

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

TINEA VERSICOLOR ÖN TANISIYLA BAŞVURAN
HASTALARDA ETKEN OLAN *MALASSEZIA*
TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Gülin RODOPLU
Tbp. Yzb.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık Tezi

ANKARA
2012

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**TINEA VERSICOLOR ÖN TANISIYLA BAŞVURAN
HASTALARDA ETKEN OLAN *MALASSEZIA* TÜRLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gülin RODOPLU
Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi'nin
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Ali SARAÇLI

ANKARA
2012

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığı'na:

“Tinea Versicolor Ön Tanısıyla Başvuran Hastalarda Etken Olan *Malassezia* Türlerinin Belirlenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Doç. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Ali SARAÇLI
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Mikoloji BD.

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Şinasi Taner YILDIRAN
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Mikoloji BD.

Üye : Doç. Hv. Vet. Hekim Kd. Alb. Mustafa ÖZYURT
GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi

Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Ali SARAÇLI
GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Mikoloji BD.

ONAY:

Tbp. Yzb. Gülin RODOPLU'nun 24/12/2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Sadettin ÇETİNER
Profesör Hava Tabip Tümgeneral
GATA Komutanı Bilimsel Yardımcısı,
Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve
Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı'nın 16 Nisan 2009 tarihli ve T. MİK. AD: 3730-1866-09/1541 sayılı kararı gereği Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışmamda bana her türlü yardım ve desteği sağlayan ve eğitimim süresince bilgi ve becerimin artmasında çok değerli katkıları bulunan, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU, Tıbbi Mikoloji BD. Başkanı Prof. Dr. Şinasi Taner YILDIRAN ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Ali SARAÇLI'ya teşekkürü borç bilirim.

Uzmanlık öğrenciliğim süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, yetişmemde emeği olan değerli öğretim üyelerimize ve özveri ile çalışan tüm asistan arkadaşlarıma, GATA Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli tüm biyolog, teknisyen, laborant ve diğer klinik personeline,

Tezimin laboratuvar aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen biyolog Ahmet GÖNLÜM'e, kalite kontrol çalışmalarım için standart suş sağlayan Prof. Dr. Aydın KARAASLAN'a, istatistiksel değerlendirmede yardımları olan Doç. Dr. Cengiz Han AÇIKEL'e ve laboratuvara hasta yönlendirilmesinde destek olan Prof. Dr. Ahmet AKAR'a

Ve bugünlere gelmemde büyük emeği olan anneme, babama, ağabeylerime, her konuda desteğini esirgemeyen, bana sabırla yaklaşan eşim Serdar'a ve bana ayrı bir yaşam sevinci katan kızım Türkan Naz'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Tinea versicolor ön tanısıyla başvuran hastalarda etken olan *Malassezia* türlerinin belirlenmesi

Tinea versicolor derinin sık görülen yüzeysel bir mikozudur. Bu enfeksiyona neden olan organizmalarının çeşitli *Malassezia* türleri olduğu günümüzde bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı tinea versicolor klinik tanılı hastalardan izole edilen *Malassezia* türlerinin dağılımını geleneksel kültür yöntemlerini kullanarak belirlemektir. Bu çalışmaya toplam 146 tinea versicolor hastası dahil edildi. Hastaların %75,3'ünde kepeklenme mevcuttu. Hastalardan alınan örneklerin %36,4'ünün KOH solüsyonu ile incelemesinde mantar elemanları görüldü. Bistüri ile epidermal kazıntı ve/veya steril yapışkan bant (OpSite) tekniği kullanılarak alınan örneklerin hepsi modifiye Dixon besiyeri plaklarına ekildi. Alınan 146 örneğin 109'unda (%74,7) *Malassezia* türü olduğu düşünülen üreme gözlemlendi. *Malassezia* şüpheli mayaların tür düzeyinde tanımlanması için katalaz, eskülin ve Tween testlerini içeren konvansiyonel deneyler uygulandı. İlave olarak cremophor EL asimilasyonu ve Sabouraud glikoz agar (SGA) besiyerlerindeki üreme durumları da değerlendirildi. Tanımlanabilen türler arasında; *Malassezia globosa* (%65,1) en sık izole edilen tür olurken, *Malassezia obtusa* (%17,4) onu takip etti. Ancak, dört *Malassezia* izolatu geleneksel yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanamadı. Sonuçta, *M. globosa* tinea versicolor hastalarından kültüre edilebilen baskın tür olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler : Tinea versicolor, OpSite, *M. globosa*, *M. obtusa*

Yazar Adı : Tbp. Yzb. Gülin RODOPLU

Danışman : Doç. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Ali SARAÇLI

SUMMARY

Determination of *Malassezia* species which are causative agents in patients admitted with the pre-diagnosis of tinea versicolor

Tinea versicolor is a common superficial mycoses of the skin. It is now recognized that the causative organisms of this infection are different species of *Malassezia*. The aim of this study was to determine the distribution of *Malassezia* species isolated from patients who were clinically diagnosed with tinea versicolor by using conventional culture methods. In total, 146 patients with tinea versicolor were included in this study. Scaling was present in 75.3% of the patients. In 36.4% of the samples obtained from patients, fungal elements were seen by examination with KOH solution. All the epidermal scrapings obtained by sterile scalpel and/or sterile sticky plaster (OpSite) were inoculated in plates containing modified Dixon's medium. 109 of 146 samples (74.7%) yielded a growth which was thought to be a *Malassezia* sp. in culture. For species-level identification of suspicious *Malassezia* yeasts, conventional tests including catalase, esculin and Tween tests were performed. In addition assimilation of cremophor EL and growth in Sabouraud glucose agar (SGA) mediums were evaluated. Among the identified species, *Malassezia globosa* (65.1%) was the most commonly isolated species followed by *Malassezia obtusa* (17.4%). However, four *Malassezia* spp. isolates could not have been identified at species-level with conventional methods. In conclusion, *M. globosa* was found to be the predominant species that can be cultured in tinea versicolor patients.

Keywords : Tinea versicolor, OpSite, *M. globosa*, *M. obtusa*

Author : Gülin RODOPLU, MD.

Counsellor : Mehmet Ali SARAÇLI, MD, Assoc. Prof.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Filogeni ve Taksonomi.....	6
2.3. Epidemiyoloji.....	6
2.4. <i>Malassezia</i> Türlerinin Sorumlu Olabildiği Diğer Klinik Tablolar	9
2.5. <i>Malassezia</i> Cinsinin Mikolojik Özellikleri	12
2.5.1. Hücre Yapısı	12
2.5.2. Morfoloji.....	12
2.5.3. Üreme Özellikleri.....	13
2.5.4. Biyokimyasal Özellikler	14
2.5.5. Virülans Faktörleri	15
2.6. <i>Malassezia</i> Türleri.....	16
2.6.1. <i>Malassezia furfur</i>	16
2.6.2. <i>Malassezia pachydermatis</i>	17
2.6.3. <i>Malassezia globosa</i>	18
2.6.4. <i>Malassezia slooffiae</i>	18
2.6.5. <i>Malassezia obtusa</i>	19
2.6.6. <i>Malassezia sympodialis</i>	19
2.6.7. <i>Malassezia restricta</i>	19
2.6.8. <i>Malassezia dermatis</i>	20
2.6.9. <i>Malassezia nana</i>	20

2.6.10. <i>Malassezia japonica</i>	21
2.6.11. <i>Malassezia yamatoensis</i>	21
2.6.12. <i>Malassezia equina</i>	22
2.6.13. <i>Malassezia caprae</i>	22
2.6.14. <i>Malassezia cuniculi</i>	23
2.7. Laboratuvar Tanı.....	25
2.7.1. Örnek Alınması ve Taşınması.....	25
2.7.2. Mikroskopik İnceleme.....	25
2.7.3. Kültür.....	26
2.7.4. Tür Düzeyinde Tanımlama	28
2.7.5. Moleküler Tanı	31
GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Klinik Örneklerin Alınması	33
3.2. Mikroskopik İnceleme	34
3.3. Kültür	34
3.4. Tür Düzeyinde Tanımlama.....	36
3.4.1. SGA Besiyerinde Üreme Testi	36
3.4.2. Katalaz Reaksiyonu	36
3.4.3. Tween Asimilasyon Testi.....	37
3.4.4. Cremophor EL Asimilasyonu.....	38
3.4.5. Eskülin Hidrolizi Testi	39
3.4.6. Modifiye Dixon Besiyerinde Kristal Presipitat Oluşumunun İncelenmesi.....	40
BULGULAR.....	42
TARTIŞMA.....	48
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	:	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	:	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
cEL	:	Cremophor EL
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
g	:	Gram
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
H₂O	:	Su
IgG	:	İmmünglobülin G
IGS	:	Intergenic Spacer
ITS	:	Internal Transcribed Spacer
KOH	:	Potasyum Hidroksit
mDixon	:	Modifiye Dixon
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
O₂	:	Oksijen
PAS	:	Periodic Acid-Schiff
PCR	:	Polimerase Chain Reaction
PFGE	:	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PV	:	Pityriasis Versicolor
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik asit
SGA	:	Sabouroud Glukoz Agar
sn	:	Saniye
SPSS	:	Statistical Package for the Social Sciences
T	:	Tween
UV	:	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Pityriasis versicolor'lu hastalarda görülen lezyonlar	9
2.2.	Geniş ve dar tabanlı tomurcuklanan <i>Malassezia</i> mayaları	13
2.3.	<i>Malassezia</i> türlerinin düzgün yüzeyli krem rengi koloni yapısı	14
3.1.	Tween 20, 40 ve 60'ı kullanmış, ancak Tween 80'i asimile etmemiş olan bir <i>Malassezia</i> türü	38
3.2.	Eskülin pozitif ve negatif test sonuçları	40
3.3.	<i>Malassezia</i> kolonileri etrafında oluşan kristal presipitatlar	41
4.1.	Maya ve hiflerin oluşturduğu "köfte-spagetti" görüntüsü	44

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Ondört <i>Malassezia</i> türünün ayırtedici özellikleri	24
4.1.	Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları	42
4.2.	Lezyonların tekrarlama sıklığı	43
4.3.	Lezyonların vücut bölgelerine göre dağılımları	43
4.4.	İki örnek alma tekniğine göre kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	45
4.5.	Kültür ve mikroskopi sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	46
4.6.	Kültür pozitifliği ile hasta cinsiyetinin ilişkisi	46
4.7.	<i>Malassezia</i> türlerinin dağılımı	47

GİRİŞ

Malassezia türleri, genel olarak insan ve sıcakkanlı hayvanların normal cilt florasında bulunan, aynı zamanda tinea versicolor, seboreik dermatit, kepek, psöriasis, kaşıntılı kulak, eksternal otit ve atopik dermatit gibi birçok klinik tabloyla ilişkili olan, altta yatan uygun predispozan faktörleri olan hastalarda sistemik hastalıklara da sebep olabilen basidiomycota şubesine ait mayalardır. Bu bakımdan, kommensallik ve patojenlik arasında kalmış olan *Malassezia* türlerinin insan immün sistemi ile olan etkileşimi oldukça önemli görünmektedir (1). Genel olarak tinea versicolor'un sebebi olarak kabul edilmektedirler (2).

Tinea versicolor, diğer adı ile pityriasis versicolor (PV), *Malassezia* maya mantarının sebep olduğu kronik yüzeysel bir enfeksiyondur. Bu hastalık bütün dünyada yaygın olarak görülmektedir. Tinea ön ekinin klinik olarak dermatofitozlar için sıklıkla kullanılması nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından tinea versicolor yerine pityriasis versicolor terimi tercih edilmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında da pityriasis versicolor terimi tercih edilmiştir. PV, deride hipo ve/veya hiperpigmentasyona sebep olmakta ve vücudun yağdan zengin olan boyun, sırt, göğüs gibi bölgelerinde görülmektedir (1). PV asemptomatiktir ve kozmetik bozukluğa sebep olmaktadır. Ancak, lezyonlarda bazen kaşıntı görülebilmektedir (1). PV'nin tropikal bölgelerdeki prevalansı %50'lere ulaşabilmektedir (3). Ilık ve nemli hava bu hastalığın gelişmesinde önemli bir faktördür. Hastalık en sık genç erişkinlerde görülmektedir. Lezyonlardan alınan örneğin potasyum hidroksit (KOH) solüsyonu ile incelemesinde tipik "köfte-spagetti" (konidya ve hif) görüntüsü izlenmektedir (2). PV'ye sebep olan *Malassezia* cinsinde bugün için tanımlanmış 14 tür vardır:

1. *Malassezia furfur* (Robin) Baillon (1889)
2. *Malassezia pachydermatis* (Weidman) Dodge (1925)
3. *Malassezia sympodialis* Simmons & Guého (1990)
4. *Malassezia globosa* Midgley, Guého & Guillot (1996)
5. *Malassezia obtusa* Midgley, Guillot & Guého (1996)
6. *Malassezia slooffiae* Guillot, Midgley & Guého (1996)

7. *Malassezia restricta* Guého, Guillot & Midgley (1996)
8. *Malassezia dermatis* Sugita, Takashima, Nishikawa & Shinoda (2002)
9. *Malassezia japonica* Sugita, Takashima, Kodama, Tsuboi & Nishikawa (2003)
10. *Malassezia nana* Hirai, Kano, Makimura, Yamaguchi & Hasegawa (2004)
11. *Malassezia yamatoensis* Sugita, Tajima, Takashima, Amaya, Saito, Tsuboi & Nishikawa (2004)
12. *Malassezia caprae* Cabañes & Boekhout (2007)
13. *Malassezia equina* Cabañes & Boekhout (2007)
14. *Malassezia cuniculi* Cabañes & Vega (2011)

Ülkemizde PV etkenlerini sorgulayan, *Malassezia* türlerinin vücut bölgelerine, enfeksiyon süresine ve nüks durumuna göre dağılımını inceleyen sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışma ile, *Malassezia* cinsi mayaların geleneksel yöntemler kullanılarak tür düzeyinde laboratuvar tanısının rutin pratiğimize kazandırılması, ilave olarak etken olan tür dağılımının belirlenmesi, tutulan vücut bölgesi, enfeksiyonun süresi, tekrar sıklığı gibi değişkenlerin sorgulanması, örnek alma yöntemlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi gibi parametrelerin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, genel bilgiler bölümü, *Malassezia* türlerinin sayısının son on yılda hızlı bir artış göstermesi nedeniyle çok sayıda kaynakta dağınık olarak yer alan önemli bilgilerin bir araya toplanması ve bu konuda çalışacak araştırmacılara kolaylık sağlaması amacıyla bilerek geniş tutulmuştur.

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Dermatomikozis furfuraz, tinea flava, liver spots, kromofitozis ve Eichstedt hastalığı PV ile eş anlamlı olarak kullanılmış eski tanımlamalardır (4). Enfeksiyon başta uzun süreler değişik diskromilerle karıştırılmış, 1801'de Willan tarafından özgün bir klinik olarak kabul edilmiş ve tinea versicolor ismi verilmiştir. Pityriasis versicolor lezyonlarında maya hücrelerinin varlığı ilk kez 1846'da Eichstedt tarafından deri kazıntı örneklerinde gözlenmiş ve 1847 yılında ise Sluyter tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar hastalığı pityriasis versicolor (tinea versicolor) olarak tanımlamışlar, ancak mantara bir isim önermemişlerdir. Robin 1853'de mantarı *Microsporum furfur*, hastalığı PV olarak isimlendirmiştir, çünkü mantarın *Microsporum audouinii*'ye benzer olduğunu düşünmüştür. Rivolta, 1873'de bir psöriasis olgusunda çift çeperli, tomurcuklu hücreleri tanımlamıştır. Malassez, 1874'de maya benzeri hücreleri kafa derisi lezyonları ve kepekte tanımlamış ve spor olarak adlandırmıştır. İzleyen yıllarda Bizzozero, Malassez'in sporlarına benzer şekilde hem küresel hem de yumurtamsı şekilde tomurcuklanan maya hücrelerini insan vücuduna ait epidermal kazıntılarda tanımlamıştır. 1884 yılında küresel olanları *Saccharomyces sphaericus* ve yumurtamsı olanları ise *Saccharomyces ovalis* olarak adlandırmıştır. 1889 yılında Baillon, pityriasisin etyolojik ajanının *Microsporum* türlerinden farklı olduğunu farketmiştir ve bu organizmayı yeni bir cins olarak *Malassezia* cinsi altında ifade etmiştir. Sabouraud, *Pityrosporum malassez* ismini önermiş ve kepeğin (pityriasis simplex capitis) etkeni olduğunu ileri sürmüştür. Ancak; 1913'de Castellani ve Chalmers, cins ismi olarak *Pityrosporum*'u benimsemişler ve "Malassez sporları" için *Pityrosporum ovale* terimini kullanmışlardır. Panja tarafından *Pityrosporum* ve *Malassezia* cinslerinin taksonomik olarak aynı olduğu ifade edilmişse de bu görüş uzun yıllar dikkate alınmamıştır. Hasta lezyonlarında ilk tanımlamasının 1846'da yapılmasına ve bazı araştırmacıların *in vitro* şartlarda mantarı ürettiklerini bildirmelerine karşın, 1930'lu yıllar öncesinde lipit içeren besiyerleri kullanılmamış olduğundan bu

izolatların en azından bir bölümünün *Malassezia* türü olmaması olasıdır, çünkü *Malassezia*'nın lipofilik özelliği ilk kez 1939'da Benham tarafından gösterilmiştir (5). Üremesi için lipit gerektirmeyen, hayvanlarda kolonize olan ve insan derisinde nadir olarak bulunan tek *Malassezia* türü *M. pachydermatis*'in tanımlanması ise Weidman tarafından 1925 yılında gerçekleştirilmiştir (3).

Gordon 1951 yılında hem lezyonlu hem de lezyonsuz bölgelerden küresel ve yumurtamsı şekilde olan maya hücrelerini izole etmiş ve mayanın küresel formuna *Pityrosporum orbiculare* ismini vermiştir. *P. orbiculare* ve *P. ovale*'nin aynı mikroorganizmalar veya aynı mikroorganizmanın farklı şekilleri olup olmadığı uzun bir süre tartışma konusu olmuştur. Borrelli, tropikal bölgelerde yaptığı çalışmalarda, aynı hastada *Pityrosporum*'un bu iki şeklinin birlikte olabileceğini göstermiştir. *P. orbiculare*'yi esas olarak göğüs, boyun, yüz ve bacak üst kısmından; *P. ovale*'yi ise gluteal bölgeden izole etmiştir (3).

Malassezia cinsi içerisinde 1970'lere kadar *P. ovale*, *P. orbiculare* ve *P. pachydermatis* olmak üzere sadece üç tür ifade edilmiştir ve bu üç tür ismi 1986 yılına kadar kullanılmıştır. Maya ve miçelli şekiller arasında ilişki bulunduğu kabul edilmekle beraber *in vitro* maya-hif faz dönüşümü üç farklı araştırma grubu tarafından ancak 1977 yılında başarılabilmiştir (6,7,8). Hem yuvarlak hem de oval hücrelerin hif üretebildiği gözlemlendiğinden, yuvarlak (*P. orbiculare*) ve oval (*P. ovale*) hücrelerle hiflerin aynı tek bir organizmanın yaşam çevrimindeki formlar olduğu ortaya konmuştur (8). 1986 yılında o zamana kadar tanımlanmış ve farklı isimlerle ifade edilmiş olan türler *Malassezia furfur* (*P. ovale*, *P. orbiculare* ve *M. furfur*'u içeren) ve *M. pachydermatis* olarak kabul edilmiştir (2).

Simmons ve Guého 1990 yılında yeni bir lipofilik tür olan, ancak *Malassezia furfur*'a oranla daha düşük oranda Guanin+Sitozin içeren ve simpodiyal tomurcuklanma gösteren *Malassezia sympodialis*'i tarif etmişlerdir (9). 1995 yılında Guillot ve Guého yayınladıkları bir çalışmada, *Malassezia* türlerinden 104 izolat toplayıp bunların büyük alt birim rRNA ve nükleer DNA komplementlerinin sekanslama çalışmaları ile fizyolojik, morfolojik ve ultrastrüktürel özellikleri birleştirerek bilinen üç türe (*M. furfur*, *M.*

pachydermatis, *M. sympodialis*) ilaveten, yeni türlerin tanımlanmasının gerekli olduğunu vurgulamışlardır (10). Aynı araştırmacılar 1996 yılında ilave dört yeni *Malassezia* türünü (*M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*) tanımlamışlardır (11). Bu türler başka taksonomistlerce de doğrulandığından tanımlanmış *Malassezia* türü sayısı yediye ulaşmıştır (12,13,14).

