

Klinik Örneklerden ve Havadan İzole Edilen Küf Mantarlarının İn Vitro Virülans Faktörlerinin ve *Galleria mellonella* Larva Ölüm Hızlarının Karşılaştırılması[§]

Zemfira ALİYEVA*, Hatice ERDEM*, Ahmet Kamil KARAKUŞ**, Ayşe KALKANCI*

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem III, Ankara

ÖZ

Amaç: Havada bulunan küfler fırsatçı mantar enfeksiyonlarının etkenidir. Fakat bu küflerin virülans özellikleri konusunda in vitro ve in vivo karşılaştırmalı çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, hastalardan ve havadan izole edilen küflerin virülans özellikleri karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam olarak 12 klinik izolat ve 14 hava izolatu kazein hidrolizi, fosfolipaz, esteraz, DNAz üretimi, eskülin hidrolizi, katalaz aktivitesi ve salgısal aspartil proteinaz üretimini bakımından incelenmiştir. Bu küfler *Galleria mellonella* larvalarına enjekte edilerek enfeksiyon oluşturulmuştur. İn vitro virülans faktörleri ve in vivo mortaliteleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Farklı kaynaklardan elde edilen küflerin in vitro ve in vivo virülans özellikleri arasında bir fark gösterilememiştir.

Sonuç: Bu çalışmanın gerçek insan enfeksiyonundaki yansımaları değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: *Galleria mellonella*, havasal küfler, patojenik küfler, virülans

ABSTRACT

Comparative Evaluation of in Vitro Virulence of Mould Isolates from Clinical Cases and from Air Samples and Their Mortality Rates in *Galleria mellonella* Larvae

Objective: Air-borne moulds are the causative agents of opportunistic fungal infections. However limited number of in vitro and in vivo comparative studies have been performed about virulence features of these moulds. In this study, we compared the virulence features of different moulds isolated from patients and air samples.

Material and Methods: A total number of isolates from 12 clinical samples and 14 air-borne moulds were evaluated as for casein hydrolysis, phospholipase, esterase activities, DNase production, esculin hydrolysis, catalase activity and aspartyl proteinase production. *Galleria mellonella* larvae were infected with these clinical and air-borne moulds. In vitro virulence factors and in vivo mortalities were compared.

Results: We found no difference between in vitro and in vivo virulence features of the moulds isolated from different sources.

Conclusion: The projections of this study on human infections should be evaluated.

Keywords: *Galleria mellonella*, air-borne moulds, pathogenic moulds, virulence

GİRİŞ

Küf mantarları hava ve toprakta organik maddeler üzerinde yaşayan saprofit canlılardır. İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilmeleri için solunum yolundan veya deriden temas yoluyla

alınmaları gerekir. Virülansları düşük olduğu için, dermatofitler dışındaki küf mantarlarının enfeksiyon oluşturabilmeleri konak faktörlerine bağlıdır. Küf mantarlarının sahip olduğu virülans faktörleri hücre dışı enzimleri, bazı toksinleri, melanin üretimleri, siderofor içermeleri,

Alındığı tarih: 23.11.2016

Kabul tarihi: 25.04.2017

Yazışma adresi: Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

Tel: 0312 202 46 20

e-posta: kalkanci@gazi.edu.tr

[§] Bu araştırma 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2016, Antalya) sunulmuştur.

hücre duvarındaki antijenik yapılar, konidyalarının şekli, solunum hücrelerine girebilme özellikleri ve konak faktörlerine gösterdikleri dirençtir⁽¹⁻³⁾. Küf mantarlarının in vitro virülans özelliklerinin irdelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Solunum yolundan patojen olan küflerin konak immün yanıtını aşabilmelerini hangi virülans faktörlerinin sağladığı tam olarak bilinmemektedir. Ortam havasında daha çok *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* cinsi küf mantarları bulunur. Ancak, enfeksiyon etkeni küfler daha çok *Aspergillus* cinsi ve *Mucoromycotina* üyeleridir⁽⁴⁾. Havadan izole edilen bir *Aspergillus* kökeni ile enfeksiyon etkeni olan bir başka *Aspergillus* kökeni arasındaki virülans farkının araştırıldığı az sayıda yayın bulunmaktadır⁽¹⁾. Mantarların virülans faktörleri genellikle maya mantarları ve en çok da *Candida* cinsi ile çalışılmıştır⁽⁵⁾. Hayvan modelleri ile yapılan in vivo çalışma sayısı ise daha da azdır⁽⁶⁾. Etik kurallar ve maliyet nedeniyle memelilerde hayvan modellerinin oluşturulması konusunda sınırlamalar bulunmaktadır. *Galleria mellonella* mum güvesidir. Larvaları son yıllarda virülansın araştırılmasında model olarak kullanılmaya başlanmıştır⁽⁷⁾.

