1654, 1990.
65. ESPINEL-INGROFF A, KISH CW JR, KREKREING TM, FROMPTLING RA, BARTIZAL K, GALGIANI JN, VILLAREAL K, PFALLER MA, GERARDEN T, RINALDI MG. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3138-3145, 1992.
66. DOERN GV, TUBERT TA, CHAPIN K, RINALDI MG. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 24: 507-511, 1986.
67. MAC KERROW SD, MERRY JM, HOEPRICH PD. Effect of buffers on testing of *Candida* species susceptibility of flucytosine. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 885-888, 1987.
68. TELLIER R, KRAJDEN M, GRIGORIEW GA, CAMPBELL I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1619-1625, 1992.
69. GALGIANI JN, RINALDI MG, POLAK AM, PFALLER MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30: 213-224, 1992.
70. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast: proposed standard M27-P. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1-22, 1992.
71. ESPINEL- INGROFF A, KREKREING TM, GOLDSON PR, SHADOMY S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1089-1094, 1991.

72. BARCHIESI F, COLOMBO AL, MCGOUGH DA, RINALDI MG. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standart. Journal of Clinical Microbiology, 32: 2494-2500, 1994.
73. PFALLER MA, GRANT C, MORTHLAND V, RHINE-CHALBERG J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology, 32: 506-509, 1994.
74. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Tentative standard M27-T. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1-29, 1995.
75. PFALLER MA, BARRY AL. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. Journal of Clinical Microbiology, 32: 1992-1996, 1994.
76. PFALLER MA, VU Q, LANCASTER M, ESPINEL-INGROFF A, FORHERGILL A, GRANT C, MCGINNIS MR, PASARELL L, RINALDI MG, STEELE-MOORE L. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. Journal of Clinical Microbiology, 32: 1625-1628, 1994.
77. PFALLER MA, MESSER SA, COFFMANN S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. Journal of Clinical Microbiology, 33: 1094-1097, 1995.
78. PFALLER MA, BALE M, BUSCHELMAN B, LANCASTER M, ESPINEL-INGROFF A, REX JH, RINALDI MG, COOPER CR, MCGINNIS MR. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. Journal of Clinical Microbiology, 33: 1104-1107, 1995.
79. PFALLER MA, BALE M, BUSCHELMAN B, LANCASTER M, ESPINEL-INGROFF A, REX JH, RINALDI MG. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for in vitro susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. Journal of Clinical Microbiology, 32: 1650-1653, 1994.
80. PFALLER MA, RINALDI MG. Antifungal susceptibility testing: Current state of technology, limitations and standardization. Infectious Disease Clinics of North America, 7: 435-444, 1993.
81. GHANNOUM MA, REX JH, GALGIANI JN. Susceptibility testing of fungi: Current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. Journal of Clinical Microbiology, 34: 489-495, 1996.

82. GRAYBILL JR, NAJVAR LK, HOLMBERG JD, LUTHER MF. Fluconazole treatment of *Candida albicans* infection in mice: Does in vitro susceptibility predict in vivo response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 2197-2200, 1995.
83. RUHNKE M, SCHMIDT-WESTHAUSEN A, ENGELMANN E, TRAUTMANN M. Comparative evaluative of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 3208-3211, 1996.
84. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27-A. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997:1-30.
85. LOZANO-CHIU M, NELSON PW, LANCASTER M, PFALLER MA, REX JH. Lot-to-lot variability of antibiotic medium 3 used for testing susceptibility of *Candida* isolates to amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 270-272, 1997.
86. LOZANO-CHIU M, PAETZNICK VL, GHANNOUM MA, REX JH. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. *J Clin Microbiol*, 36: 2817-2822, 1998.
87. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standart-second edition. NCCLS document M27-A2. Wayne, PA, 2002.
88. REX JH, PFALLER MA, RINALDI MG, POLAK A, GALGIANI JN. Antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 6: 367-381, 1993.
89. VANDENBOSSCHE I, VANDEVENNE M, DE BAERE T, VERSCHRAEGEN G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 918-921, 2002.
90. PFALLER MA, DIEKEMA DJ, BOYKEN L, MESSER SA, TENDOLKAR S, HOLLIS RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1875-1880, 2003.
91. KUŞTİMUR S, KALKANCI A, MANSUROGLU H, SENEL K. Evaluation of the disc diffusion method with a comparison study for fluconazole susceptibility of *Candida* strains. *Chinese Medical Journal*, 116: 633-636, 2003.
92. SEWELL DL, PFALLER MA, BARRY AL. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 2099-2102, 1994.



93. ARIKAN S, HASÇELİK G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43: 107-111, 2002.
94. PAPHITOU NI, OSTROSKY-ZEICHNER L, PAETZNICK VL, RODRIGUEZ JR, CHEN E, REX JH. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (4): 1144-1146, 2002.
95. CASSONE A, BERNARDIS F, MONDELLO F, CEDDIA T, AGATENSI L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 165 (5): 777-783, 1987.
96. SLIFKIN M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 4626-4628, 2000.
97. HAZEN KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 57: 1894-1900, 1984.
98. ENER B, DOUGLAS LJ. Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 78 (1): 37-42, 1992.
99. CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL, BEACHEY EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 28: 2870-2877, 1987.
100. BRANCHINI ML, PFALLER MA, RHINE-CALGBERG J, FREMPONG T, ISENBERG HD. Genotyping variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 452-456, 1994.
101. 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*. *Microbiology and Immunology*, 48 (4): 237-242, 2004.
102. SUN W, SU J, XU S, YAN D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1750-1757, 2012.
103. DEMİR F, KUŞTİMUR S. *Trichosporon* spp. suşlarında bazı virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48 (4): 628-638, 2014.
104. TSUBOI R, KOMATSUZAKI H, OGAWA H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infection and Immunity*, 64 (8): 2939-2940, 1996.