Sugita ve ark. 2002 yılında atopik dermatitli hastalardan ayırdıkları kökenlerden yeni bir *Malassezia* türü olarak *M. dermatis*'i tanımlamışlardır (15). 2003 yılında Sugita ve ark. sağlıklı bir Japon'un deri mikroflorasından *Malassezia japonica*'yı izole edip tanımlamışlardır (16). 2004 yılında Hirai ve ark. Japonya ve Brezilya'da hayvanlardan ayırdıkları bir grup kökeni fenotipik ve genotipik yöntemlerle tanımlayarak *M. nana* adını verdikleri yeni bir türü tanımlamışlardır (17). Aynı yıl Sugita ve ark. Japonya'da seboreik dermatitli bir hastadan *M. yamatoensis*'i tarif etmişlerdir (18).

Malassezia equina Cabañes ve ark. tarafından 2007 yılında atlardan izole edilen *Malassezia* kökenlerinin morfolojik, fizyolojik ve genomik özelliklerine göre detaylı tanımlanmış ve bu adla adlandırılmış olmakla birlikte, aslında ilk kez 2002 yılında Nell ve ark. tarafından bir atın anal derisinden izole edilerek *M. equi* olarak adlandırılmış, daha sonra *M. equi* ismi yerini *M. equina*'ya bırakmıştır (19,20). Cabañes ve ark. tarafından aynı çalışmada çoğunlukla keçilerden izole edilen *M. caprae* türü de ilk kez tanımlanmış ve ribozomal DNA dizi analizlerine göre iki yeni tür olarak yayınlanmıştır (20). Son olarak, 2011 yılında yine Cabañes ve ark. yapmış oldukları çalışmada tavşan derisinden yeni bir *Malassezia* türü olan *M. cuniculi*'yi 26S rRNA geninin D1/D2 bölgesi ve ITS-5.8S rRNA gen sekans analizi ile tanımlamışlardır (21).

Böylece 2002 yılına kadar yedi türü mevcut olan *Malassezia* cinsi, 2002-2011 yılları arasında eklenen yedi tür ile birlikte 14 türe ulaşmıştır. Bu türler; *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia restricta*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia caprae*, *Malassezia equina*, *Malassezia*

cuniculi'dir. Bunlardan on üçü zorunlu lipofilik olup, sadece *M. pachydermatis* zorunlu lipofilik değildir.

2.2. Filogeni ve Taksonomi

Malassezia cinsinin henüz tanımlanmış teleomorfu bulunmamasına karşın, basidiomycetes bölümünün karakterlerini taşımaktadır. Bu özellikler; çok tabakalı hücre duvarına sahip olması, tekrarlayan tek kutuplu tomurcuklanma yapması, üreyi hidroliz edebilmesi ve diazonyum B mavisini ile kırmızı renk vermesidir. Bu özelliklerle beraber lipofilik olmaları uluslararası mantar koleksiyonlarında halen bulunan çeşitli izolatlarla insan ve hayvanlardan elde edilmiş koleksiyonları da içeren çalışmalar için ve cinsin taksonomisi için temel oluşturmaktadır (22). *Malassezia* türleri Filobasidiaceae ailesi altında yer alan *Cryptococcus* ve *Trichosporon* cinsleriyle filogenetik olarak ilişkilidir. Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmalar sonucunda *Malassezia* cinsinin taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibi oluşturulmuştur (23).

Alem : Fungi
Bölüm : Basidiomycota
Sınıf : Hymenomycetes
Takım : Tremellales
Aile : Filobasidiaceae
Cins : *Malassezia*

2.3. Epidemiyoloji

Sağlıklı deride *Malassezia* türlerinin varlığı 19. yüzyılın başlarında fark edilmiştir. PV oluşumu *Malassezia* türlerinin kolonizasyon yoğunluğunun artışı ile ilgilidir. Kolonizasyonun sıklığı ve yoğunluğu kişinin yaşıyla ve yağ bezlerinin aktivitesi ile paralellik göstermektedir (24). PV genellikle adolesan ve genç erişkinlerde görülmektedir (25). *Malassezia* türlerinin *M. pachydermatis* hariç olmak üzere üremek için lipit gereksinimi olduğundan, PV küçük çocuklar ve yaşlılarda nadiren izlenmektedir. Deride yağ miktarının arttığı dönemlerde PV görülmeye başlar. PV tablosu insan derisinin normal

florasında bulunan bu mantarın maya formundan derinin stratum corneum tabakasını invaze edecek olan patojen hif formuna dönüşümü ile birlikte ortaya çıkmaktadır (25). Bu dönüşüm, endojen ve ekzojen faktörlerle tetiklenebilmektedir (22). PV'ye yol açan kolaylaştırıcı faktörler arasında yüksek ısı, nem, dar giysiler, aşırı terleme, kötü beslenme, gebelik, doğum kontrol hapları, immüno-supresifler, kortikosteroid ve antineoplastiklerin kullanılması, derinin seboreik ve hiperhidrotik yapıda olması, deriye aşırı yağ sürülmesi, AIDS ve visseral layşmanyazis gibi bağışıklık sistemini baskılayan hastalıklar ve genetik faktörler sayılabilir (25). PV'nin, radyoterapi ve lityum tedavisi alan kişilerde de görüldüğü rapor edilmiştir (3).

Pityriasis versicolor genelde kozmetik bir problem olarak ortaya çıkmasına ve asemptomatik olarak seyretmesine rağmen bazı hastalarda kaşıntı gözlenebilmektedir. Hastalık tekrarlayan bir seyir gösterir ve sıklıkla tedaviye gerek duyulmaktadır (1).

Bazı çalışmalarda (26-30) PV'nin erkeklerde daha sık görüldüğünün belirtilmesine karşılık, karşıt görüşler de bildirilmiştir (31-33). Birçok çalışmada ise PV'nin gelişiminde cinsiyetin çok önemli olmadığı gösterilmiştir (3,34,35). Özellikle sporcular bu hastalığa yatkınlık göstermektedirler. Bu durumun aşırı terlemeden olup olmadığı açık değildir. Hijyen bu hastalığın gelişmesinde önemli bir etmen değildir. Ancak, deriye krem veya losyon uygulanması bu hastalığın gelişmesinde kolaylaştırıcı bir faktördür (3).

Pityriasis versicolor genellikle adölesan ve genç erişkinlerde görülmekle birlikte iki yaş altındaki çocuklarda nadiren rastlanır. Bu grupta sadece prematüre olup doğumu takiben yoğun bakım ünitesinde olan bebeklerde görülebilmektedir (3). Bir olguda iki haftalık yenidoğanın göğüs bölgesinde *Malassezia* türlerinin saptandığı rapor edilmiştir (36). Bu olguya inkübatörün sıcaklığı ve neminin sebep olduğu düşünülmüştür. Prematüre yenidoğanların derilerinde lezyon gelişimine sebep olmaksızın bu maya mantarı bulunmakta ve bu durumun bebeklere doğumdan sonra sağlık personeli tarafından elle dokunulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (37). Çocuklarda yüz tutulumu erişkinlerden daha yaygın olarak görülebilmektedir (38,39). Pityriasis versicolor, yaşlılarda sebum üretiminin

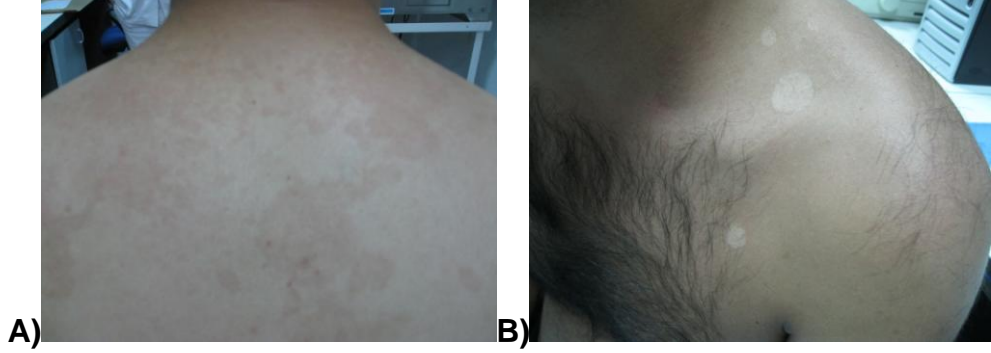
azalması nedeniyle seyrek görülmekle birlikte, bağışıklık sistemlerinin baskılanması, vücut sıcaklıklarının daha yüksek olması ve terlemeleri, giysilerinin sık değiştirilmemesi ve banyo yapma sıklığının azalması gibi nedenlerle özellikle hastanede yatan yaşlılarda daha yüksek oranda ortaya çıkmaktadır (3,40).

Malassezia türlerinin lokal dağılımı sebase bezlerin bölgesel yoğunluğu ile ilgilidir ve yüz, göğüs ve sırtta yüksek oranda *Malassezia* bulunmaktadır. Saçta, tırnakta ve mukozalarda bulunmamaktadır. PV bu bölgelerde yuvarlak veya oval lezyonlarla karakterize, hipopigmente (beyaz) ya da hiperpigmente (bronz, kahverengi ya da siyah) lezyonlar şeklinde ortaya çıkar (22). Örnek lezyon görüntüleri Şekil 2.1'de verilmiştir. *Malassezia* türleri saçlı deride de hastalık yapabilir, lezyonları kepekli veya kepeksiz olabilir. Yetişkinlerin yüzünde olan lezyonlar genelde gövde ve üst kollarda görülen PV'ye ikincil olarak gelişmektedir. Bundan başka lezyonlar gövde haricindeki vücut bölgelerinde de rapor edilmiştir. Bu bölgeler boyun, kasık, meme, periareolar bölge (erkek hastalarda), koltuk altı, genital bölge, eller, antekubital bölge ve önkoldur. Lezyonlar peniste de görülebilmektedir (3).

Malassezia türlerinin genel olarak üremesi ve gelişmesi için lipide ihtiyacının olması ve optimal üreme ısılarının mezofilik, yani 30-35°C olması sadece sıcakkanlı hayvanlardan izole edilmelerinin nedenidir. Son 20 yılda veteriner hekimler arasında *Malassezia* türlerine ilgi belirgin olarak artmıştır. Köpeklerde dış kulak yolu enfeksiyonu ve dermatite sıklıkla *M. pachydermatis*'in sebep olmasına rağmen, bu mantar diğer hayvanlarda pek yaygın değildir. Lipit bağımlı *Malassezia* türleri ise geviş getiren hayvanlardan ve atlardan sıklıkla izole edilmektedir (41).

En sık görülen yüzeyel mikozlardan biri olan PV'nin yaygınlığı, iklimin ılıman ya da tropikal olmasına göre de değişkenlik göstermektedir (42). Tropikal ülkelerde PV yaygın olarak görülmektedir ve bazı bölgelerde PV sıklığı %50'lere kadar ulaşabilmektedir (43,44). Tropikal ülkelerde bireysel duyarlılık değişiklik gösterebilmekteyken, lezyonların tekrarlaması neredeyse kaçınılmazdır (3). Buna karşılık, İskandinavya'da toplumun ancak %1'inde PV görüldüğü belirtilmiştir (45,46).

Pityriasis versicolor lezyonlarından en çok izole edilen *Malassezia* türleri *M. globosa* ve *M. sympodialis*'tir. *M. slooffiae* ve *M. furfur* gibi diğer türler göreceli olarak daha az izole edilmektedir. Tür prevalansındaki farklılıkların coğrafik varyasyonlardan ileri geldiği düşünülmektedir (25).



Şekil 2.1. Pityriasis versicolor'lu hastalarda görülen lezyonlar
A) Hiperpigmente B) Hipopigmente

2.4. *Malassezia* Türlerinin Sorumlu Olabildiği Diğer Klinik Tablolar

Malassezia türleri, PV dışında seboreik dermatit, *Malassezia* folliküliti neonatal püstüloz, blefarit, infantil akne, Gougerot-Carteaud yaygın papillomatozu, atopik dermatit, psöriasis, kaşıntılı kulak, otitis eksterna, total parenteral beslenme alan hastalarda sepsis ve immünyetmezlikli hastalarda lipid içeren solüsyon infüzyonları ile ilişkili olarak fungemi, kateter kaynaklı enfeksiyonlar gibi tablolarla ilişkili olabilir (22,25,41,47).

- ***Malassezia* Folliküliti**

Malassezia folliküliti çoğunlukla sırt, göğüs ve üst ekstremitelerde görülmektedir. Özellikle nemli ve tropik bölgelerde yüzde de lezyonlara rastlanabilir. *M. furfur* steroid aknesi ve akne vulgarisin folliküler şekli de sorumlu tutulmuştur (48). *Malassezia* follikülitli hastaların histolojik çalışmaları, hastalığın isminden de belli olacağı gibi, dilate kıl folliküllerinin çok sayıda tomurcuklanan *Malassezia* mayaları ve bazen de hifler ile invaze edildiğini göstermektedir (49). Asemptomatik ya da kaşıntılı olabilen eritematöz papüllerin bazen de püstüllerin gelişimine bu invazyon sebep olmaktadır. Histolojik olarak *Malassezia* follikülitinde, folliküler epitelin fokal rüptürü ile birlikte olan lenfosit, histiyosit ve nötrofillerin oluşturduğu

inflamatuar invazyon mevcuttur (50,51). Genellikle keratinöz materyal ile dolmuş olan kıl follikülleri genişlemiş görünümündedir (52). Follikül çıkışının tıkanmasının mayanın aşırı çoğalması sebebi ile geliştiği öne sürülmüştür (53). Metanamin gümüş ve PAS (Periodic Acid-Schiff) ile boyanan biyopsi örneklerinde küresel, tomurcuklanan maya hücreleri histopatolojik olarak gösterilmiştir (50,51) ve aynı zamanda *P. ovale*'ye karşı oluşan IgG antikorlarının yüksek titrelerde olduğu da saptanmıştır (54).

Malassezia ile ilişkili diğer hastalıklarda olduğu gibi *Malassezia* folliküliti de immün cevap önemlidir. Çoğunlukla immünsuprese bireylerde rapor edilmiştir (55,56). Predispozan faktörler; diabetes mellitus, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve transplantasyon sonrası immünsupresyondur. *Malassezia* folliküliti ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olması, yapılan mevcut çalışmalarda örneklerin yüzeysel teknikler kullanılarak alınmış olmasından ve daha derindeki kıl foliküllerinde lokalize olan mayalara ulaşılamamış olmasından kaynaklanmaktadır (25).

- **Seboreik Dermatit**

Seboreik dermatit de *Malassezia* mayaları ile birlikteliği olan bir dermatolojik rahatsızlıktır. Kepek, klinik olarak seboreik dermatitin daha hafif bir formudur. Kafa derisindeki *Malassezia* yoğunluğunun azalması ile seboreik dermatit/kepek tablosundaki düzelme ve antifungal tedaviye verdiği cevap, *Malassezia* ve kepek arasındaki ilişkiye işaret etmektedir (57,58). PV'de olduğu gibi seboreik dermatit de adölesanlarda ve genç erişkinlerde daha sık görülmektedir ve özellikle kafa derisinde, nasolabial olukta, kaşta ve göğüste bulunan, kırmızı, pul pul dökülen lezyonlarla karakterizedir (59,60). Hastalığın şiddeti mevsimlere göre değişebilmektedir. Güneş ışığının klinik lezyonları arttıracığı bilinse de kış aylarında seboreik dermatit kötüleşmektedir (25). Bu durum *Malassezia* türlerinin UV radyasyona karşı direncini sağlayan pityriacitrin salgılaması ile ilişkilendirilebilir (61,62).

McGinley ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, kafa derisindeki *Malassezia* mayalarının oranı kontrol grubuna göre seboreik dermatitli hastalarda daha yüksek bulunmuştur (63). Seboreik dermatitin *Malassezia* mayalarının fazla kolonize olmalarından çok, konak cildindeki normal

olmayan cevaptan kaynaklandığı düşünülmektedir (64). Aynı zamanda *Malassezia* türlerinin lipaz aktivitesiyle ya da toksin üretimiyle seboreik dermatit geliştiği (65), trigliseritleri irritan yağ asitlerine çeviren lipaz enziminin bulunması (66) veya cilt inflamasyonunda rol alan araşidonik asit salınmasının pullanmayı uyardığı öne sürülmüştür (67-69). Bozulmuş hücrel immünitenin de ciltte mantar gelişimini artırdığı belirtilmiştir (54). Seboreik dermatit ve kepeklerle en sık ilişkili olan *Malassezia* türleri *M. globosa* ve *M. restricta* olarak bildirilmiştir (25).

- **Atopik Dermatit**

Atopik dermatit çoğu zaman kaşıntılı olan, kızarıklık, pullanma ve epidermin kalınlaşmasıyla birlikte gelişen karakteristik egzamatöz lezyonlarla kendini gösteren kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Genetik faktörler hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır (25).

Malassezia türlerinin atopik dermatitli hastaların yanı sıra normal bireylerde de sıklıkla kolonize olmaları nedeniyle, bu tabloya katkılarının enfeksiyöz olmaktan çok duyarlılık reaksiyonuna sebep olan bir alerjen şeklinde olduğu düşünülmektedir (70). Erişkin hastaların %83'ünden kültüre edilmiş olması, hastaların antifungal tedaviye cevap vermeleri ve yama testinin pozitif olarak saptanması *Malassezia* türlerinin atopik dermatitle ilişkisini desteklemektedir (71,72,73).

- **Psöriasis**

Epidermin hiperproliferasyonu ve hiperkeratinizasyonu ile karakterize olan psöriasisde *Malassezia* türlerinin rolü hala tam olarak bilinmemektedir. Psöriasis olgularının çoğunda kafa derisi tutulumu bildirilmiştir (74). Kafa derisinde psöriasisi olan hastaların ketokonazole verdiği cevap, psöriasis-*Malassezia* ilişkisi hipotezini desteklemektedir (75). Psöriasisde genetik ve immünolojik mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir (76).

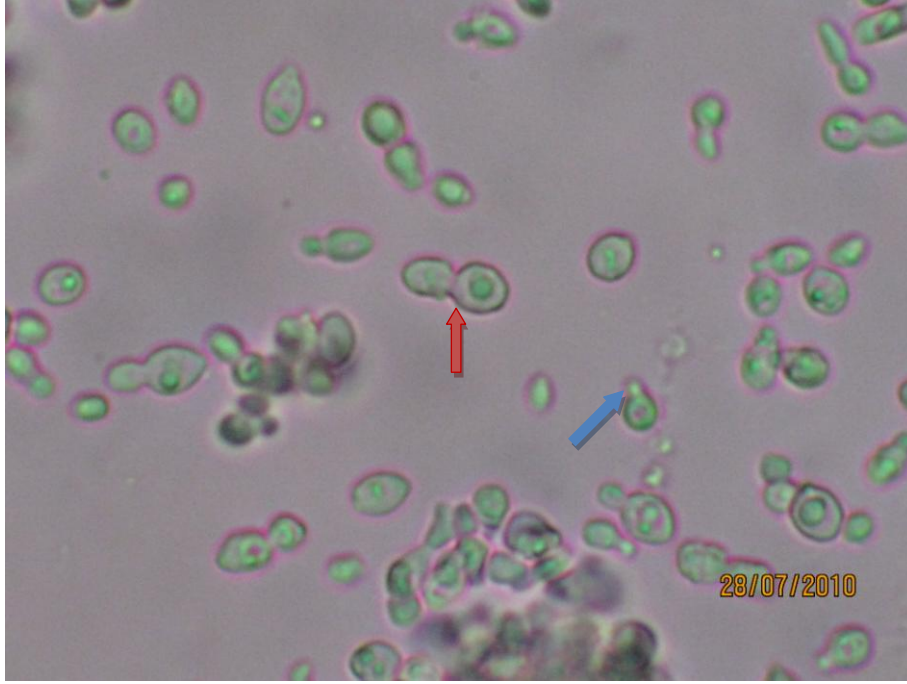
2.5. *Malassezia* Cinsinin Mikolojik Özellikleri

2.5.1. Hücre Yapısı

Malassezia cinsinin hücre duvarı yaklaşık 0,12 µm kalınlıkta olup temel olarak mannopteinler (%75-80), lipitler (%15-20) ve kitinden (%1-2) oluşmaktadır. Çok az miktarlarda nitrojen ve sülfür de içermektedir. *Malassezia* türlerinin hücre duvarı diğer birçok maya ile kıyaslandığında daha kalındır ve hücre hacminin yaklaşık %26-37'sini oluşturmaktadır. Araştırmacılar hücre duvarının çok katmanlı olduğunu göstermişlerdir (1,77,78). En dışta yer alan membran benzeri tabaka, iki elektron yoğun hat arasında olan elektron seyrek tabakadan oluşan lameller bir yapıdır. Lameller tabakanın mikroorganizmanın insan cildine ve kateterlere adezyonunda rolü olabilir. Sitoplazmik membran ise lameller tabakadaki çentiklere sıkıca bitişiktir. Mitokondri sayısı ve şekli (yuvarlak ya da oval) her hücrede farklılık göstermektedir. Granüler homojen nükleoplazma ile çevrili olan nükleus iyi sınırlı membrana sahiptir. Lipit içeren vakuollerin boyutları hücre yaşına göre değişmektedir (2).