Bu çalışmanın amacı, havadan ve klinik örneklerden izole edilen küf mantarlarının in vivo ve in vitro virülans özelliklerinin karşılaştırılmasıdır. Çalışmanın iki basamağı bulunmaktadır. Birinci basamakta, küf kökenlerinin in vitro virülans faktörleri uygun besiyerlerinde araştırılmıştır. İkinci basamakta, kökenler ile *Galleria mellonella* larvalarında oluşturulan enfeksiyonun larvaları öldürme hızı hesaplanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tür düzeyinde tanımlama morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Bu nedenle tür isimleri “tür kompleksi” olarak anlaşılmalıdır.

Klinik kökenler ve izolasyon kaynağı (12 adet)

Aspergillus fumigati (3 adet pnömoni etkeni), *Aspergillus fumigati* (sinüzit), *Aspergillus fumigati* (keratit), *Aspergillus terreus* (keratit), *Fusarium solani* (keratit), *Fusarium oxysporum* (keratit), *Paecilomyces lilacinus* (kan), *Paecilomyces variotii* (keratit), *Alternaria alternata* (keratit), *Rhizopus oryzae* (sinüzit).

Havadan izole edilen kökenler (14 adet)

Hastane içi havadan, petri açılması yöntemi ile izole edilen *Penicillium citrinum* (3 adet), *Penicillium crysogenum* (1 adet), *Cladosporium cladosporoides* (4 adet), *Aspergillus nigri* (2 adet), *Aspergillus flavi* (1 adet), *Mucor* sp. (1 adet), *Ulocladium* spp. (2 adet).

İn vitro virülans çalışmaları

Bütün kökenlerin in vitro virülans faktörü olarak kazein hidrolizi, fosfolipaz üretimi, esteraz aktivitesi, DNAz varlığı, eskülin hidrolizi, katalaz aktivitesi ve salgısal asid proteinaz (SAP) aktivitesi araştırılmıştır. Her bir küf kolonisinden hazırlanan süspansiyondan 10 µl plaklara inoküle edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.

Kazein hidrolizi için %3 süt tozu içeren Mueller Hinton Agar (MHA, Difco) plakları hazırlanmıştır. Plaklar 37°C’de 24 saat bekletilmiş, koloni etrafındaki şeffaf zon varlığı kazeinaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir⁽⁸⁾. Fosfolipaz üretimi yumurta sarılı Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, Difco) besiyerinde (13.0 g; NaCl (Sigma), 11.7 g; CaCl₂ (Sigma), 0.11 g; and %10 steril egg yolk emülsiyonu (Sigma), 184 mL of distile su) incelenmiştir. Plaklar 37°C’de 72 saat bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Fosfolipaz aktivitesi koloni etrafında görülebilir bir zon oluşması olarak kabul edilmiştir⁽⁹⁾. Esteraz aktivitesi Tween 80 opasite test besiyeri kullanılarak

incelenmiştir [10 g bakteriyolojik pepton (Sigma), 5 g sodyum klorid (Sigma), 0.1 g kalsiyum klorid (Sigma), 15 g agar (Difco), 1000 mL distile su]. Steril karışım 50°C sıcaklığa soğuduğunda steril Tween 80 (Merck, Almanya) 5 mL eklenmiştir. Besiyerleri 30°C'de 10 gün bekletilmiştir. Besiyeri etrafında zon oluşması pozitif kabul edilmiştir⁽¹⁰⁾. DNAaz aktivitesi 1957 yılında Jeffries, Holtman ve Guse tarafından⁽¹¹⁾ tanımlanan yöntemin esas alındığı hazır DNAz besiyeri kullanılarak incelenmiştir⁽¹²⁾. Eskülin hidrolizi için safra-eskülin agar plakları hazırlanmıştır⁽¹³⁾. Koloniler 35°C'de 18 saat sonra koyu renk oluşumu açısından incelenmiştir⁽¹⁴⁾. Katalaz aktivitesi lam üzerinde %3'lük hidrojen peroksit ile koloni karıştırıldığında oksijen baloncuklarının oluşması ile gösterilmiştir⁽¹⁵⁾. Proteinaz aktivitesi Staib⁽¹⁶⁾ tarafından tanımlandığı şekilde sığır serum albümini (BSA, Sigma) içeren agar plaklarında araştırılmıştır. BSA agar plakları, %2 glukoz (Sigma), %0.01 KH₂PO₄ (Sigma), %0.05 MgSO₄ (Sigma), %2 agar ve %1 BSA (Sigma) eklenerek hazırlanmıştır. Plaklar 37°C'de 3. gün bekletilmiş, koloninin çevresinde halo oluşmasıyla değerlendirilmiştir⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