105. HOY J, HSU KC, ROLSTON K, HOPFER RL, LUNA M, BODEY GP. *Trichosporon beigelii* infection: a review. *Reviews of Infectious Diseases*, 8 (6): 959-967, 1986.
106. GIRMENIA C, PAGANO L, MARTINO B, D'ANTONIO D, FANCI R, SPECCHIA G, MELILLO L, BUELLI M, PIZZARELLI G, VENDITTI M, MARTINO P. GIMEMA Infection Program. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (4): 1818-1828, 2005.
107. TAJ-ALDEEN SJ, AL-ANSARI N, EL SHAFEI S, MEIS JF, CURFS-BREUKER I, THEELEN B, BOEKHOUT T. Molecular Identification and Susceptibility of *Trichosporon* Species Isolated from Clinical Specimens in Qatar: Isolation of *Trichosporon dohaense* Taj-Aldeen, Meis & Boekhout sp. Nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6): 1791-1799, 2009.
108. FOURNIER S, PAVAGEAU W, FEUILLHADE M, DEPLUS S, ZAGDANSKI AM, VEROLA O, DOMBRET H, MOLINA JM. Use of voriconazole to successfully treat disseminated *Trichosporon asahii* infection in a patient with acute myeloid leukaemia. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 21 (12): 892-896, 2002.
109. THOMPSON GR, WIEDERHOLD NP, SUTTON DA, FOTHERGILL A, PATTERSON TF. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 64 (1): 79-83, 2009.
110. MEKHA N, SUGITA T, IKEDA R, NISHIKAWA A, AUTTHATEINCHAI R, POONWAN N, SAWANPANYALERT P. Genotyping and antifungal susceptibility of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii* isolated from Thai patients. *Mycopathologia*; 169 (1): 67-70, 2010.
111. SERENA C, GILGADO F, MARINE M, PASTOR FJ, GUARRO J. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (6): 2240-2243, 2006.
112. RUAN SY, CHIEN JY, HSUEH PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (1): e11-17, 2009.
113. BAYRAMOĞLU G, SONMEZ M, TOSUN I, AYDIN K, AYDIN F. Breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia in neutropenic patient with acute leukemia while receiving caspofungin. *Infection*, 36 (1): 68-70, 2008.
114. MATSUE K, URYU H, KOSEKI M, ASADA N, TAKEUCHI M. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (6): 753-757, 2006.

115. Li H, LU Q, WAN Z, ZHANG J. *In vitro* combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 550-552, 2010.
116. SERENA C, MARINE M, PASTOR FJ, NOLARD N, GUARRO J. *In vitro* interaction of micafungin with conventional and new antifungals against clinical isolates of *Trichosporon*, *Sporobolomyces* and *Rhodotorulo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 1020-1023, 2005.
117. SERENA C, PASTOR FJ, GILGADO F, MAYAYO E, GUARRO J. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 497-502, 2005.

## 8. TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki öğrencilik eğitimim, uzmanlık eğitimim ve sonrasında, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof.Dr.Kaya Kılıçturgay'a, Prof.Dr.Feridun Gökırmak'a, Prof.Dr.Okan Töre'ye, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof.Dr.Güher Göral'a, her konuda ilgisini ve desteğini gördüğüm tez danışmanım sayın Prof.Dr.Cüneyt Özakin'a, tezimin oluşumunda ve yürütülmesinde büyük emeği olan sayın Prof.Dr.Beyza Ener'e, Prof.Dr.Ünal Egeli'ye, yetişmemde emekleri olan hocalarım Prof.Dr.Suna Gedikoğlu'na, Prof.Dr.Safiye Helvacı'ya, Prof.Dr.Reşit Mıstık'a, Prof.Dr.Halis Akalın'a, Prof.Dr.Barbaros Oral'a, Prof.Dr.Emel Yılmaz'a, Doç.Dr.Yasemin Heper'e, Doç.Dr.Melda Sınırtaş'a, Uzm.Dr.Sevim Akçağlar'a, Doç.Dr.Oktay Alver'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum anabilim dalımızın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Buraya kadar gelmemde büyük emeği olan aileme, her zaman desteğini ve sevgisini yanıbaşımnda hissettiğim eşim Önder Evcı ve oğlum Barış Evcı'ye teşekkür ederim.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

30.09.1971 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Bursa Namık Kemal İlkokulu ve Bursa Dörtçelik Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Bursa Kız Lisesi'nde tamamladım. 1988-1994 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenim gördüm. Kütahya İli Aslanapa İlçesi Merkez Sağlık Ocağı Tabibliği'nde mecburi hizmetimi yerine getirdim. 1996-1997 yıllarında Bursa İli Gemlik Engürücük Sağlık Ocağı Tabibliği'nde ve 1998 yılında Bursa İli Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Merkezi'nde görev yaptım. 1999-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi aldım. 2005-2008 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda uzman doktor olarak görev yaptım. 2008-2009 yıllarında Çanakkale İli Biga Devlet Hastanesi'nde Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanı, Başhekim yardımcısı, 2009-2014 yılları arasında Bursa İli Karacabey Devlet Hastanesi'nde Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanı olarak görev aldım. Halen, Bursa İli Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi'nde görevime devam etmekteyim. Evliyim, bir çocuk annesiyim.