2.5.2. Morfoloji

Malassezia hem maya hem hif şeklinde bulunabilen, normal deride ve kültürde özellikle maya şekli ile karşılaşılan bir mantardır (2). *M. globosa*, *M. furfur* ve *M. sympodialis*'in glisin, kolesterol ve kolesterol esterleri gibi katkıların eklendiği çeşitli besiyerlerinde *in vitro* olarak psödohiphal yapılar oluşturabildiği gösterilebilirken (5-8,11,41,79), diğer kökenler bu dönüşüm yeteneğinden yoksundur (80). Eşeysiz üreme tek kutuplu enteroblastik tomurcuklanma ile gerçekleşmektedir ve ana hücre yavru hücreden bir bölme ile ayrılmaktadır. Tomurcuk ana hücreden fisyon (transversal yönde bölme duvarı oluşturarak) ile ayrılır ve ana hücrede belirgin bir kopma yeri izi kalır (2). Tomurcuğun geniş dipli olması karakteristiktir, ancak dar da olabilmektedir (Şekil 2.2). Maya hücreleri küremsi, yumurtamsı, şişe veya silindirik biçimli iken, hifler kısa, kıvrık ve nadiren dallanma gösteren bir yapıdadır (2,5).



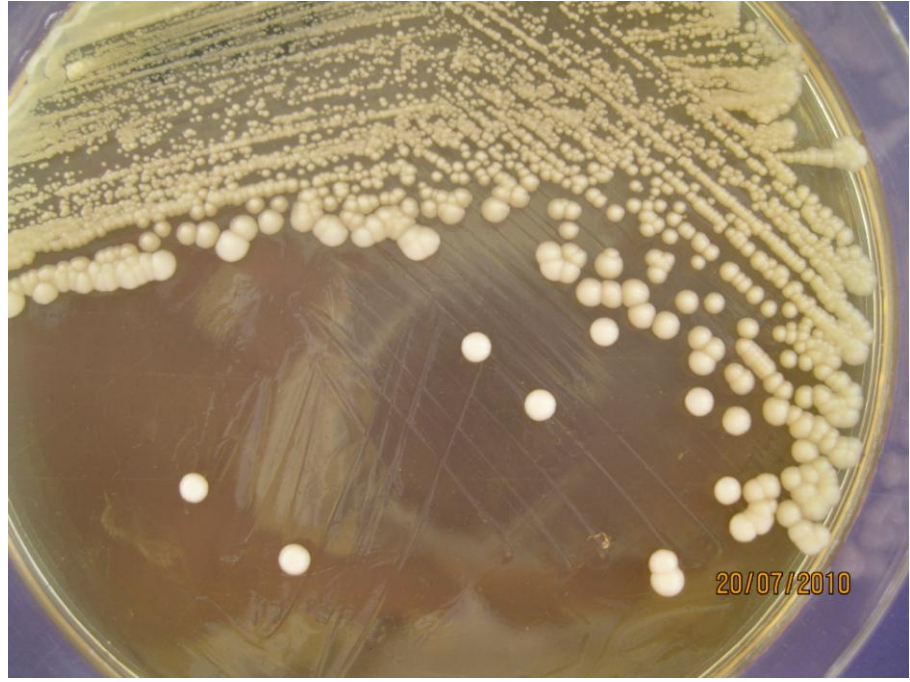
Şekil 2.2. Geniş (kırmızı ok) ve dar (mavi ok) tabanlı tomurcuklanan *Malassezia* mayaları (x40 büyütme, KOH ile inceleme)

2.5.3. Üreme Özellikleri

Malassezia türleri, *M. pachydermatis* hariç zorunlu lipofilik mantarlardır (2). Marr ve Shifrine *Malassezia* türlerinin miristik asit sentezindeki blok nedeniyle uzun zincirli yağ asidi sentezi yapamadıklarını göstermişlerdir (81). Bu nedenle *Malassezia* türleri *in vitro* olarak üretilibilmeleri için ekzojen olarak C12-C24 serisindeki yağ asitlerine ihtiyaç göstermektedirler. Üreme ortamına eklenen lipitler enerji kaynağı olarak değil hücrenin yapısal bileşenleri olarak kullanılırlar (2). Mikroorganizma insan derisinde bulunan lipitleri karbon kaynağı olarak kullanırken, eser elementlere, vitaminlere ya da elektrolitlere ihtiyaç duymamaktadır. Tercihen methionini sülfür kaynağı olarak kullanmakla birlikte sistin ya da sisteini de kullanabilir. Amino asitleri ve amonyum tuzlarını nitrojen kaynağı olarak kullanabilmektedirler (2,82).

Malassezia türleri normalde *in vitro* aerobik şartlar altında üremelerine rağmen, mikroaerofilik ve anaerobik şartlarda da üreyebilmektedirler. Üremeleri için lipit içeren özel besiyerine ihtiyaçları vardır. *M. pachydermatis* zorunlu lipofilik olmamasına karşın yağlı ortamda daha iyi üremektedir. %1 zeytinyağlı Sabouroud glukoz agarda (SGA) ve Litman oxgall besiyerinde 30-

35°C de üç gün inkübasyon sonunda üreme gözlenmektedir. Modifiye Dixon agar ve Leeming-Notman besiyerleri diğer özel besiyerleridir. Oda ısısında zayıf üreme gösterirler. Koloni yapıları genellikle krem-bej, düzgün yüzeyli maya kolonilerinden ibarettir (Şekil 2.3). Sadece *M. furfur* ve *M. sympodialis* gibi *Malassezia* türlerinin glisin, kolesterol ve kolesterol esterlerinin eklendiği çeşitli besiyerlerinde hif oluşturabildiği gösterilebilmiştir. Ancak, *Malassezia*'lar besiyerinde genel olarak hif yerine kısa germ tüpler oluştururlar (5,83).



Şekil 2.3. *Malassezia* türlerinin düzgün yüzeyli, krem rengi koloni yapısı (mDixon besiyerinde, 10 günlük üreme)

2.5.4. Biyokimyasal Özellikler

Malassezia türleri biyokimyasal olarak nispeten durağandır ve şekerleri fermente etmezler. Bu özellikleri *Malassezia* türlerinin bir basidiomycet olduğunu doğrulamaktadır (41). Bununla birlikte bu mayalar mikroorganizmaya karakteristik meyve kokusunu veren ve gamma laktonları da içeren birçok metabolit üretmektedir. Oleik asitli ortamda üretildiğinde diğer dikarboksilik asitlere ek olarak azeleik asit de üretmektedir. Azeleik asit,

reaktif oksijen moleküllerinin oluşumunun azalmasına ve aynı zamanda nötrofil inhibisyonuna sebep olmaktadır. Pityriasis versicolorda görülen hipo/depigmente değişikliklerde önemli olduğu düşünülen azeleik asit, melanogenezde anahtar enzim olan tirozinazın yarışmalı inhibitörüdür (83).

2.5.5. Virulans Faktörleri

- ***Malassezia* Türlerinin Pigmentleri:**

Malassezia türlerinin kommensal olarak yaşadığı organizmada hayatlarını devam ettirebilmeleri için konak savunmasına karşı koruyucu mekanizmalarının olması önemlidir. Kültürlerde ana nitrojen kaynağı olarak triptofan kullanıldığında *Malassezia* türleri florokromlar ve pigmentler üretmektedir. Bu pigmentler indol alkaloidleri olarak karakterize edilmektedir ve mikroorganizmayı UVA ve UVB radyasyonuna karşı *in vitro* korumaktadır (83). Melanize mantarların immünolojik cevaplar sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen moleküllerine karşı duyarlılıkları daha azdır. Kriptokoklar için önemli bir virulans faktörü olarak bilinen melanin üretiminin diğer bir patojen basidiomiçet olan *Malassezia* türlerinin de konak savunmasından korunmasında rol alması mümkündür. Bu mayanın da melanin benzeri pigmentinin (melanin-like pigment) varlığı *in vitro* ve *in vivo* olarak pityriasis versicolor ve seboreik dermatitli hastalarda rapor edilmiştir (41,83).

Malassezia türlerinin oluşturduğu diğer bir pigment olan pityrialactone, PV lezyonlarının Wood ışığı altında floresansından sorumlu olan bir alkaloidtir ve PV'nin diğer klinik belirtileri ile alakalı olacağı ön görülmektedir. Malassezin ise melanosit apoptozunu indükleyerek melanin sentezinde azalmaya neden olmaktadır ve bazı hastalarda lezyonların depigmentasyonuna katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Pityriarubin sınırlı inflamatuvar cevaptan kısmen sorumlu olduğu düşünülen, pityriacitrin ise *Malassezia* türlerinin UV ışınlarına karşı dirençli olmalarını sağlayan pigmentleridir (83).

- ***Malassezia* Türlerinin Enzimleri:**

Malassezia türlerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* lipolitik aktiviteye sahip olmaları lipaz üretimini göstermektedir. Lipaz hücre duvarında ve/veya

sitoplazmik membranda yer almaktadır (2). Lipaz üretimi, büyümenin logaritmik fazı sırasında ve deneysel olarak farklı optimum pH değerlerinde gerçekleşmektedir. *Malassezia* türlerinde hücre büyümesi için zorunlu olan en az üç farklı lipaz enzimi bulunduğu bildirilmiştir (84,85).

Malassezia türleri *in vitro* fosfolipaz da üretebilmektedir (86). Bu fosfolipaz aktivitesi Hep-2 hücrelerinden araşidonik asit salınımına neden olmaktadır. Araşidonik asit metabolitlerinin ciltteki inflamasyonda rol almasından dolayı *Malassezia* türlerinin neden olduğu cilt inflamasyonunu da tetikleyebileceği öne sürülmüştür (2).

Malassezia türleri ayrıca lipooksijenaz aktivitesi de gösterirler. Bu enzim serbest ve esterlenmiş yağ asitlerini, skualeni ve kolesterolü okside edebilmektedir. Lipoperoksitlerin üretimi sonucunda, PV'de görülen cilt pigmentasyon değişikliklerine sebep olan hücre membranı zararının ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (2).

2.6. *Malassezia* Türleri

2012 yılı itibarıyla gerek fenotipik ve gerekse moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmış ve bilimsel yayınlarda ifade edilmiş toplam 14 *Malassezia* türü bulunmaktadır. Bu türlerin mikrobiyolojik özellikleri aşağıda ve özet olarak Tablo 2.1'de verilmiştir.

2.6.1. *Malassezia furfur*

Malassezia furfur'un 4–5 mm çapında olan kolonileri, soluk, yumru şeklinde ya da çok az kıvrımlı, yağlı, düz, konveks ve kırılmalı yüzeyli iken kenarları çok az lobludur. Koloni yapısı yumuşaktır ve hücreleri kolaylıkla emülsifiye edilebilir. Maya hücreleri boyut ve şekil olarak farklılıklar gösterebilir. Silindirik, oval (2,5–8 × 1,5–3 µm) ya da yuvarlak (2,5–5 µm) olabilen maya hücreleri geniş tabanlı olarak tomurcuklanmaktadır. Bazı kültür koşulları altında uzunluğu 4,0–6,0 µm aralığında değişebilen filamentler üretebilen kökenleri de mevcuttur (22,41).

Malassezia furfur 37°C'nin üzerinde üreyebilmesi (maksimum 40°C), güçlü katalaz pozitifliği, beta glukozidaz aktivitesinin çok az olması ya da hiç

olmaması (eskülin testi), Tween 20, 40, 60, 80'de ve cEL varlığında eşit üreme özellikleri göstermesiyle tanımlanabilir. Aslında *M. furfur*'un üremesi için lipit desteği gerekmesine rağmen bu türün lipit bağımlılığı diğer türlerden daha zayıftır. Mayser ve ark. *M. furfur*'un üremesi için castor yağının ve risinoleik asidin yeterli olduğunu göstermişlerdir (22,41).

2.6.2 *Malassezia pachydermatis*

Malassezia cinsi içinde tarihsel olarak ikinci tanımlanmış türdür. Konvansiyonel besiyerlerinde, örneğin SGA ya da mikosel agarda üreyebilme özelliği ile diğer tüm *Malassezia* türlerinden farklıdır. Lipofilik bir türdür, ancak peptonlu besiyerlerindeki basit lipitlerin varlığında üreyebilir. *Malassezia pachydermatis* mDixon agarda da üreyebilir. Kolonileri mat yüzeyli, zor emülsüfiye edilebilen, genellikle kırılğan, kalın, sarımsı, krem rengi, konveks, kenarları düz ya da dalgalı yapıdadır. Geniş tabanlı, tek kutuplu olarak tomurcuklanan, kısa silindirik ya da elipsoid olabilen, 4–5 × 2–2,5 µm çapında küçük hücrelerden oluşmaktadır. Misk kedisinden izole edilmiş pembe renkli kolonisi olan izolatlar da rapor edilmiştir (79). *M. pachydermatis*'in hem primer kültürde üremek için lipit bağımlı olan, hem de pasajlar sonrasında lipit bağımlı hale gelen ve lipit bağımlı olarak kalan atipik izolatlarının bulunabilmesi nedeniyle *Malassezia* türlerinin insan ve hayvan kaynaklı bütün epidemiyolojik çalışmaları, lipit içerikli besiyerinde gerçekleştirilmelidir (79,87). Bu farklılıklara rağmen *M. pachydermatis* taksonomik olarak henüz tek bir türdür. SGA'da üreyebilme, 37°C'de ve 40°C'de tüm izolatların üremesi, katalaz ve beta glukozidaz aktivitelerinin zayıf olması ya da hiç olmaması, Tween 20, 40, 60, 80'de ve cEL varlığında eşit büyüme özellikleri göstermesiyle fenotipik olarak tanımlanabilir (22,41).

Malassezia pachydermatis özellikle prematür infantlarda sepsise sebep olmakla birlikte, insanlardan nadir olarak izole edilmektedir ve ciltten izolasyonu tesadüfi olarak görülmektedir. Buna karşılık seboreik dermatitten ve özellikle köpeklerde otitten sorumlu olduğu bilinmektedir (22).

2.6.3. *Malassezia globosa*

Morfolojik özelliklerine göre daha önce 1951 yılında Gordon tarafından *P. orbiculare* olarak adlandırılmış türdür. Kolonileri derin kıvrımlı, yüzeyi kaba, 3–4 mm çapında, krem renginden açık sarıya değişebilen renklerde, parlak ya da soluk görünümlü, kırılğan ve kenarları çok az loblu bir yapıdadır. Emülsifiye edilmesi özellikle güçtür. Primer kültürde kolonilerin etrafında bolca kristal presipitat oluşumu görülebilir. Maya hücreleri tek kutuplu ve dar tabanlı tomurcuklanır, 2,5–8 µm çapında ve küreseldir. *Candida albicans*'ın germ tüplerine benzeyen kısa filamentler özellikle primer kültürde görülebilir. Diğer taraftan PV kazıntılarında psödohifler neredeyse her zaman mevcuttur. *M. globosa* 37°C'de ürememesi veya çok zayıf üremesi, eskülünü hidroliz etmemesi ve Tween 20, 40, 60, 80'i ve cEL'yi asimile etmemesiyle tanımlanabilir. Taze izolatlar özellikle Tween 20 veya 80'de olmak üzere zayıf koloniler üretebilirler. Tween 40 ve 60 etrafında beyaz presipitat oluşumları görülebilmektedir. *Malassezia globosa*, başta *Malassezia sympodialis* olmak üzere *M. furfur*, *M. slooffiae* ya da *M. restricta* ile sıklıkla beraber görülmektedir. Bazen atlardan ve evcil geniş getiren hayvanlardan da izole edilebilmektedir (22,41).

2.6.4. *Malassezia slooffiae*

Özellikle domuz cildinden izole edilebilen, insan cildinde daha az sıklıkla bulunan bir türdür. Koloni morfolojisi *M. furfur* olarak yanlış tanımlanabilir. Oldukça kıvrımlı kenarlara sahip, 3–4 mm çapında, soluk kahverenginden sarıya kadar değişebilen, parlak yüzeye sahip olan kolonileri mevcuttur. Küçük, kısa ve silindirik maya hücreleri 1,5–4 × 1–2 µm çapındadır ve tek kutuplu geniş tabanlı tomurcuklanma yapmaktadır. Katalaz aktivitesine ve *M. furfur* gibi 40°C'ye kadar sıcaklıkta üreyebilme özelliğine sahiptir. Eskülünü hidroliz etmez, Tween 80'de zayıf üreme gösterirken, diğer üç Tween üremesi eşit ve güçlüdür. Cremophor EL'de ürememektedir (22).

2.6.5. *Malassezia obtusa*

M. furfur ile fizyolojik olarak olmasa da morfolojik olarak karışabilen bir türdür. 1,5–2 mm çapında, konveks, yüzeyi düz, parlak ya da mat olabilen kolonilerinin kenarları loblu bir görünüme sahiptir. 4,0–6,0 x 1,5–2,0 µm çapında, silindirik ya da romboid şeklinde olan hücreler tek kutuplu ve geniş tabanlı tomurcuklanır. *Malassezia* cinsi içerisinde en büyük silindirik hücrelere sahiptir ve bu silindirik hücreler ana hücreden tomurcuklanırken 10 µm uzunluğuna kadar ulaşabilir. Katalaz pozitifdir ve 37°C'de üreyemez. Tween 20, 40, 60, 80'i ve cEL'yi kullanmamaktadır, ancak Tween 40 ve 60'ın etrafında üremeyi taklit eden beyaz presipitasyon görülebilir. *Malassezia obtusa* güçlü beta glukozidaz aktivitesi ile diğer özelliklerinin aynı olduğu *M. globosa*'dan kolaylıkla ayırt edilebilir (22,41).

2.6.6. *Malassezia sympodialis*

İdentifikasyonu kolay bir tür olan *M. sympodialis* 6–8 mm çapında, sıklıkla orta kısmı yükselmiş, düz ve geniş koloniler oluşturur. Rengi kremden soluk sarıya kadar değişebilen koloniler düz ve parlak yüzeyli, homojen yapıda ve kenarları kıvrımlıdır. Kolaylıkla emülsifiye edilebilir. *M. sympodialis*'in taze izolatları mDixon besiyerinde ana kolonilerin etrafında kontaminasyonu andıran kristal presipitatlar yapmaktadır. 2,5–4,0 x 1,5–3,5 µm boyutlarında olabilen küçük, ovoid maya hücreleri dar tabanlı tomurcuklanırlar. Aynı bölgeden simpodiyal tomurcuklanmanın sonucu olarak maya “yonca yaprakları” görünümü alır. 37°C'de üreyebilmesi, katalaz pozitifliği, eskülini hidrolize edebilmesi (güçlü beta glukozidaz aktivitesi) ile rutinde kolaylıkla tanımlanabilir. Tween 20, 40, 60 ve 80'i asimile edebilen *M. sympodialis*, sadece cEL'yi zayıf olarak asimile etmektedir ve etrafında zayıf kolonilerden ibaret olan bir halka oluşturabilir (22,41).

2.6.7. *Malassezia restricta*

Bu türün “*restricta*” olarak adlandırılması zayıf biyokimyasal performansından kaynaklanmaktadır. Kolonileri çok yavaş üreme gösteren, düzensiz, küçük, yaklaşık 1–2 mm çapında, sarı-krem rengi, sert, kırılğan

yapıda olup kenarları loblu görünümündedir. 2,5–4 x 1,5–3 µm çapında, küresel ya da oval olabilen hücreler, nispeten dar tabanlı, tek kutuplu tomurcuklanma yaparlar. Mikromorfolojisinin *M. sympodialis*'e benzemesine rağmen, koloni makromorfolojisinin farklı olması tanımlamada avantaj yaratmaktadır. İdentifikasyonunda, lipit bağımlı türler arasında katalaz aktivitesi negatif olan tek tür olması özellikle kullanılmaktadır. Bu yüzden bu test, *Malassezia* kolonilerinin identifikasyonunda ilk basamak olarak kullanılmaktadır. Tween 20, 40, 60, 80 ve cEL'de üreyemez ancak Tween 40 ve 60 etrafında beyaz bir disk şeklinde presipitat oluşumu gözlemlenebilir. Diğer özellikleri; 37°C'de ürememesi, eskülünü hidroliz edememesi olarak belirlenmiştir (22,41).

2.6.8. *Malassezia dermatis*

Malassezia dermatis'in 5–6 mm çapında, yüzeyi düz ve merkez kısmında sivriliği mevcut olan, kırılğan, parlaktan mata kadar değişebilen ve soluk, sarı-beyaz renkli olan kolonilerinin kenarları oldukça kıvrımlı görünümündedir. Bazen bu kolonilerinin etrafında kristal presipitatlar da görülebilmektedir. 3,8–4,8 x 2,5–3,2 µm çapında yuvarlak, oval ya da elipsoid olan hücreleri tek kutuplu, simpodiyal ve geniş tabanlı tomurcuklanma yapmaktadır. İlk olarak atopik dermatitli hastalardan izole edilmiş olan *M. dermatis*, 26S ribozomal DNA ve internal transcribed spacers (ITS) dizilerinin analizine göre *Malassezia sympodialis* ile çok yakın benzerlik gösterir ve iki tür arasındaki rDNA farklılığı %1,2'dir. *M. dermatis*, 40°C'de ürememekte ve dört çeşit Tween'i de asimile etmektedir. Ancak katalaz pozitifdir, eskülünü hidrolizi yapamaz ve cEL'de üreyemez (22,41).

2.6.9. *Malassezia nana*

Rengi kremden sarıya kadar değişebilen, 1,5–2 mm çapında, konveks, yüzeyi düz, kırılğan yapıdaki kolonilerinin kenarları dar kıvrımlara sahiptir. Bazen kolonilerinin etrafında, agar içerisinde kristal presipitatlar görülebilmektedir. Oval ya da yuvarlak olabilen 3,0–4,0 x 2,0–3,0 µm çapındaki hücreleri tek kutuplu ve nispeten dar tabanlı tomurcuklanmaktadır. Hayvanlardan izole edilen bir tür olan *M. nana*, eskülünü hidroliz etmez ve

katalaz pozitifdir. *M. nana* cEL'de üremez. 37°C'de üreyebilirken, 40°C'de üreyemez. Tween 40, 60 ve 80'i asimile edebilirken, Tween 20'de deliğin biraz uzağında muntazam bir halka oluşturur. Sığırlardan izole edilen bir *M. nana* kökeni ilginç olarak Tween 20'de de tam üreme göstermektedir ki, bu durumda 37°C'de üreyebilme özelliği bu mayanın *M. caprea*'dan ayrılmasında önemlidir (17,22,41).

2.6.10. *Malassezia japonica*

Internal transcribed spacer ve 26S ribozomal DNA dizilerinin analizi ile 2002 yılında atopik dermatitli bir hastadan tanımlanmış olan bir *Malassezia* türüdür. Mat, yüzeyi sarı ya da krem rengi olabilen, kırılğan, 2–3 mm çapında olan kolonilerinin kenarları dalgalı bir yapıdadır. Kısa silindirik hücreleri 3,0–3,5 × 2,0–2,5 µm çapında olup, tek kutuplu ve geniş tabanlı tomurcuklanmaktadırlar. İdentifikasyonu ayırt edici özelliklerinden ötürü kolaylıkla yapılabilmektedir. Tween 60 ve 80'i asimile edebilirken, Tween 20'de deliğin biraz uzağında muntazam bir halka şeklinde üreme görülür ve Tween 40'da deliğin biraz uzağında zayıf üreme gösterir. 40°C'de üreyememesi, cEL'de zayıf üreme göstermesi ve eskülin pozitif olması önemli özellikleridir (41). Ayrıca spesifik primerleri kullanan nested PCR ile *M. japonica* DNA'sı tespit edilebilmektedir (16).

2.6.11. *Malassezia yamatoensis*

Sarımsı beyaz, yarı parlak, yüzeyi kırışık veya bazen yarıklı olabilen 3-4 mm çapındaki kolonilerinin kenarları dalgalı bir yapıya sahiptir. 3–4 × 2,4–3 µm çaplı kısa silindirik şekildeki maya hücreleri dar tabanlı, tek kutuplu tomurcuklanmaktadır. Tween 20, 40, 60 ve 80'i asimile edebilme, 37°C'de üreyebilme ve 40°C'de ürememe özellikleri vardır. Katalaz aktivitesi pozitifdir. Eskülin testi negatiftir. Cremophor EL ile belli belirsiz üreme gösterebilir (22,41). Eskülin testinin negatif oluşu ve 40°C'de ürememe özellikleri ile *M. sympodialis*'ten ayrılmaktadır. Ayrıca *M. yamatoensis* spesifik primerlerin kullanıldığı nested PCR yöntemi ile de moleküler olarak tanımlanabilir (18).

2.6.12. *Malassezia equina*

Atlardan izole edilen *M. equina* (eski adı *M. equi*) ribozomal DNA dizi analizlerine göre yeni bir tür olarak 2007 yılında yayınlanmıştır. *Malassezia equina* da *M. dermatis*'te olduğu gibi *M. sympodialis*'e filogenetik olarak çok yakındır (22). *Malassezia equina*'nın 2–3 mm çapında, krem rengi ve yüzeyi kıvrımlı, kırılğan kolonilerinin kenarları kıvrımlı, saçaklı bir yapıya sahiptir. *M. sympodialis* ve *M. dermatis*'te olduğu gibi kolonilerinin etrafında kristal presipitatlar görülebilir. 3,0–4,5 × 2,2–3,5 µm boyutlarında, tek kutuplu, dar tabanla tomurcuklanan elipsoid veya oval şekilli hücreleri vardır. Katalaz pozitif olan bu maya eskülünü hidroliz edemez ve Tween 40, 60 ve 80'de üreme gösterirken, Tween 20'de kuyucuğun biraz uzağında muntazam bir halka şeklinde üreme görülür. *M. equina* cEL'yi asimile etmez, ancak bazen bu bileşiği içeren kuyucuğun etrafında zayıf presipitat oluşumu görülebilir. 40°C'de üreme göstermez (41). *M. equina*, *M. nana* ve *M. japonica* Tween 20 etrafında halka şeklinde üreme gösteren türlerdir. *M. equina*'nın *M. nana* ve *M. japonica*'dan ayrımı eskülün aktivitesinin negatif oluşu, hücre şekilleri ve tomurcuklanma paternlerine göre yapılmaktadır (22,41).

2.6.13. *Malassezia caprae*

Çoğunlukla keçilerden izole edilen *M. caprae* ribozomal DNA dizi analizlerine göre yeni bir tür olarak 2007 yılında yayınlanmıştır. 1–2 mm çapında, beyaz ya da krem renginde olabilen, loblu, küçük kolonilere sahiptir. Hücreleri 2,5–4 × 2,2–3,5 µm boyutlarında, yuvarlak, oval ya da romboid şekillerde gözlenebilir. Katalaz pozitif olan bu tür eskülünü hidroliz eder ve Tween 20, 40, 60 ve 80'de üreme gösterir. Bazen Tween 80'deki üreme zayıf olarak görülürken, Tween 20'deki üreme de geç gözlenebilir. *M. caprae* cEL'de üreme göstermez, ancak bazen bu bileşiği içeren kuyucuğun etrafında zayıf presipitat oluşumu görülebilir. 37°C ve 40°C'de üreme göstermez (41).

2.6.14. *Malassezia cuniculi*

En son tanımlanan *Malassezia* türüdür. Cabañes ve ark. 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada tavşan derisinden izole ettikleri *Malassezia* kökeninin 26S rRNA geninin D1/D2 bölgesi ve ITS-5.8S rRNA gen sekans analizi ile *Malassezia cuniculi*'yi tanımlamışlardır (21). *Malassezia cuniculi* küçük, <0,5–1 mm çapında, beyazımsı ya da krem rengi olabilen konveks kolonilere sahiptir. 2–5 µm çapında ve sferik olan hücreleri tek kutuplu ve dar tabanlı tomurcuklanmaktadır. Katalaz pozitif olan bu tür, eskülini hidroliz eder. Tween 20, 40, 60, 80'de, cEL besiyerinde, 37°C'de ve 40°C'de üreme göstermez (21).

Tablo 2.1. Ondört *Malassezia* Türünün Ayırtedici Özellikleri

Türler	Tween Asimilasyon Testleri				cEL'de üreme	Eskülin hidrolizi	Katalaz reaksiyonu	Üreme			Kristal presipitat oluşumu
	T20	T40	T60	T80				SGA	37°C	40°C	
<i>M. furfur</i>	+	+	+	+	+	-(z)	+	-	+	+	-
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+(+)	+	+	+	+	-
<i>M. globosa</i>	-	-;b	-;b	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>M obtusa</i>	-	-;b	-;b	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. dermatis</i>	+	+	+	+	-;b	-	+	-	-	-	+
<i>M. caprea</i>	+	+	+	+	-;b	+	+	-	-	-	-
<i>M. japonica</i>	-	z	+	+	z	+	+	-	+	-	-
<i>M. nana</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>M. equina</i>	-	+	+	+	-;b	-	+	-	+	-	+
<i>M. yamatoensis</i>	+	+	+	+	z	-	+	-	+	-	-
<i>M. slooffiae</i>	+	+	+	z	-	-	+	-	+	+	-
<i>M. sympodialis</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>M. restricta</i>	-	-;b	-;b	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

T: Tween, cEL: cremophor EL, SGA: Sabouraud glukoz agar, (+): pozitif, (-): negatif, (z): zayıf, b: beyaz presipitat

Not: 20-22,41 no'lu kaynaklar kullanılarak tablo hazırlanmıştır.

2.7. Laboratuvar Tanı

Malassezia türlerinin sebep olduğu kutanöz patolojiler dermatologlar tarafından kolayca tanınacak kadar karakteristiktir. Hem bu nedenle hem de etkeni kültürde üretmek için özel besiyerlerine ihtiyaç olduğundan dolayı, dermatologlar epidemiyolojik/mikrobiyolojik çalışmalar dışında genellikle lezyonlardan mantarın izole edilmesini talep etmezler. Bunun yerine klinik görünüm ve lezyonlardan alınan materyalden direkt mikroskopik inceleme yoluyla tanı koymayı tercih ederler. Ancak, kültür yapılması tür düzeyinde tanımlama, antifungal duyarlılık testi, filogenetik/epidemiyolojik amaçlı incelemeler için zorunludur.

2.7.1. Örnek Alınması ve Taşınması

Klinik olarak şüphelenilen cilt lezyonununun %70 etil alkol ile temizlenmesini takiben lezyon kenarından steril bistüri yardımı ile alınan deri kazıntı örnekleri, eküvyon yardımıyla nemli bölgelerden alınan sürüntü örnekleri, yenidoğan ünitesinden gelen kan ve steril vücut sıvıları ve total parenteral nütrisyonla beslenen hastalara ait kateter uçları steril petri kutuları veya tüpler içerisinde laboratuvara ulaştırılır. Steril yapışkan bant yöntemi (OpSite Smith&Nephew Media, İngiltere) örnek almada kullanılabilir alternatif bir diğer yöntemdir (88). Laboratuvar istem kâğıdına olası klinik ön tanı not edilmelidir.

2.7.2. Mikroskopik İnceleme

Kazıntı örnekleri lam/lamel arasında %10-15'lik KOH solüsyonu ile muamele edilir ve böylece keratinize dokular uzaklaştırılır. Preparatın mikroskopik incelemesinde (x40) bölmeli, 1,5–4 µm çapında, düz veya eğri, seyrek olarak dallanabilen hiflerle, 3–8 µm çapında, az çok yuvarlak, tomurcuklanma gösterebilen mayaların varlığı karakteristik “köfte ve spagetti” görünümünü ortaya çıkarır (6,42). Tekrarlayan, tek kutuplu tomurcuklanmalar ana hücrede çok tipik kalıcı bir iz (skar) bırakır. En tatmin edici mikroskopik inceleme, kazıntı örneğinin mürekkep (Parker kalıcı mavi ve siyah boyası) ve %10-15 KOH içeren karışımla incelendiği zaman sağlanmaktadır. Albert

solüsyonu da (toluidin mavisi 0,15 g, malaşit yeşili 0,2 g, glasiyal asetik asit 1 ml, %95'lik etanol 2 ml ve distile su 110 ml) alternatif olarak bu amaçla kullanılabilir (3). Doğrudan mikroskopik incelemeye ilave olarak örnek PAS, immünoperoksidaz gibi histokimyasal boyalarla boyanabilir (42). Laboratuvar floresan mikoskobuna sahipse, kalkoflor beyazı yöntemi de kullanılabilir.

2.7.3. Kültür

Malassezia furfur'un insanlarda ve *M. pachydermatis*'in hayvanlarda tanımlanmış olduğu dönemde kültürden izolasyon yapmaya gerek görülmemiştir. Daha sonraları *Malassezia* türleri derideki kepeklerden ve diğer enfekte materyallerden Sabouraud besiyerinde (glukoz %2, pepton %1, agar %2) veya zeytinyağı eklenmiş Sabouraud besiyerinde üretilmiştir. Her iki besiyerine de bakteri ve maya kontaminasyonunu önlemek için sırasıyla %0,5 kloramfenikol ve %0,5 siklohekzimit ilave edilmiştir. Lipit bağımlı olmayan tür olarak bilinen *Malassezia pachydermatis*'i üretmek için Sabouraud besiyeri yeterli görülebilir, ancak bazı *M. pachydermatis* kökenlerinin de lipit bağımlı olabileceği veya pasajlarla bağımlı hale gelebilecekleri akılda tutulmalıdır. Sabouraud besiyeri, %1 zeytinyağı ilave edilmesiyle, lipit bağımlı türlerin izolasyonu için de çok kullanışlı hale gelmiştir. Taksonomik incelemede zeytinyağının birkaç tür için toksik olduğunun görülmesi üzerine daha seçici yeni besiyerleri geliştirilmiştir (22).

Lipofilik *Malassezia* türlerini üretmek amacıyla geliştirilmiş özel besiyerlerinden ilki 1964'te Van Abbe (89) tarafından tanımlanan Dixon besiyeri (malt özütü agar %6, öküz safrası %2, Tween 40 %1, gliserol monooleat %0,25, streptomisin sülfat 40 µg/ml, siklohekzimit 250 µg/ml ve distile su) ve bu besiyerinin modifiye formülüdür. Modifiye Dixon besiyeri; malt özütü %3,6, pepton %0,6, öküz safrası %2, Tween 40 %1, gliserol %2, oleik asit %0,2 ve %1,2 agardan oluşmaktadır (22). 1987'de ise Leeming ve Notman tarafından tanımlanan ve kendi adları ile anılan özel besiyeri (pepton 10 g, glikoz 5 g, maya özütü 0,1 g, öküz safrası 4 g, gliserol 1 ml, gliserol monostearat 0,5 g, agar 12 g, Tween 60 0,5 ml, tam yağlı inek sütü 10 ml,

kloramfenikol 50 µg/ml, sikloheksimit 200 µg/ml, distile su 1000 ml, pH=6,2) tanımlanmıştır (90). *Malassezia* mayaları sıcakkanlı hayvanların normal florasının bir üyesi olduğu için besiyerlerine kloramfenikol ve sikloheksimit ilave edilmesi tavsiye edilmektedir. Modifiye Dixon (mDixon) besiyerinin Leeming-Notman besiyerine göre avantajı, koyu rengiyle koloni sayımına kolaylık sağlaması ve özellikle birkaç türün birlikte mevcudiyetinde morfolojilerinin daha iyi tanımlanmasına olanak sağlayabilmesidir. Bu sebeple araştırmacılar çalışmalarında modifiye Dixon besiyerini tercih etmektedirler (22).

Taksonomik revizyon çalışmaları öncesinde kültürler sistematik olarak 37°C'de bir hafta/on gün süreyle inkübe edilirken, 37°C'de inkübasyonda birkaç türün üremesinin inhibe olduğunun gösterilmesinden sonra kültürlerin normal atmosferik şartlarda 30 ile 32°C arasında inkübe edilmesi önerilmiştir. Üremenin maksimum sıcaklığını göstermenin dışında 37°C ve yukarısı artık kullanılmamaktadır (22).

- **Kan Kültüründe *Malassezia***

Fungemi ve sepsis etkenleri arasında *Malassezia* türleri yaygın olmadığından, enfeksiyonu tanımlayabilmek için şüpheli davranılması gerekmektedir. *Malassezia* fungemisinin son 20 yılda artış göstermesine karşın, özel üreme gereksinimleri nedeniyle sıklığının bildirilenlerden daha fazla olması muhtemeldir. Kateter ilişkili *Malassezia* fungemisi ve invaziv enfeksiyonlar için kritik hastalar, prematüre yenidoğanlar ve her yaştan immün baskılanmış bireyler risk altındadır. Özellikle intravasküler kateter ve lipit içeren parenteral beslenme uygulamaları riski artırmaktadır. Literatürlerde invaziv enfeksiyonlar için baskın olarak rapor edilen türler *M. furfur* ve *M. pachydermatis*'dir (41).

Malassezia türleri kan ve ilişkili diğer örneklerde direkt mikroskopi, kültür ve moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilebilir. Kateterden alınan kan örneklerinin mikroskopik incelenmesinde Giemsa veya Gram boyama yöntemleri faydalıdır ve *Malassezia* türlerinin üremesini destekleyen lipit içerikli besiyerlerinde kültüre edilmeleri için ipucu olur (41).

BacT/Alert (BioMérieux, Fransa) BTA SA, BTA SN ve BTA FN şişeleri, BACTEC (Becton Dickinson [BD], ABD) MYCO/F LYTIC kültür şişeleri ile Isolator (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ, ABD) kan kültür sistemlerinin *Malassezia* türlerinin üremesini desteklediği ile ilgili bilgi mevcut olsa da (91-93), mevcut ticari kan kültür sistemlerinin çoğu *Malassezia* türlerinin üremesini desteklememektedir. Bu nedenle, gerekli durumlarda kan kültürü şişelerine %3 (ağırlık/hacim) oranında palmitik asit eklenmesinin *Malassezia* türlerinin tanımlanmasına katkıda bulunacağı ifade edilmektedir (94); ancak kültüre dayalı yöntemlerin zaman alıcı olması hızlı tanıyı engellediğinden, *Malassezia* dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısı açısından moleküler yöntemlerin kullanılması iyi bir alternatif olarak görülmektedir (41).

2.7.4. Tür Düzeyinde Tanımlama

Malassezia türlerinin tanımlanmasında moleküler biyolojik tekniklerin çok güvenilir olmasına rağmen, çoğu klinik laboratuvarında bu şartların olmamasından dolayı kültüre dayanan geleneksel yöntemler kullanılarak identifikasyonları yapılmaktadır. *Malassezia* türlerinin çoğu üreme karakterlerine, vücuttaki tutulum yerlerine, koloni morfolojilerine, üreme sıcaklıklarına, katalaz aktivitesine, Tween asimilasyon paternlerine, cEL kullanma ve eskülin hidrolizi (β -glukozidaz) aktiviteleri gibi fenotipik özelliklerine dayanan çeşitli rutin teknikler kullanılarak kolaylıkla tanımlanabilirler (Tablo 2.1).

• Tween Asimilasyon Testleri

Esansiyel yağ asitleriyle suda çözünebilir hale getirilmiş polisorbata deriveleri olan Tween bileşiklerinin *Malassezia* türleri tarafından asimilasyon paternleri türler arasında farklılık gösterir (41). Ticari ismi genel olarak Tween olan bu derivelerin kimyasal yapıları aşağıdaki gibidir (95).

Tween 20 (Polysorbate 20): Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

Tween 40 (Polysorbate 40): Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate

Tween 60 (Polysorbate 60): Polyoxyethylene sorbitan monostearate

Tween 80 (Polysorbate 80): Polyoxyethylene sorbitan monooleate

Tween türevleri SGA besiyerine tek lipit kaynakları olarak ayrıca eklenir. *Malassezia* mayaları ile yaklaşık 10^7 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan süspansiyon SGA besiyeri ile katılaştıktan hemen önce, besiyeri yaklaşık 45°C civarına soğutulduğunda karıştırılır ve bu karışım plaklara dökülür. Besiyeri katılaştıktan sonra 3 mm çapında 4 ayrı kuyucuk açılarak bu kuyucukların her birine ayrı ayrı Tween 20, 40, 60 ve 80 solüsyonlarından 5-15 µl hacminde dökülür (Şekil 3.1). Bazı uygulamalarda ise çevredeki bu dört Tween bileşiğine ilave olarak merkeze açılan beşinci kuyucuk yoluyla cEL'nin de birlikte test edilmesi tercih edilmektedir (32,41).

Plaklar 32°C'de 7 gün inkübe edilir. Hangi Tween asimile edilmiş ise o Tween bileşiğinin bulunduğu kuyucuk çevresinde gözlenen üremeye göre Tween kullanım paternleri "üreme oldu/üreme olmadı/deliğin biraz uzağında halka şeklinde üreme/deliğin biraz uzağında zayıf üreme" şeklinde değerlendirilerek kayıt edilir (27).

Tween asimilasyon testlerinin gerçekleştirilmesinde alternatif bir yöntemde ise, hazırlanan maya süspansiyonu SGA besiyeri içine karıştırılmaz, bunun yerine tamamen katılmış SGA besiyeri yüzeyine homojen olarak sürülür (32).

- **Cremophor EL (Polyethoxilated Castor Oil, Polietilenoksitlenmiş Hint Yağı) Asimilasyonu**

Cremophor EL, bir mol hint yağı ile 35 mol etilen oksitin reaksiyona girmesi ile oluşur. Oluşan ürün bir karışımdır. Temel bileşeni, polietilenglikol eterlerini oluşturmak için etilen oksitlenmiş hint yağı trigliseritlerinin hidroksil gruplarının olduğu materyaldir. Minor bileşeni ise risinoleik asidin polietilen glikol esterleri, polietilen glikoller ve gliserolün polietilen glikolleridir. Cremophor EL sentetik, iyonsuz sürfaktandır (96). *Malassezia* türleri arasında cEL'yi tek lipit kaynağı olarak asimile edebilme özelliği farklılık gösterdiğinden, bir tanımlama testi olarak kullanılır.

Tanımlanacak *Malassezia* kökeni kültürde saf olarak üretildikten sonra steril öze yardımı ile cEL yatık besiyerine ekilir. Aerop koşullarda, 32°C'de 7-10 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra üreme sonuçları günlük olarak takip edilir ve üremenin olması cEL'i kullanma özelliği bakımından pozitif olarak

kaydedilir (97,98). İstenirse cEL asimilasyon testi, cEL'in SGA besiyeri içerisine eklenmesi yerine, Tween test plaklarında açılacak beşinci kuyucuk içerisine cEL'nin damlatılmasıyla da test edilebilir (41).

- **Katalaz Reaksiyonu**

Katalaz, hidrojen peroksidi (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) ayıran bir enzimdir. İncelenecek mikroorganizma kolonisi üzerine H_2O_2 damlatarak hava kabarcığı (O_2) oluşup oluşmadığı gözlenir. Kültürde üreyen kolonilerden bir tanesi temiz bir lam üzerine transfer edilir. Üzerine bir damla %3'lük H_2O_2 damlatılır. Hidrojen peroksit damlatıldıktan hemen sonra hava kabarcığı oluşuyorsa deney pozitifdir. Katalaz testi, agar yüzeyindeki koloniler üzerine bir damla %3'lük H_2O_2 damlatılarak da yapılabilir. *M. restricta* katalaz negatif olan tek *Malassezia* türüdür. Bu biyolojik özelliğin araştırılması *Malassezia* tanımlama şemalarında bu nedenle genellikle ilk test olarak kullanılır (97,98).

- **Eskülin Hidrolizi Testi**

Malassezia türlerindeki β -glukozidaz aktivitesi ile eskülinin hidrolizi sonucunda eskületin oluşumu esasına dayanan bir testtir. Eskületin, ferrik sitrat ile reaksiyon vererek kahverengi-siyah bir ürün oluşturmaktadır (99). Steril iğne öze ile koloninin merkezine dokunulur. Eskülin agarın yüzeyine pasajlanır. $32^\circ C$ 'de, yedi gün süreyle inkübe edilir. Günlük olarak kültürde üreme ve eskülin hidrolizine bağlı siyahlaşma olup olmadığı kontrol edilir. Genellikle 48 saat içinde siyahlaşma meydana gelir (97,98).

- **SGA Besiyerinde Üreme Testi**

Malassezia pachydermatis lipit bağımlı olmadığı için standart SGA besiyerinde üreyebilmesi ile diğer *Malassezia* türlerinden kolaylıkla ayrılabilir. mDixon besiyerinde üreyen mayalar SGA besiyerine steril öze yardımıyla pasajlanır ve aerop koşullarda, $32^\circ C$ 'de 7-10 gün inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda SGA besiyerinde üreme görülmemesi lipofilik maya varlığını gösterir (98).

- **$37^\circ C$ ve $40^\circ C$ 'de Üreme Testi**

Malassezia türlerinin standart inkübasyon sıcaklığı $30-32^\circ C$ 'dir. Bunun yanı sıra bazı *Malassezia* türleri sadece $37^\circ C$, bazıları ise hem $37^\circ C$ hem de $40^\circ C$ 'de üreyebilmektedir (Tablo 2.1) (97).

- **Presipitat Oluşumunun İncelenmesi**

Malassezia türlerinin identifikasyon tablo ve şemalarında genellikle ayırt edici bir karakteristik olarak belirtilmeyen presipitat oluşumu iki şekilde ortaya çıkar. “Kristal presipitat” olarak adlandırılan fenomen, mDixon besiyerindeki kültürlerde, kolonilerin çevresinde, agar içerisinde kontaminasyonu andırır şekilde bir patern olarak dikkati çeker. “Beyaz presipitat” olarak adlandırılan diğer fenomen ise SGA besiyerinde Tween ve/veya cEL kuyucuklarının çevresinde, agar içerisinde, üreme olmaksızın üreme varmış hissi uyandıran bir görünüm olarak ortaya çıkar (41).

2.7.5. Moleküler Tanı

Üremesi için kompleks bir besiyerine ihtiyaç duyması ve seksüel fazın birçok tür için henüz gösterilememiş olması gibi nedenlerle, *Malassezia* cinsinin fenotipik özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanmasında taksonomik karmaşıklıklar yaşanmıştır. Özellikle ribozomal RNA'nın büyük alt biriminin dizi analizi ile *Malassezia* türlerinin taksonomik yerleri kesinleştirilmiş ve bu zeminde fenotipik özelliklere dayanan tanımlama şemaları mümkün hale gelmiştir (22). Bununla birlikte fenotipik yöntemlere dayalı tanımlama şemaları, primer izolasyon sonrasında en az dört günlük ilave süre ve özel çaba gerektirirler. Günümüzde çok daha fazla laboratuvarın PCR gibi çabuk moleküler tanı donanımına sahip olması; tekrarlanabilir, kesin ve tüm bunların ötesinde hızlı moleküler tanı yöntemlerinin *Malassezia* tanımlanmasında kullanılmasını mümkün kılmıştır.

Kullanılacak moleküler yöntemin seçilmesi türlerin tanımlanmasına, epidemiyolojik çalışmalar için suşların tiplendirilmesine ya da konaktan *in vivo* tanı yapılmasına, kısacası çalışmanın amacına göre yapılmalıdır (22). *Malassezia* türlerinin moleküler tanımlanmasında ve genotiplendirilmesinde kullanılan bazı yaklaşımlar şöyle özetlenebilir.

- **Ribozomal DNA (veya RNA) Dizi Analizi**

Malassezia cinsinin taksonomik revizyonu ribozomal RNA'nın büyük alt biriminin D1/D2 domainlerinin dizi analizine dayanmaktadır. Günden güne genişleyen rDNA dizi kütüphanesi, yeni türlerin ilgili diğer türler arasında

belirlenmesini sağlamıştır. Ancak, aynı türün farklı suşları arasında bile rDNA'nın D1/D2 bölgelerinde ve hatta diğer bölgelerde daha fazla olmak üzere yaklaşık %1,0 dizi farklılığının olabileceği akılda tutulmalıdır (22). Örneğin, Guillot ve ark. *M. pachydermatis* türü içinde %2'ye kadar baz farklılığı gösteren yedi farklı dizi tipi varlığını göstermişlerdir, ancak ayrı tür olarak ayırmamışlardır (100). Buna karşılık, Sugita ve ark. 26S rDNA D1/D2 ve ITS1/ITS2 bölgelerinde *M. sympodialis*'ten sadece %1,2'lik baz farklılığı ile ayrılan yeni bir tür olan *M. dermatis*'i tanımlamışlardır (15).

- **PCR- Restriksiyon Endonükleaz Analizi**

Malassezia genomuna ait PCR ürünlerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda ortaya çıkan patern farklılıkları tür düzeyinde tanımlama yapılmasına olanak vermektedir. Örneğin, 26s rDNA'nın PCR ürünününün *BanI*, *HaeIII* ve *MspI* enzimleri ile kesilmesi sonucunda yedi *Malassezia* türünün tanımlanabildiği bildirilmiştir (22).

- **Genotiplendirme Çalışmaları**

Malassezia türlerinin genotiplendirilmesinde IGS1 (intergenic spacer 1) ve ITS1 (internal transcribed spacer 1) bölgelerinin rDNA dizi analizi, 20 nükleotidlik primerler kullanarak "Randomly Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) incelemesi ve "Pulsed-field Gel Electrophoresis" (PFGE) gibi birçok yöntem epidemiyolojik amaçlarla kullanılabilir (22,101,102).

GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasına, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulu'nun 30 Nisan 2009 tarihli ve Y. ETİK KRL.: 1491-902-09/1539 sayılı kararı ile alınan onay ile başlandı. Tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Bilimsel Kurulu Başkanlığı'nca AR-2009/33 proje numarası ile desteklendi. Tez çalışmasında, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Dermatoloji Anabilim Dalı polikliniğinde PV ön tanısı ile Nisan 2009-Ağustos 2011 tarihleri arasında değerlendirilen hastaları da içeren 25'i kadın, 121'i erkek toplam 146 olgu incelendi. Katılımcıların yazılı bilgilendirilmiş onamları alındı. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi GATA Halk Sağlığı BD'de SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 (IBM, ABD) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kategorik karşılaştırmalar için Ki-Kare (Pearson Chi-square) testi kullanıldı. Ki-Kare testi için hesaplanan p değeri $p \leq 0.05$ ise sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.1. Klinik Örneklerin Alınması

Gereçler

1. Bistüri (No:15)
2. Etil alkol (Merck, Almanya), %70'lik
3. Pamuk
4. Steril petri kabı, 90 mm çaplı
5. Çengelli öze
6. Steril yapışkan bant (OpSite [Smith&Nephew Media, İngiltere]), 6,5x5 cm

Yöntem

Pityriasis versicolor olduğu düşünülen olguların lezyonlu bölgesi önce %70'lik etil alkolle silindi ve kuruması için 3-5 dakika beklendi. Sonra steril bir bistüri yardımı ile lezyonlu bölgenin daha çok periferik kısımları kazınarak klinik örnekler steril petri kaplarına alındı (88).

Alternatif örnek alma yöntemi olarak, olguların kazıntı örneği alınan bölgesine komşu, ancak kazıntı yapılmamış lezyonlu bölgesine steril OpSite yapıştırıldı. 10-15 sn kadar yerinde bekletildikten sonra kaldırıldı. Steril

yapışkan bant hasta örneği olan yüzü mDixon besiyeri yüzeyine gelecek şekilde besiyerine bastırıldı, 3-5 sn kadar besiyeri üzerinde tutuldu. Bu şekilde besiyeri yüzeyine klinik materyalin aktarılmasını takiben yapışkan bant besiyerinden kaldırıldı ve ekim yapılan besiyeri 32°C'de inkübasyona bırakıldı (27).

3.2. Mikroskopik İnceleme

Gereçler

1. Potasyum hidroksit (Merck, Almanya), %10'luk
2. Lam (Isotherm, Almanya), 76 x 26 mm
3. Lamel (Menzel Glaser, Almanya), 18 x 18 mm
4. Çengelli öze
5. Işık mikroskobu

Yöntem

Lezyonlu bölgeden alınan kazıntının bir bölümü ile %10'luk KOH solüsyonu kullanılarak lam-lamel arası preparat hazırlandı. Keratinize dokuların likefaksiyonu için 10 dakika süre ile beklendi. Daha sonra ışık mikroskopunda x10'luk ve x40'luk büyütme ile incelendi. Kalın duvarlı konidya ve kısa-güdük hif (köfte-spagetti görüntüsü) varlığı yönünden araştırıldı (6,42).

3.3. Kültür

Gereçler

1. Steril filtre (Corning, Almanya), 0,44 µm por çaplı
2. Steril petri kabı, 90 mm çaplı
3. Balon joje
4. Skim milk (Oxoid, İngiltere)
5. Gliserol (BioShop, Kanada)

Modifiye Dixon Besiyeri

Malt özütü (Merck, Almanya)	36 g
Pepton (Himedia, Hindistan)	6 g
Öküz safrası (Merck, Almanya)	20 g

Agar (BioShop, Kanada)	12 g
Tween 40 (Merck, Almanya)	10 ml
Gliserol (BioShop, Kanada)	2 ml
Oleik asit (Merck, Almanya)	2 ml
Kloramfenikol (Galenik Ecza, Türkiye)	50 mg
Siklohekzimit (Serva, Almanya)	50 mg
Aseton (Sigma, Almanya)	10 ml
Etil alkol (Merck, Almanya)	10 ml
Distile su	1000 ml

Yöntem

Distile su içerisine malt özütü, pepton, öküz safrası ve agar eklendikten sonra karıştırılarak ısıtıldı ve böylece homojenize edildi. Daha sonra otoklavda 1 atm basınç altında, 121°C'de, 15 dk. steril edildi. Üzerine eklenecek olan kloramfenikol etil alkolde, siklohekzimit ise asetonda çözüldü. Besiyeri sıcaklığı 45°C'ye soğutulduktan sonra oleik asit, gliserol, Tween 40, kloramfenikol ve siklohekzimit yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanıp filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra ilave edildi. Steril petrilere 4 mm kalınlığında döküldü (22). Katılaştırmış olan besiyerleri kullanılabildiği kadar en çok bir ay süreyle +4°C'de buzdolabında saklandı.

Bistüri ile kazıma ve steril yapışkan bant (OpSite) yöntemleri kullanılarak alınan cilt kazıntısı örnekleri mDixon besiyerine ekildi. Besiyerleri aerop koşullarda, 32°C'de 14 gün süre ile inkübe edildi. Üreme varlığı yönünden günlük olarak incelendi. Üreme gözlenen örnekler mDixon besiyerine pasajlandı. Aylık olarak gerçekleştirilen tanımlama testleri süresince izolatların canlılığı mDixon besiyerine yapılan aylık düzenli pasajlar yoluyla sağlandı. Uzun süreli saklama için, birkaç maya kolonisinden hazırlanan %15 oranında gliserol eklenmiş 1 ml skim milk süspansiyonlarının -80°C'de derin dondurucuda tutulması yöntemi uygulandı (103).

3.4. Tür Düzeyinde Tanımlama

3.4.1. SGA Besiyerinde Üreme Testi

Gereçler

1. Steril petri, 90mm çaplı
2. Balon joje

Sabouraud Glikoz Agar

Sabouraud glikoz agar toz besiyeri (Merck, Almanya)	65 g
Distile su	1000 ml

Yöntem

Ticari olarak temin edilen toz besiyeri üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlandı. Otoklavda 1 atm basınç altında, 121°C'de, 15 dk. sterilize edilerek petrilere yaklaşık 4 mm kalınlıkta döküldü. Tanımlanacak olan *Malassezia* kökenleri katılaştırılmış SGA besiyerine pasajlandı. Kültürler aerop koşullarda, 32°C'de 7 gün süre ile inkübe edildi (22). Üreme olması *Malassezia* kökeninin zorunlu lipofilik olmadığına (*M. pachydermatis*) delili olarak kabul edildi. *M. pachydermatis* (CBS 1879) pozitif, *M. restricta* (CBS 7877) negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4.2. Katalaz Reaksiyonu

Gereçler

1. Hidrojen peroksit (Bikar, Türkiye), %3'lük
2. Lam (Isotherm, Almanya), 76 x 26 mm
3. Öze

Yöntem

Lam yüzeyine bir damla %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Üzerine öze ile alınan maya kolonisi ilave edildi. Hava kabarcığı oluşumuna (O₂ gazı çıkışına) bakılarak katalaz test sonuçları kaydedildi. Hava kabarcığı oluşturan türler katalaz pozitif olarak değerlendirildi (97). *M. furfur* (CBS 7019) pozitif kontrol, *M. restricta* (CBS 7877) negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4.3. Tween Asimilasyon Testi

Gereçler ve Malzemeler

1. Tween 20 (BioShop, Kanada)
2. Tween 40 (Merck, Almanya)
3. Tween 60 (Merck, Almanya)
4. Tween 80 (BioShop, Kanada)
5. Steril distile su
6. Vorteks (IKA Works INC, ABD)
7. Steril pamuklu eküvyon
8. Steril pipet ucu
9. Steril petri kabı, 90 mm

Sabouraud Glikoz Agar

Sabouraud glikoz agar toz besiyeri (Merck, Almanya)	65 g
Distile su	1000 ml

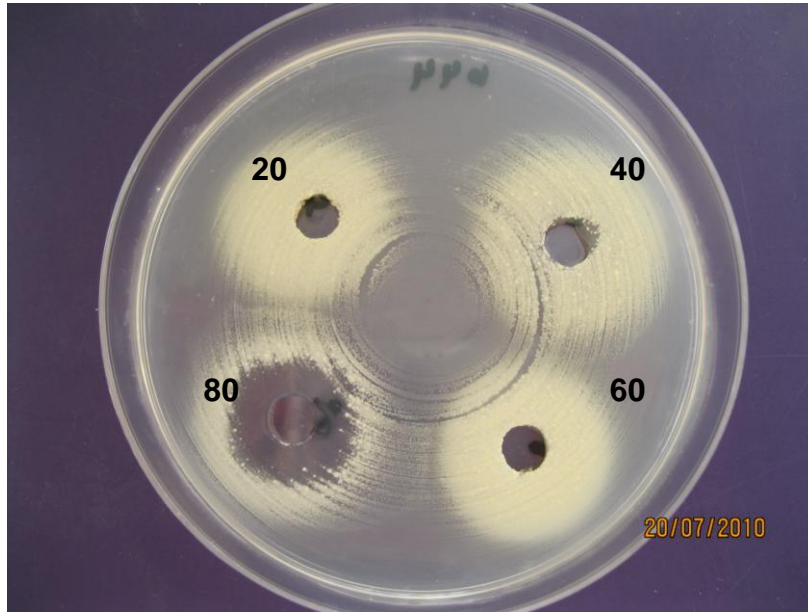
Yöntem

Beş ml steril distile su içeren tüplere bir öze dolusu saf maya kolonisi alınıp, 10-15 saniye kadar vortekslenerek maya süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan maya süspansiyonu 16 ml SGA besiyeri ile, otoklavlanarak sterilize edilen besiyeri katılmasından hemen önce yaklaşık 45°C civarında karıştırıldı ve steril petri plaklarına yaklaşık 4 mm kalınlıkta döküldü. Besiyeri katıldıktan sonra, steril pipet uçlarının arka kısmı yardımıyla besiyeri plağının dört kadranında yaklaşık 3 mm çapında, Tween 20, 40, 60 ve 80 solüsyonlarının her biri için ayrı birer kuyucuk açıldı. Kuyucuklara test edilecek ilgili Tween solüsyonundan bir damla damlatıldı. Plaklar 32°C'de 7-10 gün süre ile inkübe edildi. Hangi Tween solüsyonu asimile edilmiş ise, o solüsyonun damlatıldığı kuyucuk çevresinde gözlenen üremeye göre Tween kullanım paterni değerlendirilerek kayıt altına alındı (27). Her dört Tween solüsyonunu da asimile eden *M. furfur* (CBS 7019) pozitif kontrol, hiçbirini asimile etmeyen *M. restricta* (CBS 7877) negatif kontrol olarak kullanıldı.

Modifiye Tween Asimilasyon Test Yöntemi

Yukarıda bahsedilen Tween identifikasyon yönteminin standart suşlarla gerçekleştirilen ön deneylerinde karşılaşılan zorluklardan dolayı

yöntemde değişikliğe gidildi ve çalışmanın bütününde modifiye Tween asimilasyon yöntemi kullanıldı (32). Modifiye yöntemde özetle, klasik yöntemdeki şekilde hazırlanmış olan maya süspansiyonu, besiyerine besiyeri katılmasından önce eklenmedi. Bunun yerine, önceden hazırlanıp tamamen katılması beklenmiş SGA besiyeri yüzeyine steril pamuklu eküvyon yardımıyla homojen bir şekilde sürüldü. Daha sonra klasik yöntemde olduğu gibi; besiyerine açılan kuyucuklara Tween solüsyonlarının damlatılması, aerop koşullarda, 32°C'de 7-10 gün süreyle inkübasyonu ve kuyucukların etrafındaki üreme zonunun günlük olarak incelenmesiyle test edildi. Tween asimilasyon testi uygulamasının bir örneği aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tween 20, 40 ve 60'ı kullanmış, ancak Tween 80'i asimile etmemiş olan bir *Malassezia* türü (SGA besiyerinde 10 günlük üreme, rakamlar test edilen Tween solüsyonunu ifade etmektedir.)

3.4.4. Cremophor EL Asimilasyon Testi

Gereçler

1. Balon joje
2. Steril petri kabı, 90 mm

3. Steril öze
4. Steril pipet

Cremophor EL Besiyeri

SGA (Merck, Almanya)	65 g
Cremophor EL (Sigma, Almanya)	10 ml
Distile su	1000 ml

Yöntem

Ticari olarak temin edilen SGA toz besiyeri üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanıp, otoklavda 121°C'de, 15 dk., 1 atm basınç altında steril edildi. Besiyeri yaklaşık 45°C'ye soğuduktan sonra üzerine steril bir pipet yardımıyla 10 ml cEL eklendi. Karıştırıldıktan sonra steril petrilere yaklaşık 4 mm kalınlıkta döküldü. Test edilecek izolatlar steril öze yardımıyla cEL besiyeri yüzeyine ekildi. Aerop koşullarda, 32°C'de 7-10 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Üreme sonuçları günlük olarak takip edildi ve cEL'yi kullanma özelliği kaydedildi (97). *M. furfur* (CBS 7019) pozitif kontrol, *M. restricta* (CBS 7877) negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.4.5. Eskülin Hidrolizi Testi

Gereçler

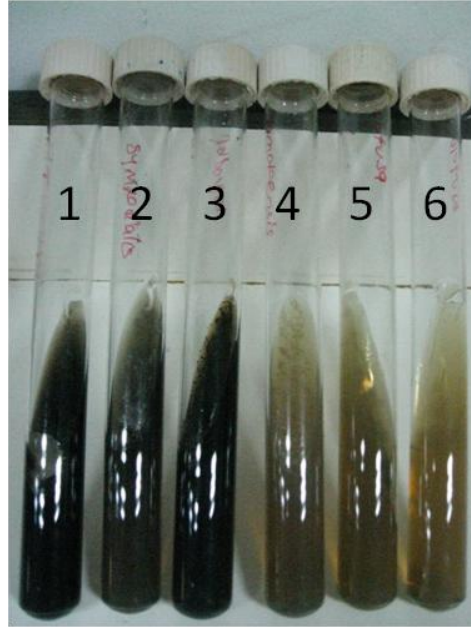
1. Balon joje
2. Steril burgu kapaklı tüp, 160 x 15 mm
3. Steril öze
4. Steril pipet

Eskülin Besiyeri

Pepton (Himedia, Hindistan)	10 g
Glikoz (BioShop, Kanada)	10 g
Maya özütü (BioShop, Kanada)	2 g
Ferrik amonyum sitrat (Merck, Almanya)	0,5 g
Tween 60 (Merck, Almanya)	5 ml
Eskülin (Sigma, ABD)	1 g
Agar (BioShop, Kanada)	15 g
Distile su	1000 ml

Yöntem

Tween 60 dışındaki diğer besiyeri içerikleri distile su içerisine eklendikten sonra ısıtılarak karıştırıldı ve homojenize hale getirildi. Daha sonra 121°C'de, 15 dk., 1 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi. Yaklaşık 45°C'ye soğuduktan sonra steril bir pipet yardımıyla Tween 60 ilave edildi. Steril tüplere 9 ml hacminde dağıtılıp yatık olarak katılaşmaya bırakıldı. Test edilecek izolatlar steril öze yardımıyla besiyeri yüzeyine ekildi. Aerop koşullarda, 32°C'de, 7 gün inkübasyona bırakıldı ve günlük olarak izlendi. Siyah zon oluşturmuş olan türler eskülin pozitif olarak kaydedildi (97). *M. sympodialis* (CBS 7222) pozitif kontrol, *M. restricta* (CBS 7877) negatif kontrol olarak kullanıldı. Eskülin pozitif ve negatif kökenlere ait bir görüntü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Eskülin pozitif (1,2 ve 3. tüpler) ve negatif (4,5 ve 6. tüpler) test sonuçları (7 günlük üreme)

3.4.6. Modifiye Dixon Besiyerinde Kristal Presipitat Oluşumunun İncelenmesi

Gereçler

1. Steril öze

Modifiye Dixon Besiyeri

Modifiye Dixon besiyerinin hazırlanışı için 3.3 numaralı Kültür başlığı altına bakınız.

Yöntem

Test edilecek izolatlar mDixon besiyerine pasajlanarak aerop koşullarda, 32°C'de, 10 gün inkübasyona bırakıldı. Kolonilerin etrafında, agar içerisinde presipitasyon varlığı araştırıldı ve kaydedildi (22). Şekil 3.3'de *Malassezia* kolonileri etrafındaki kristal presipitatlar görülmektedir.



Şekil 3.3. *Malassezia* kolonileri etrafında oluşan kristal presipitatlar (mDixon besiyeri, 10 günlük üreme).

BULGULAR

Çalışmada, 25'i (%17,1) kadın, 121'i (%82,9) erkek olmak üzere toplam 146 PV klinik ön tanılı olgu incelendi. Başvuran hastaların büyük çoğunluğunun (%74) 18-34 yaş arasında olduğu saptandı. Olguların yaş ortalaması $\pm 26,21$ idi (aralık:6-64 yaş, ortanca 21,5). 10 yaş altında iki çocuk ve 60 yaş üstünde sadece bir hasta olduğu görüldü. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş grupları	Sıklık	Yüzde
6-17	11	7,5
18-34	108	74,0
35-64	27	18,5
Toplam	146	100,0

Başvuran hastaların lezyonlarının ne kadar süredir mevcut olduğuna bakıldığında; olguların 83'ünün (%56,9) şikayetlerinin bir yıldan daha kısa bir süredir mevcut olduğu görüldü. Buna karşın 11 hastanın (%7,5) ise belli bir zaman veremediği kaydedildi. Şikayeti 2-3 yıldır devam eden 35 (%24), 3 yıldan uzun bir süredir devam eden 17 (%11,6) olgu saptandı.

Hastaların lezyonlarının tekrar sıklığına bakıldığında ise büyük bir çoğunluğun (%76,0) enfeksiyonu ilk defa geçirdiği görüldü. Diğer tekrarlama oranları Tablo 4.2'de gösterildi.

Tablo 4.2. Lezyonların tekrarlama sıklığı

Tekrar sıklığı	Olgu Sayısı	Yüzde
İlk Defa	111	76,0
2-5	17	11,7
5<	5	3,4
Bilinmiyor	13	8,9
Toplam	146	100,0

Pityriasis versicolor şikayetiyle başvuran 146 hastanın 108'inde (%73,9) sadece gövde veya diğer vücut bölgeleriyle birlikte gövde tutulumunun olduğu görüldü. Gövde tutulumu olan olguların 38'inde sadece arka, 25'inde ise sadece ön gövde tutulumu mevcuttu. Tek başına veya diğer bölgelerle birlikte arka gövde tutulumu 78 olgu ile (%39) en yüksek orana sahipti. Ayrıca hastaların %36,9'unda (54 olgu) birden çok vücut bölgesinin birlikte tutulduğu belirlendi. Tutulan vücut bölgelerine göre olguların dağılımları Tablo 4.3'de verildi.

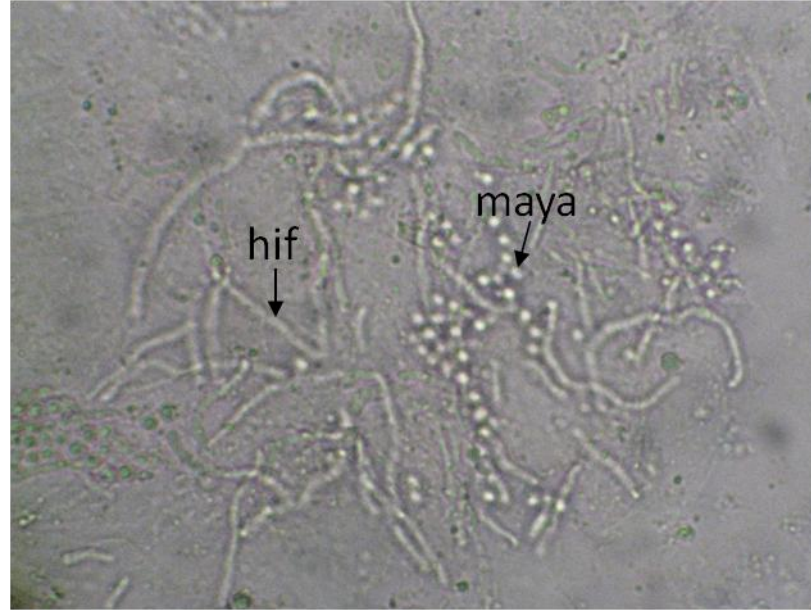
Tablo 4.3. Lezyonların vücut bölgelerine göre dağılımları

Vücut Bölgesi	Sıklık	Yüzde
Arka Gövde	78	39
Ön Gövde	63	31,5
Boyun	30	15
Üst Ekstremiteler	29	14,5
Toplam	200	100,00

Pityriasis versicolor ön tanısı ile başvuran hastalar endojen faktörler açısından sorgulandı. Hastaların sadece ikisi tarafından PV gelişimini kolaylaştırıcı faktörler sayılabilecek olan karaciğer nakline bağlı immüno-supresif tedavi alma ve kortikosteroid kullanımı olduğu belirtildi.

Pityriasis versicolor ön tanılı 146 hastanın tamamında steril bistüri ile epidermal kazıntı tekniği yoluyla örnek alındı. Buna karşın steril yapışkan

bant (OpSite) tekniği, çalışmanın ilk yılında başvuran 66 (%45,2) hastada steril yapışkan bant temininde karşılaşılan zorluklar nedeni ile kullanılmadı. Daha sonraki dönemde başvuran 80 hastada ise her iki örnek alma tekniği birlikte kullanıldı. Pityriasis versicolor n tanılı 146 olgudan 36 hastanın (%24,7) lezyonlarının kepeksiz oluşundan dolayı hem mikroskopi hem de kültür için yeterli miktarda örnek alımı sağlanamadı ve bu hastaların örnekleri sadece kültür amaçlı olarak değerlendirildi. Hem mikroskopi hem de kültür için yeterli miktarda örnek alınabilen 110 hastadan 40'ının (%36,4) mikroskobisinde köfte-spagetti görüntüsüne (pozitif mikroskopi) rastlanırken, 70'inin (%63,6) mikroskopi sonucu tanısal açıdan negatifti. Kazıntı örneğinden hazırlanmış tipik, diagnostik mikroskobik görüntü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Maya ve hiflerin oluşturduğu “köfte-spagetti” görüntüsü (%10'luk KOH ile preparasyon, x40 büyütme)

Pityriasis versicolor n tanılı 146 hasta örneğinin kültürü sonucunda 109 örnekte (%74,7) reme saptanırken, 37 örnek (%25,3) kültürde negatif olarak belirlendi. Steril yapışkan bant tekniğiyle alınan örneklerden ise 49'unda (%61,2) kültürde üreme saptanırken, 31 hastanın (%38,8) kültürde negatif olduğu görüldü. Steril yapışkan bant (6,5 x 5 cm) tekniği kullanılarak

alınan örneklerin, besiyerinde oluşturdukları koloni sayıları kantitatif olarak incelendiğinde; ekim alanında 1 koloni oluşumu 9 (%18,4) hastada, 2-10 koloni oluşumu 28 (%57,1) hastada, 10'dan fazla koloni oluşumu ise 12 (%24,5) hastada saptandı. Her iki teknikle de örnek alınarak kültür yapılan 80 hastanın üreme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, bistüri yardımıyla örnek alınan ve kültür sonucu pozitif olan 64 hastadan 15'inde (%23,4) steril yapışkan bant tekniğiyle alınan örneklerde üreme saptanmadı. İki örnek alım yöntemiyle ilgili diğer değerlendirmeler Tablo 4.4'de sunuldu.

Tablo 4.4. İki farklı örnek alma tekniğine (steril bistüri ve steril yapışkan bant) göre kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi (*)

		Bistüri ile alınan örnekten kültür		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Steril yapışkan bant ile alınan örnekten kültür	Negatif	16	15	31
	Pozitif	0	49	49
	Toplam	16	64	80

(*) Steril yapışkan bant tekniği için duyarlılık:%76,6, özgüllük:%100, pozitif prediktif değer:%100, negatif prediktif değer: %51,6 ve K=%0,566, p<%0,001 (Pearson Ki-kare testi) olarak hesaplanmıştır.

Hem mikroskopik inceleme hem de kültür için yetecek miktarda klinik örnek alımı sağlanabilen 110 PV olgusunun 81'inde (%73,6) kültür pozitifliği görüldü. Mikroskopik inceleme ve kültürde üreme sonuçları birlikte incelendiğinde; mikroskopide negatif olarak değerlendirilen 45 hasta örneğinde kültürde üreme saptanırken, mikroskopik inceleme sonucunda pozitif bulunan 4 örneğin ise kültürde negatif olduğu görüldü. Mikroskopik inceleme ve kültür sonucuyla ilgili diğer değerlendirmeler Tablo 4.5'de sunuldu. Bu istatistiksel çalışma yapılırken yetersiz örnek alımı nedeniyle mikroskopik inceleme yapılamayan (sadece kültür yapılabilen) 36 olgu değerlendirme dışı bırakıldı. Sadece kültür yapılabilen bu 36 hasta örneğinin ise 28'inde (%77,8) kültürde üreme gözlemlendi.

Tablo 4.5. Kültür ve mikroskopi sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi(*)

		Kültür		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Mikroskopi	Negatif	25	45	70
	Pozitif	4	36	40
	Toplam	29	81	110

(*) Mikroskopi için duyarlılık:%44,4, özgüllük:%86,2, pozitif prediktif değer:%90, negatif prediktif değer:%35,7 ve $K=0,211$, $p=0,003$ (Pearson Ki-kare testi) olarak hesaplanmıştır.

Kültürde üreme saptanmasının olguların cinsiyetlerinden etkilenip etkilenmediği incelendiğinde, cinsiyet ile kültür pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.402$, Pearson Ki-kare testi). Bu incelemeye ait olgu sayılarının dağılımı Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6. Kültür pozitifliği ile hasta cinsiyetinin ilişkisi

		Kültür		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Cinsiyet	Erkek	29	92	121
	Kadin	8	17	25
	Toplam	37	109	146

Pityriasis versicolor ön tanısıyla incelenen 146 hasta örneğinin 109'unda (%74,7) *Malassezia* sp. üremesi gözlemlendi. Üreme gözlenen plaklardan hiçbirisinde morfolojik olarak birden fazla *Malassezia* türünün birlikteliğini düşündüren koloni morfoloji farklılığı mevcut değildi. Soyutlanan *Malassezia* kökenlerinden 4 tanesi (%3,7) tür düzeyinde tanımlanamadı ve *Malassezia* spp. olarak raporlandı. Tür düzeyinde tanımlanabilen 105 *Malassezia* türünün dağılımı Tablo 4.7'de verildi. Bu sonuçlara göre; *M.*

globosa 71 (%65,1) olgu ile ilk sırayı alırken, *M. obtusa*'nın 19 (%17,4) olgu ile onu izlediği görüldü.

Tablo 4.7. *Malassezia* türlerinin dağılımı

Türler	Sıklık	Yüzde
<i>M. globosa</i>	71	65,1
<i>M. obtusa</i>	19	17,4
<i>M. japonica</i>	8	7,4
<i>M. nana</i>	4	3,7
<i>M. restricta</i>	2	1,8
<i>M. furfur</i>	1	0,9
<i>Malassezia</i> spp.	4	3,7
Toplam	109	100

Kültürde üretilen türler ile izole edildikleri olguların cinsiyetleri arasında bir ilişki olup olmadığı incelendiğinde, tanımlanan türler ile kaynak olguların cinsiyetleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmadı (p:0,609, Pearson Ki-kare testi).

TARTIŞMA

İlk kez 1846'da Eichstedt tarafından deri kazıntı örneklerinde maya hücrelerinin varlığının gözlenmesiyle başlayan ve PV ile *Malassezia* türlerinin birlikteliğini inceleyen çalışmalara rağmen *M. furfur*'un taksonomisi morfolojik kriterlere göre birçok kez modifiye edilmiştir. Bu değişiklikler 1986'da *Malassezia furfur* (*P. ovale*, *P. orbiculare* ve *M. furfur*'u içeren) ve *M. pachydermatis* (*P. pachydermatis*'i içeren) tür adlarının kabul edilmesine kadar sürmüştür. Farklı isimlendirmelerin kullanılmış olması, taksonomik sınıflandırmanın major yöntemi olarak mikromorfolojik kriterlerin kullanılmasından kaynaklanmıştır (2,3,5,104,105).

Malassezia türlerinin lipofilik özelliğinin ilk kez 1939'da Benham tarafından gösterilmesine kadar, çalışmaların en azından bir bölümünün lipit içermeyen besiyerlerinde yapılmış olması muhtemeldir (5). Üremesi için lipit gerektirmeyen, bugün için bilinen tek *Malassezia* türü olan *M. pachydermatis*'in tanımlanması ise Weidman tarafından 1925 yılında gerçekleşmiştir (3). İlk kez 1964 yılında Van Abbe (89) tarafından Dixon besiyerinin ve 1987'de de Leeming ve Notman tarafından tanımlanan ve halen yaygın olarak kullanılmakta olan kendi adlarını taşıyan özel besiyerlerinin tanımlanmasına kadar eski araştırmacılar temel mikolojik besiyerleri üzerine zeytinyağı sürerek mantarı üretmişlerdir (22,105).

Malassezia türlerinin sağlıklı bireylerin cilt florasında da bulunmasına rağmen, bu mantarın PV, seboreik dermatit, *Malassezia* folliküliti, neonatal püstüloz, blefarit, infantil akne, Gougerot-Carteaud yaygın papillomatozu, atopik dermatit, psöriasis, kaşıntılı kulak ve otitis eksterna gibi tablolarla ilişkili olabileceği belirtilmiş, total parenteral beslenme alan hastalarda sepsis, immünyetmezlikli hastalarda lipit içeren solüsyon infüzyonları ile ilişkili fungemi ve kateter kaynaklı enfeksiyon nedeni olarak da izole edilmiştir (22,25,41,47). *Malassezia* türleri ile ilişkili olabileceği belirtilen klinik tablolar arasında, *Malassezia* türlerinin kolonizasyonu ile olan ilişkisinin ve *Malassezia* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli olan hifal forma dönüşümünün açık olarak görüldüğü iki önemli klinik tablo PV ve *Malassezia* follikülitidir (41).

Pityriasis versicolor tüm dünyada yaygın olarak görülür, ancak sıklığı yaş, iklim, mesleki ve sosyoekonomik şartlara göre değişiklik gösterir (98). Tropikal iklimlerde, sporcularda, yağlı krem ve kozmetik ürünler kullananlarda ve kötü beslenenlerde daha yüksek oranda görülmektedir (3). Farklı yaş gruplarında PV'nin görülme sıklığının değişiklik göstermesi, androjenik hormonların seviyelerine bağlı olarak vücut sebum oranının farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Hastalık özellikle adölesan ve genç erişkinlerde daha sık görülmekte ve görülme sıklığı %30 ile %51,5 arasında bildirilmektedir (28-30,106-112). Çalışmamızda incelenen hastaların yaşları 6 ile 64 arasında değişmekle birlikte, olguların %74'ü 18-34 yaş arasında idi. Bu durum literatür verileri ile uyumludur, ancak tez çalışmasında saptadığımız oran diğer yayınlara göre daha yüksektir. Bunun, çalışmaya dahil edilen hastaların mensubu oldukları kurum özelliklerinden, yani incelenen hastaların büyük çoğunluğunun askerlik hizmetinde olan kişiler olmalarından kaynaklandığı düşünüldü.

Pityriasis versicolor gelişimi ile cinsiyet arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalara bakıldığında, hem erkeklerde (26-30,108,109) hem de kadınlarda (31-33,113) bu tablonun daha sık izlendiğini bildiren çalışmalar bulunmakla birlikte, cinsiyetin PV gelişmesi üzerindeki etkisi net değildir (3,34,98,107). Çalışmamızda, başvuran hastaların büyük çoğunluğunun (%82,9) erkek olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum her ne kadar ilk bakışta anlamlı gibi gözükse de, hasta popülasyonumuz içinde özellikle askerlik hizmetini yapan kişilerin çoğunlukta olmasından kaynaklanmış olabilir.

Pityriasis versicolor lezyonları anatomik olarak sebace bezler bakımından yoğun olan bölgelerde, özellikle de gövde ve üst ekstremitelerde görülmektedir. Araştırmalarda gövde tutulumu %60-84, üst ekstremitelerde tutulumu ise %4-74 aralıklarında bildirilmektedir (3,32,107,108,113-116). Bizim çalışmamızda; gövde tutulumu %73,9 oranında (108 olgu), üst ekstremitelerde tutulumu ise %14,5 oranında (29 olgu) ve literatür verileriyle uyumlu olarak görüldü. Çalışmamızda arka gövde tutulumu %39 oranı (78 olgu) ile en sık tutulan bölge oldu ve bu değer, literatürde bildirilen arka gövde tutulum oranları (%27 - %80) ile paralellik gösterdi (30,88,107,117).

Literatürde göğüs ucu, genital bölge ve kasık gibi alışılmamış bölgelerden de bildirimler yapılmıştır (118-120), ancak çalışmamızda böyle bir tutulum izlenmedi.

Literatür bilgileri incelendiğinde, hastaların genellikle (%46,6 - %74,2) PV tablosuna bir yıldan daha kısa süredir sahip oldukları ifade edilmektedir (30,109,110). Bununla birlikte bir çalışmada 10 yılı aşkın bir süre boyunca PV tablosuna sahip olanların oranı %50,8 olarak bildirilmiştir (108). Bizim çalışmamızda incelenen hastaların %56,9'unun şikayetlerinin bir yıldan kısa bir süredir devam ettiği görüldü. *Malassezia* türlerinin derin kıl foliküllerinde yerleştiği ve hastalığın tekrarlamalarına sebep olduğu düşünülmektedir (29). PV'nin tekrarlayan bir hastalık olması dolayısıyla hastalığın mevcudiyet süresinden ziyade tekrarlama sıklığının da sorgulanması önemlidir (22). Tekrarlayan PV görülme oranları literatürde %24,5 - %60,0 arasında bildirilmektedir (30,42,108,121,122). Bizim çalışmamızda ise hastaların %15,1'i tekrarlama hikayesine sahipti. Çalışmamızdaki tekrarlayan PV sıklığının düşük olmasının, hasta popülasyonumuzun yaş ortalamasının nispeten daha küçük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Pityriasis versicolor'un tanısında klinik değerlendirmenin mikroskopik inceleme ile desteklenmesi önemlidir. Klinik olarak PV olduğu düşünülen olguların %46,6 - %100'ünde mikroskopik olarak diagnostik "köfte-spagetti" görünümünün saptanabildiği belirtilmektedir (28,29,42,88,110,112,113,117,121,123,124). Çalışmamızda, mikroskopik inceleme için yeterli miktarda örnek alınabilen 110 hastanın 40'ında (%36,4) mikroskopik inceleme pozitif. Mikroskopi sonucu negatif olarak değerlendirilen 70 hastanın kazıntı örneklerinin kültüründe 25 hastada üreme gözlenmezken, kalan 45 hastada (%40,9) kültürde üreme gözlendi. Klinik bulguların olmasına ve kültürde üreme görülmesine karşın mikroskopik incelemenin negatif olduğu durumların, duş alma veya lezyonlu bölgeye kozmetik ürünlerin sürülmesi gibi kepeklenmeyi azaltan uygulamalar nedeniyle yetersiz miktarda örneğin incelenmesi ve çalışmanın başlangıç dönemlerindeki deneyimsizlikler gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünüldü. Buna karşılık mikroskopik inceleme sonucunda pozitif bulunan 4 örneğin ise kültürde negatif olduğu

görüldü. Bu durum hastaların hatırlayamadıkları antifungal ilaç veya şampuanlar kullanmış olmalarından kaynaklanmış olabilir.

Klinik tanının doğrulanması, mikrobiyolojik identifikasyonun gerçekleştirilmesi, antifungal duyarlılık çalışmaları ve epidemiyolojik/filogenetik incelemeler için mantar kültürü yapılması zorunludur. Özel üreme gereksinimleri olan *Malassezia* türlerinin literatürde bildirilen kültürde üretilebilme oranları, PV düşünülen olgularda %45,4 - %100 arasında değişmektedir (27,30,32,42,88,98,107,109-113,117,122-124). Bizim çalışmamızda steril bistüri ve steril yapışkan bant teknikleri ile örnek alınabilen 146 hasta örneğinden 109'unda (%74,7) üreme saptandı. Kültürde pozitiflik oranlarının değişkenlik göstermesi, kullanılan besiyerlerinin (Leeming–Notman besiyeri ve modifiye Dixon besiyeri), iklimin ve hasta popülasyonlarının farklılığından kaynaklanabilir. Çalışmamızda ikinci bir örnek alma tekniği olarak steril yapışkan bant (OpSite) yöntemi 80 hastada birlikte uygulandı. Her iki yöntemle de örnek alınabilen olgulardan steril bistüri ile alınan örneklerde üreme saptan 64 hastanın 15'inde (%23,4) steril yapışkan bant tekniğiyle alınan örneklerde üreme gözlenmedi. Buna karşılık steril yapışkan bant tekniği ile alınan ve örneklerinde üreme gözlenen tüm hastaların steril bistüri tekniğiyle alınan kültürleri de pozitif. Bu bulgular ışığında, kantitatif kültür yapımına imkan veren steril yapışkan bant tekniğinin duyarlılığı %76,6, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplandı. İki örnek alma tekniği arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < \%0,001$) bulundu. Literatürde steril yapışkan bant tekniğini örnek alma amacıyla kullanan çalışmalar (16,18,125) bulunmakla birlikte, steril bistüri tekniğiyle birlikte uygulanmış bir kıyaslama çalışması bulunamadı. Bu nedenle elde ettiğimiz iki farklı örnek alma yöntemi arasında istatistiksel fark olduğu yönündeki bulgunun tartışılabilmesi için ilave çalışmalara gereksinim olduğu düşünüldü. Kantitatif kültür yapılabilmesine olanak veren steril yapışkan bant (OpSite) yöntemine ilave olarak, temaslı besiyeri (RODAC plakları) (32) ve yıkama solüsyonu emdirilmiş steril pamuklu silgiç kullanımı gibi başka örnek alma yöntemleriyle de kantitatif *Malassezia* kültür çalışmaları yapılabilmektedir (105).

Pityriasis versicolor tablosunun nedeninin *Malassezia* türleri olduğunun ondokuzuncu yüzyılın ikinci yarısından beri bilinmesiyle beraber, bu tabloya en sık neden olan tür olarak da eski çalışmalarda *M. furfur* gösterilmiştir. Bu bulgunun altında yatan sebep, bugün için 14 tür içerdiği bilinen *Malassezia* cinsinde 1996 yılına kadar sadece *M. furfur*, *M. pachydermatis* ve *M. sympodialis* türlerinin tanımlanabilmiş olmasıdır (41). Bu epidemiyolojik bilgi tanımlanan tür sayısının artışı ile birlikte değişmiştir ve bugün için PV tablosuna en sık neden olan tür olarak pek çok çalışmada *M. globosa* gösterilmektedir. Söz konusu çalışmalarda bildirilmiş olan *M. globosa* izolasyon oranları %42,8 ile %97 arasında değişmektedir (27,35,42,88,98,107,109-111,117,121,122,124-128). Bununla birlikte sınırlı sayıdaki çalışmalarda, PV olgularından en sık izole edilen *Malassezia* türü olarak *M. sympodialis* rapor edilmişse de (%25,6 - %62,7), bu çalışmalarda da ikinci en sık izole edilen tür olarak (%17,6 - %40) *M. globosa* dikkati çekmektedir (32,112,115,123). Tropikal ve subtropikal bölgelerden bildirilmiş bazı çalışmalarda ise *M. furfur* %42 - %77,8 arasında değişen oranlarda en sık PV etkeni olarak raporlanmıştır (30,129-131). Tropikal ve subtropikal bölgelerde yapılmış bu çalışmalarda da en sık ikinci etken olarak yine *M. globosa* ve *M. sympodialis* bulunmuştur. En sık soyutlanan tür farklılıklarının çalışmaların gerçekleştirildiği bölgelerin iklim özelliklerinden kaynaklanması mümkündür. Çünkü *M. furfur*, *M. globosa*'ya nazaran daha termotolerandır ve 40°C'de üreyebilme özelliğine sahiptir (Tablo 2.1). Bizim çalışmamızda da tür düzeyinde tanımlanabilen 109 *Malassezia* türü içerisinde *M. globosa* 71 olgu (%65,1) ile ilk sırayı aldı. *Malassezia obtusa*'nın 19 (%17,4) olgu ile onu izlediği görüldü. Çalışmamızdan elde edilen sonucun baskın tür (*M. globosa*) açısından diğer mevcut yayınlarla uyumlu olduğu görüldü. Literatürde PV etkeni olarak en sık raporlanmış üç tür olan *M. globosa*, *M. furfur* ve *M. sympodialis*'in ortak özellikleri uygun ortamlarda psödohifal dönüşüm gösterebilmeleridir (41). Bu bulguyu destekleyecek bir çalışmada, sadece hifal elemanların görüldüğü cilt kazıntılarında PCR yöntemiyle *M. globosa*'nın DNA'sı tespit edilmiştir (126). Bu bilgiler, PV'nin patogenezinde ve özellikle sık izole edilen türlerin ortaya çıkmasında hifal yapıların oluşturulabilmesinin

önemli bir virülans faktörü olarak rol oynadığını göstermektedir. Hifal değişime sebep olan faktörler çok açık değildir; ancak terleme, sıcaklık ve sebum oranı gibi lokal faktörlerin bu değişimi tetikleyebileceği düşünülmüştür (42). PV patogenezinde önemli olduğu tespit edilmiş diğer iki virülans faktörü olan lipaz ve esteraz enzimlerinin de *M. globosa* başta olmak üzere özellikle bu üç *Malassezia* türü (*M. globosa*, *M. furfur* ve *M. sympodialis*) tarafından üretiliyor olması, PV tablosundan bu üç türün daha sık izole edilmelerinin bir diğer nedeni olabilir (41,88). Literatürlerde PV tablolarından izole edilen *Malassezia* türleri arasında sık olarak raporlanan bu türlere ilave olarak *M. slooffiae* ve *M. restricta* da mevcuttur. Ayrıca, *Malassezia* türlerinin izolasyon sıklıklarındaki farklılıklar çalışmaların gerçekleştirildiği bölgeler, örnekleme metodları ve çalışmalarda kullanılan besiyerlerindeki farklılıklardan da kaynaklanmış olabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) PV tablosunun cinsiyete ve yaşa göre dağılımı incelendiğinde; enfeksiyonun en çok erkeklerde ve 18-34 yaş grubunda görüldüğü belirlendi. Ancak bu durumun çalışmanın gerçekleştirildiği kurumun hizmet verdiği hasta popülasyonunun özelliklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.
- 2) Enfeksiyonu geçiren hastaların daha çok ilk atakları olduğu ve şikayetlerinin bir yıldan daha kısa bir süredir mevcut olduğu saptandı. Bu durumun ise hasta popülasyonumuzun yaş ortalamasının genç olmasından kaynaklanmış olabileceği tahmin edildi.
- 3) Enfeksiyon ile anatomik bölge arasındaki ilişki incelendiğinde, lezyonların literatürle uyumlu olarak sebace bez aktivitesinin daha yoğun olduğu arka gövdede (%39) yer aldığı görüldü.
- 4) Örnek alma yöntemleri karşılaştırıldığında; steril bistüri ile epidermal kazıntı yönteminde daha fazla sayıda örnekte üreme (109/146 örnek) saptanabilmesine karşın, steril yapışkan bant ile örnekleme de kullanılabilirliği (49 üreme/80 örnek) ve steril yapışkan bant tekniğinin kantitatif kültüre olanak vermesinin bir avantaj olduğu değerlendirildi.
- 5) Hem mikroskopik inceleme hem de kültür için yetecek miktarda materyal alınabilen (110 örnek) ve kültüründe üreme saptanan örneklerin (81 örnek) yaklaşık yarısında mikroskopik incelemenin negatif olarak (45 örnek) değerlendirilmesi, sadece mikroskopik incelemenin PV tanısının doğrulanmasında yeterli olmayabileceğini, mikroskopi sonucunun deneyimden etkilenebileceğini gösterdi.
- 6) Kültürün pozitiflikle sonuçlanma durumu ile PV olgularının cinsiyetleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p=0,402$).

7) Kùltürü pozitif PV olgularında tanımlanabilen *Malassezia* türleri arasında literatürle uyumlu olarak en sık izole edilen tür olarak *M. globosa* (%65,1) ilk sırayı alırken, *M. obtusa*'nın (%17,4) onu izlediği görüldü. *M. globosa*'nın sahip olduğu miçelyal dönüşüm yeteneği, lipaz ve esteraz üretebilmesi gibi virülans faktörlerinin PV oluşumuna daha sıklıkla neden olmasından sorumlu olabileceği değerlendirildi.

KAYNAKLAR

- 1) Kantarcioğlu A. S. ve Yücel A., *Malassezia* Türleri: Taksonomi, Mikoloji, İmmunoloji, Patogenez, Vücuttaki Dağılımı Ve İlişkili İnfeksiyonlar, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Duyarlılığı. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 36:134-154; 2005.
- 2) Ashbee H. R., Glyn E., Evans V., Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* Species, Clin. Microbiol. Rev. 21-57; 2002.
- 3) Gupta A. K., Bluhm R., Summerbell R., Pityriasis Versicolor Review JEADV. 16:19–33; 2002.
- 4) Rippon J. W., Medical Mycology 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Company. Superficial Infections. 154-159; 1988.
- 5) Kwon-Chung K. J., Bennett J. E., Medical Mycology, Philadelphia: Lea & Febiger. Infections Caused by *Malassezia* Species. 170-180; 1992.
- 6) Dorn M. ve Roehnert K., Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. J. Investig. Dermatol. 69:244–248; 1977.
- 7) Nazzaro-Porro M., Passi S. ve Caprilli F., Induction of Hyphae in Cultures in *Pityrosporum* by Cholesterol and Cholesterol Esters. J. Investig. Dermatol. 69:531–534; 1977.
- 8) Salkin F. ve Gordon M. A., Polymorphism of *Malassezia furfur*. Can. J. Microbiol. 23:471–475; 1977.
- 9) Simmons R. B. ve Gueho E., A New Species of *Malassezia*. Mycol Res. 94:1146-1149; 1990.
- 10) Guillot J. ve Gueho E., The Diversity of *Malassezia* Yeasts Confirmed by rRNA Sequence and Nuclear DNA Comparisons. Antonie Leeuwenhoek. 67:297-314; 1995.
- 11) Guého E., Midgley G. ve Guillot J., The Genus *Malassezia* with Description of Four New Species. Antonie Leeuwenhoek. 69:337-355; 1996.

- 12) Gupta A. K., Kohli Y. ve Summerbell R. C., Molecular Differentiation of Seven *Malassezia* Species. J Clin Microbiol. 38:1869-1875; 2000.
- 13) Kurtzman C. P., Fell J. W. The Yeasts-a Taxonomic Study, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. *Malassezia* Baillon. 782-784; 1998.
- 14) Kano R., Aizawa T., Nakamura Y. ve ark., Chitin Synthase 2 Gene Sequence of *Malassezia* Species. Microbiol Immunol. 43:813-815; 1999.
- 15) Sugita T., Takashima M., Shinoda T. ve ark., New Yeast Species, *Malassezia dermatis*, Isolated From Patients with Atopic Dermatitis. J Clin Microbiol. 40:1363-1367; 2002.
- 16) Sugita T., Takashima M., Kodama M. ve ark., Description of a New Yeast Species, *Malassezia japonica*, and Its Detection in Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Subjects. J Clin Microbiol. 41:4695-4699; 2003.
- 17) Hirai A., Kano R., Makimura K. ve ark., *Malassezia nana* sp. nov., a Novel Lipid-Dependent Yeast Species Isolated From Animals. Int J Syst Evol Microbiol. 54:623-627; 2004.
- 18) Sugita T., Tajima M., Takashima M. ve ark., A New Yeast, *Malassezia yamatoensis*, Isolation From a Patient With Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects. Microbiol immunol. 48:579-583; 2004.
- 19) Nell A., James S. A., Bond C. J. ve ark., Identification and Distribution of a Novel *Malassezia* species Yeast on Normal Equine Skin. Veter Rec. 150:395–398; 2002.
- 20) Cabañes F. J., Theelen B., Castella G. Two New Lipid - Dependent *Malassezia* species From Domestic Animals. Federation of European Microbiological Societies. 1064–1076; 2007.
- 21) Cabañes F. J., Vega S., Castella G., *Malassezia cuniculi* sp. nov. a Novel Yeast Species Isolated From Rabbit Skin. Medical Mycology. 49(1):40-48(9); 2011.

- 22)** Crespo Erchiga V., Guého E., Superficial Diseases Caused by *Malassezia* species. In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Volume 4. 9th edition. Edited by: Ajello L, Hay RJ. London: Arnold. 201-211; 1998.
- 23)** Hoog G. S., Guarro J., Gene J.& Figueras M. J., Atlas of Clinical Fungi, second edition, Utrecht, Netherlands. 144-155; 2000.
- 24)** Marcon M. J. ve Powell D. A., Humans Infections Due to *Malassezia* spp. Clin Microbiol Rev. 5:101-119; 1992.
- 25)** Gupta A. K., Batra R., Bluhm R. ve ark. Skin Diseases Associated with *Malassezia* Species. J Am Acad Dermatol. 51:785-798; 2004.
- 26)** Belec L., Testa J., Bouree P., Pityriasis Versicolor in the Central African Republic: a Randomized Study of 144 Cases. J Med Vet Mycol. 29:323-329; 1991.
- 27)** Nakabayashi A., Sei Y., Guillot J., Identification of *Malassezia* species Isolated From Patients with Seborrhoeic Dermatitis, Atopic Dermatitis, Pityriasis Versicolor and Normal Subjects. Med Mycol. 38:337-341; 2000.
- 28)** Ghosh S. K., Dey S. K., Saha I. ve ark., Pityriasis Versicolor: A Clinicomycological and Epidemiological Study From a Tertiary Care Hospital. Indian J Dermatol. 53(4):182–185; 2008.
- 29)** Rao G. S., Kuruvilla M., Kumar P. ve ark., Clinico Epidemiological Studies on Tinea Versicolor. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 68:208-209; 2002.
- 30)** Krisanty R. I. A., Bramono K. ve Wisnu I. M. ve ark., Identification of *Malassezia* species From Pityriasis Versicolor in Indonesia and Its Relationship with Clinical Characteristics. Journal compilation Mycoses. 52:257–262; 2008.
- 31)** Nikpoor N. ve Leppard B., Fungal Disease in Shiraz. Pahlavi Med J. 901:27-49; 1978.

- 32) Gupta A. K., Kohli Y., Summerbell R. C. ve ark., Quantitative Culture of *Malassezia* species From Different Body Sites of Individuals with or without Dermatoses. *Med Mycol.* 39(3):243-251; 2001.
- 33) Crespo Erchiga V., Martos A. O., Casano A. V., Isolation and Identification of *Malassezia* spp. In Pityriasis Versicolor, Seborrheic Dermatitis and Healthy Skin. *Rev Iberoam Micol.* 16:16-21; 1999.
- 34) Fitzpatrick T. B., Johnson R. A., Wolff K. ve ark., Color Atlas & Syn-opsis of Clinical Dermatology 4th edition. New York: Mc Graw Hill; Pityriasis Versicolor. 722-726; 2001.
- 35) Crespo Erchiga V., Martos A. O., Casaño A. V. ve ark., Mycology of Pityriasis Versicolor. *J Mycol Med.* 9:143-148; 1999.
- 36) Wyre H. W., Neonatal Pityriasis Versicolor. *Arch Dermatol.* 117:752–753; 1981.
- 37) Welbel S. F., McNeil M. M., Pramanik A. ve ark., Nosocomial *Malassezia pachydermatis* Bloodstream Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Infect Dis.* 13:104–108; 1994.
- 38) Terragni L., Lasagni A., Oriani A. ve ark., Pityriasis Versicolor in the Pediatric Age. *Pediatr Dermatol.* 8:9–12; 1991.
- 39) Silverman R. A., Pediatric Mycoses, Cutaneous Fungal Infections. Igakv Shoin, New York, 212 –218; 1992.
- 40) Di Silverio A., Mosca M., Brandozzi G. ve ark., Pityriasis Versicolor in the Aged: a Clinical Investigation and Epidemiological Survey in 190 Elderly Hospitalized Patients. *Mycopathologia.* 105:187–190; 1989.
- 41) Boekhout T., Guého-Kellermann E., Mayser P. ve ark., *Malassezia* and the Skin Science and Clincial Practice. 2010.
- 42) Crespo-Erchiga V. ve Florencio V. D., *Malassezia* Yeasts and Pityriasis Versicolor. *Lippincott Williams & Wilkins* 19:139–147; 2006.
- 43) Ochoa A. G., Pityriasis Versicolor. *Rev Med (Mex).* 2:81– 88; 1956.

- 44) Marples M. J., The Incidence of Certain Skin Diseases in Western Samoa: a Preliminary Survey. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 44:319–322; 1950.
- 45) Hellgren L. ve Vincent J., The Incidence of Tinea Versicolor in Central Sweden. *J Med. Microbiol.* 16:501–502; 1983.
- 46) Svejgaard E., Epidemiology and Clinical Features of Dermatomycoses and Dermatophytoses. *Acta Derm Venereol (Stockh).* 121:19–26; 1986.
- 47) Mickelsen P. A., Viano-Paulson M. C. ve ark., Clinical and Microbiological Feature of Infection with *Malassezia pachydermatis* in High-Risk Infants. *J Infect Dis,* 157:1163-1168; 1998.
- 48) Katoh T., Irimajiri J., Pityriasis Versicolor and *Malassezia* Folliculitis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 40:69-71; 1999.
- 49) Back O., Faergemann J., Hornqvist R., *Pityrosporum* folliculitis: a Common Disease of the Young and Middle-Aged. *J Am Acad Dermatol.* 12:56-61; 1985.
- 50) Faergemann J., Johansson S., Back O. ve ark., An Immunologic and Cultural Study of *Pityrosporum* Folliculitis. *J Am Acad Dermatol.* 14:429-433; 1986.
- 51) Sina B., Kauffman C. L., Samorodin C. S., Intrafollicular Mucindeposits in *Pityrosporum* folliculitis. *J Am Acad Dermatol.* 32:807-809; 1995.
- 52) Jacinto-Jamora S., Tamesis J., Katigbak M. L., *Pityrosporum* folliculitis in the Philippines: Diagnosis, Prevalence and Management. *J Am Acad Dermatol.* 24:693-696; 1991.
- 53) Hill M. K., Goodfield J. D., Rodgers F. G. ve ark., Skin Surface Electron Microscopy in *Pityrosporum* Folliculitis: The Role of Follicular Occlusion in Disease and the Response to Oral Ketoconazole. *Arch Dermatol.* 126:181-184; 1990.

- 54) Gueho E., Faergemann J., Lyman C. ve ark., *Malassezia* and *Trichosporon*: Two Emerging Pathogenic Basidiomycetous Yeast-Like Fungi. *J Med Vet Mycol.* 32:367-378; 1994.
- 55) Potter B. S., Burgoon C. F., Johnson W. C., *Pityrosporum* folliculitis: Report of Seven Cases and Review of the *Pityrosporum* Organism Relative to Cutaneous Disease. *Arch Dermatol.* 107:388-391; 1973.
- 56) Bufill J. A., Lum L. G., Caya J. G. ve ark., *Pityrosporum* Folliculitis After Bone Marrow Trans-Plantation: Clinical Observations In Five Patients. *Ann Intern Med.* 108:560-563; 1988.
- 57) Shuster S., The Aetiology of Dandruff and The Mode of Action of Therapeutic Agents. *Br J Dermatol.* 111:235-242; 1984.
- 58) Pie´rard G. E., Arrese J. E., Pie´rard-Franchimont C. ve ark., Prolonged Effects of Antidandruff Shampoo Time to Recurrence of *Malassezia ovalis* Colonization of Skin. *Int J Cosm Sci.* 19:111-117; 1997.
- 59) Cotterill J. A., Cunliffe W. J., Williamson B. ve ark., Age and Sex Variation in Skin Surface Lipid Composition and Sebum Excretion Rate. *Br J Dermatol.* 87:333-340; 1972.
- 60) Ramasastry P., Downing D. T., Pochi P. E. ve ark., Chemical Composition of Human Skin Surface Lipids From Birth to Puberty. *J Invest Dermatol.* 54:139-144; 1970.
- 61) Mayser P., Pape B., Decreased Susceptibility of *Malassezia furfur* to UV Light by Synthesis of Tryptophane Derivatives. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73:315-319; 1998.
- 62) Mayser P., Schafer U., Kramer H. J. ve ark., Pityriacitrinean Ultraviolet-Absorbing Indole Alkaloid From The Yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res.* 294:131-134; 2002.
- 63) McGinley K. J., Leyden J. J., Marples R. R. ve ark., Quantitative Microbiology of The Scalp in Non-Dandruff, Dandruff, and Seborrheic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 64:401-405; 1975.

- 64) Bergbrant I. M., Faergemann J., Seborrhoeic Dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a Cultural and Immunological Study. Acta Derm Venereol. 69:332-335; 1989.
- 65) Parry M. E., Sharpe G. R., Seborrhoeic Dermatitis is Not Caused by An Altered Immune Response To *Malassezia* yeast. Br J Dermatol. 139:254-263; 1998.
- 66) Troller J. A., Model System For The Investigation of Dandruff. J Soc Cosm Chem. 22:187-198; 1971.
- 67) Binder R. L., Jonelis F. J., Seborrhoeic Dermatitis in Neuroleptic Induced Parkinsonism. Arch Dermatol. 119:473-475; 1983.
- 68) Faergemann J., Fredriksson T., Tinea Versicolor With Regard to Seborrhoeic Dermatitis: An Epidemiological Investigation. Arch Dermatol. 115:966-968; 1979.
- 69) Riciputo R. M., Oliveri S., Micali G. ve ark., Phospholipase Activity in *Malassezia furfur* Pathogenic Strains. Mycoses. 39:233-235; 1996.
- 70) Kieffer M., Bergbrant I. M., Faergemann J. ve ark., Immune Reactions to *Pityrosporum ovale* in Adult Patients With Atopic and Seborrhoeic Dermatitis. J Am Acad Dermatol. 22:739-742; 1990.
- 71) Broberg A., Faergemann J., Johansson S. ve ark., *Pityrosporum ovale* and Atopic Dermatitis in Children and Young Adults. Acta Derm Venereol. 72:187-192; 1992.
- 72) Back O., Bartosik J., Systemic Ketoconazole For Yeast Allergic Patients with Atopic Dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 15:34-38; 2001.
- 73) Tengvall L. M., Johansson C., Scheynius A. ve ark., Positive Atopy Patch Test Reactions to *Pityrosporum orbiculare* in Atopic Dermatitis Patients. Clin Exp Allergy. 30:122-131; 2000.
- 74) Van de Kerkhof P. C., Franssen M. E., Psoriasis of The Scalp: Diagnosis and Management. Am J Clin Dermatol. 2:159-165; 2001.

- 75) Rosenberg E. W., Belew P. W., Improvement of Psoriasis of The Scalp with Ketoconazole. Arch Dermatol. 118:370-371; 1982.
- 76) Squiquera L., Galimberti R., Morelli L. ve ark., Antibodies to Proteins From *Pityrosporum ovale* in The Sera From Patients with Psoriasis. Clin Exp Dermatol. 19:289-293; 1994.
- 77) Simmons R. B. ve Ahearn D. G., Cell Wall Ultrastructure and Diazonium Blue B Reactions of *Sporopachydermia quercuum*, *Bulleo tsugae* and *Malassezia* spp. Mycologia. 79:38–43; 1987.
- 78) Swift J. A. ve Dunbar S. F., Ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *P. canis*. Nature. 206:1174–1175; 1965.
- 79) Midgley G., The Diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) Yeasts *in vivo* and *in vitro*. Mycopathologia. 106:143-155; 1989.
- 80) Saadatzadeh M. R., Ashbee H. R., Holland K. T. ve ark., Production of Mycelial Phase of *Malassezia* species *in vitro*. Med Mycol. 39:487-493; 2001.
- 81) Shifrine M. ve Marr A. G., The Requirement of Fatty Acids by *P. ovale*. J. Gen. Microbiol. 32:263–270; 1963.
- 82) Wilde P. F. ve Stewart P. S., A Study of The Fatty Acid Metabolism of The Yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem. J. 108:225–231; 1968.
- 83) Ashbee H. R., Update On The Genus *Malassezia*. Medical Mycology. 45:287-303; 2007.
- 84) Ran Y., Yoshike T. ve Ogawa H., Lipase of *M. furfur*. Some Properties and Their Relationship To Cell Growth. J. Med. Vet. Mycol. 31:77–85; 1993.
- 85) Plotkin L. I., Squiquera L., Mathov I. ve ark., Characterization of The Lipase Activity of *Malassezia furfur*. J. Med. Vet. Mycol. 34:43–48; 1996.
- 86) Faergeman J., Fredriksson T., Age Incidence of *Pityrosporum orbiculare* on Human Skin. Acta Dermatol-Venerol. 60:531-533; 1980.

- 87)** Duarte E. R., Lanhance M. A. ve Hamdan J. S., Identification of Atypical Strains of *Malassezia* spp. From Cattle and Dog. *Can J Microbiol.* 48:749-752; 2002.
- 88)** Aspiroz C., Ara M., Varea M. ve ark. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* From Patients with Pityriasis Versicolor in Spain. *Mycopathologia.* 154:111–117; 2001.
- 89)** Van Abbe N. J., The Investigation of Dandruff. *J. Soc. Cosmetic Chemists.* 15:609-630; 1964.
- 90)** Leeming J. P., Notman F. H., Improved Methods For Isolation and Enumeration of *Malassezia furfur* From Human Skin. *J Clin Microbiol.* 25:2017-2019; 1987.
- 91)** Marcon M. J., Powell D. A., Durrell D. E. ve ark., Methods for Optimal Recovery of *Malassezia furfur* From Blood Culture. *Journal Of Clinical Microbiology.* 696-700; 1986.
- 92)** BioMérieux, Fransa. Firma prospektüsleri. <http://www.biomerieux.com.tr/servlet/srt/bio/turkey/home>. Erişim tarihi: 03.12.2012.
- 93)** Becton Dickinson, BACTEC, ABD. Firma prospektüsleri. <http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp>. Erişim tarihi: 03.12.2012
- 94)** Nelson S. C., Yau Y. C. W., Richardson S. E. ve ark., Improved Detection of *Malassezia* Species in Lipid-Supplemented Peds Plus Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology.* 1005–1007; 1995.
- 95)** Sigma kataloğu, Biochemicals and reagents. 2002-2003.
- 96)** BASF Technical data sheet on KolliphorEL." http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/TechnicalInformations/EN/PharmaSolutions/EMP030711e_CremophorEL.pdf. Erişim tarihi: 30.10.2012.

- 97)** Kaneko T., Makimura K., Abe M. ve ark., Revised Culture-Based System For Identification Of *Malassezia* Species. Journal Of Clinical Microbiology. 3737–3742; 2007.
- 98)** Khosravi A. R., Eidi S., Katiraei F. ve ark., Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Patients with *Malassezia* Infections. World Journal of Zoology. 4(2):85-89; 2009.
- 99)** Forbes B. A., Sahm D. F. ve Weissfeld A. S. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Elsevier. 12th edition; 2007.
- 100)** Guillot J., Gueho E. ve ark., Epidemiological Analysis Of *Malassezia pachydermatis* Isolates by Partial Sequencing of Large Subunit Ribosomal RNA. Res. Vet. Sci. 62:22-25; 1997.
- 101)** Sugita T., Kodama M. ve ark., Sequence Diversity of The Intergenic Spacer Region of The rRNA of *Malassezia globosa* Colonizing The Skin of Patients With Atopic Dermatitis and Healthy Individuals. J. Clin Microbiol. 43:3022-3027; 2003.
- 102)** Boekhout T., Kamp M. ve Gueho E. Molecular Typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. Med Mycol. 36:365-372; 1998.
- 103)** Crespo M. J., Abarca M. L. ve Caban̄es F. J. Evaluation of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. Journal Of Clinical Microbiology. 3872–3875; 2000.
- 104)** Cannon P. F., International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): Name Changes in Fungi of Microbiological, Industrial and Medical Importance. Microbiol. Sci. 3:285–287; 1986.
- 105)** Aspiroz C., Moreno L. A., Rezusta A., Differentiation of Three Biotypes of *Malassezia* species on Human Normal Skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. Mycopathologia. 145:69–74; 1999.
- 106)** Feri J., Dinkela A., Mbata M. ve ark., Skin Disorders Among School Children in Rural Tanzania and An Assessment of Therapeutic Needs. Trop Doct. 36:219–221; 2006.

- 107)** Tarazooie B., Kordbacheh P., Zaini F. ve ark., Study of The Distribution of *Malassezia* species in Patients With Pityriasis Versicolor And Healthy Individuals In Tehran, Iran. *BMC Dermatology*. 4:5; 2004.
- 108)** Morais P. M., Cunha G. S., Frota M. Z. M., Clinical Aspects of Patients With Pityriasis Versicolor Seen At A Referral Center For Tropical Dermatology in Manaus, Amazonas, Brazil. *An Bras Dermatol*. 85(6):797-803; 2010.
- 109)** Karakaş M., Bıçer A. T., İlkıt M. ve ark., Epidemiology of Pityriasis Versicolor in Adana, Turkey. *Journal of Dermatology*. 36:377–382; 2009.
- 110)** Prohic A., Ozegovic L., *Malassezia* species Isolated From Lesional And Non-Lesional Skin In Patients With Pityriasis Versicolor. *Mycoses*. 50:58–63; 2006.
- 111)** Dutta S., Bajaj A. K., Basu S. ve ark., Pityriasis Versicolor: Socio-Economic And Clinicomycologic Study in India. *Int J Dermatol*. 41:823–824; 2002.
- 112)** Ramadán S., Sortino M., Bulacio L., Prevalence of *Malassezia* species in Patients With Pityriasis Versicolor in Rosario, Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 29(1):14–19; 2012.
- 113)** Ebrahimzadeh A., A Survey on Pityriasis Versicolor in the University Students in Southeast of Iran. *Asian Journal of Dermatology*. 1:1-5; 2009.
- 114)** Lee Y. W., Yim S.M., Lim S.H. ve ark., Quantitative Investigation on The Distribution of *Malassezia* species On Healthy Human Skin in Korea. *Mycoses*. 49(5):405-410; 2006.
- 115)** Gupta A. K., Kohli Y., Faergemann J. ve ark., Epidemiology of *Malassezia* Yeasts Associated With Pityriasis Versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol*. 39(2):199-206; 2001.
- 116)** Sunenshine P.J., Schwartz R. A., ve Janniger C.K., Tinea Versicolor Review. *International Journal of Dermatology*. 37:648–655; 1998.

- 117)** Chaudhary R., Singh S., Banerjee T. ve ark., Prevalence of Different *Malassezia* species in Pityriasis Versicolor in Central India. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 76(2):159-164; 2010.
- 118)** Burkhart C. G., Dvorak N., Stockard H., An Unusual Case Of Tinea Versicolor In An Immunosuppressed Patient. Cutis. 27:56-58; 1981.
- 119)** Anthony J. L., Schosser R. H., Gross D. J., Unilateral Areolar And Periareolar Tinea Versicolor. Int J Dermatol. 30:600; 1991.
- 120)** Rudolph R. I., Holzwanger J. M., Inverse Tinea Versicolor. Arch Dermatol. 111:1213; 1975.
- 121)** Crespo-Erchiga V., Martos A. O., Vera-Casano A. ve ark., *Malassezia globosa* As The Causative Agent Of Pityriasis Versicolor. Br J Dermatol. 143:799–803; 2000.
- 122)** Gaitanis G., Velegraki A., Alexopoulos E. C. ve ark., Distribution of *Malassezia* species In Pityriasis Versicolor And Seborrheic Dermatitis In Greece. Typing Of The Major Pityriasis Versicolor Isolate *Malassezia globosa*. Br J Dermatol. 154:854–859; 2006.
- 123)** Kindo A. J., Sophia S. K. C., Kalyani J. ve ark., Identification Of *Malassezia* Species Indian Journal of Medical Microbiology. 22(3):179-181; 2004.
- 124)** Salah B. S., Makni F., Marrakchi S. ve ark., Identification of *Malassezia* species From Tunisian Patients With Pityriasis Versicolor And Normal Subjects. Mycoses. 48:242–245; 2005.
- 125)** Hernandez F., Mendez L. J., Bazan E. ve ark., Especies De *Malassezia* Asociadas A Diversas Dermatosis Y A Piel Sana En Población Mexicana. Rev Iberoam Micol. 20:141–144; 2003.
- 126)** Morishita N., Sei Y., Sugita T., Molecular Analysis of *Malassezia* Microflora From Patients With Pityriasis Versicolor. Mycopathol. 161:61–65; 2006.

- 127)** Nakabayashi A., Identification of *Malassezia* Associated Dermatoses. Jap J Med Mycol. 43:65–68; 2002.
- 128)** Gaitanis G., Velegraki A., Frangoulis E. ve ark., Identification of *Malassezia* species From Patient Skin Scales By PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect. 8:162–173; 2002.
- 129)** Razanakolona I., Rakotozandrindrainy N., Razafimahefa J. ve ark., Pityriasis Versicolor à Antananarivo: Première Étude Sur L'Identification D'Espèces De *Malassezia* Responsables. Abst FSMM J Mycol Méd. 14:152; 2004.
- 130)** De Quinzada M., Estudio De Las Especies De *Malassezia* Relacionadas Con La Patología Cutánea Pityriasis Versicolor En Panamá. Thesis Doctoral Panamá. 2005.
- 131)** Miranda K. C., Rodrigues de Araujo C., Soares A. J. ve ark., Identificação De Espécies De *Malassezia* Em Pacientes Com Pityriase Versicolor Em Goiania-GO. Rev Soc Bras Med Trop. 39:582–583; 2006.