İn vivo *Galleria mellonella* modeli:⁽²⁰⁾

Galleria mellonella larvaları, cam kavanozlarda, yarı sentetik besin kullanılarak 28°C±2°C, %60±5 bağıl neme sahip karanlık laboratuvar ortamında yetiştirilmiştir. Stok kültürün devamlılığı *G. mellonella* ergin dişi ve erkek böceklerin çiftleşmeleri sonucu, besin konulan kavanozlara dişilerin bıraktığı yumurtaların açılması sonucu sağlanmıştır. Besin bileşenlerinden kepek, gliserin, bal ve su bir kap içine konulmuş ve iyice homojen bir hâle gelinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma balmumu hâlinde ilave edilerek karışım homojenliği sağlanmıştır. 100 g yarı sentetik besiyeri için buğday unu (22 g), buğday kepeği (22 g), süt tozu (11 g), ekmek mayası (5.5 g), balmumu (17.5 g),

gliserin (11 ml) ve bal (11 ml) kullanılmıştır.

Her kökenden serum fizyolojik (SF) içinde hazırlanan süspansiyon 5x10⁸ hücre içerecek şekilde sulandırılmıştır. Süspansiyondan 10 µl Hamilton enjektörü içine alınmıştır. Her gruptaki 10 larva son sol bacak önünden hemolenf içine yapılan enjeksiyon ile inokule edilmiştir. Larvalar 30°C'de 12 gün bekletilmiş ve her gün canlı larva sayısı kayıt edilmiştir. Ellenmemiş bir kontrol grubu, 10 µl SF verilen bir kontrol grubu ve enjektörün batırılıp çıkarıldığı bir kontrol grubu çalışmaya eklenmiştir (Şekil 1). Canlı kalan larva sayıları esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri çizilmiştir. Her grupta 10 larva olmak üzere, 14 hava küfü, 12 klinik köken, 3 kontrol grubu (29 ayrı grup) için, 290 larva kullanılmıştır.

Sonuçların analiz yöntemi

Nedensellik ilişkilerinin irdelemesine göre araştırmalar tanımlayıcı ve çözümleyici araştırmalar olarak ayrılırlar. Çalışmamız "tanımlayıcı" araştırma olarak sınıflandırılmalıdır. Tanımlayıcı çalışmalar esasen olgu raporları veya olgu serileridir.

Çalışmamız farklı küf mantarlarından oluşan bir küme olarak kabul edilmelidir. Farklı küfleri içermesi nedeniyle cinsler veya türler arası istatistiksel bir karşılaştırma yapılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle her küfün kendi virülans özelliği kendi içinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Hastalardan izole edilen 12 küf ile havadan izole edilen 14 küf kazein, fosfolipaz, esteraz, DNAz, eskülin hidrolizi, katalaz, SAP varlığı açısından karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Virülans faktörleri esasen türlere ait bir özellik olduğu için ve türler arası karşılaştırma yapılması gerekir. Ancak, her grupta istatistiksel

Tablo 1. Hastalardan ve havadan izole edilen küf mantarlarının virülans faktörleri.

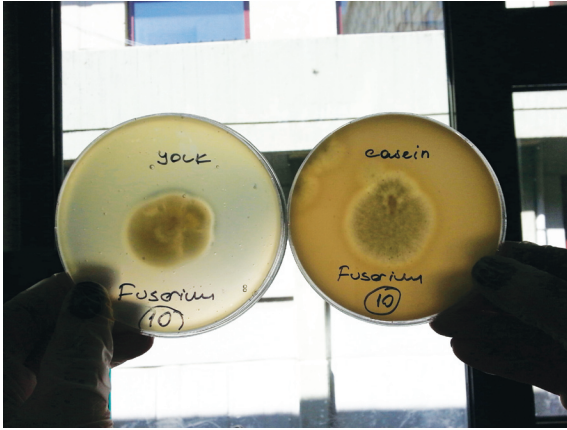
	Hastalardan izole edilen küfler						
	Kazein	Fosfolipaz	Esteraz	DNAz	Eskülin	Katalaz	SAP
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (pnömoni)	+	-	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (sinüzit)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigati</i> (keratit)	-	-	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> (keratit)	+	+	+	-	+	+	+
<i>Fusarium solani</i> (keratit)	-	-	+	-	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (keratit)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (kan)	+	-	+	-	+	+	+
<i>Paecilomyces variotii</i> (keratit)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> (keratit)	+	+	-	-	+	+	+
<i>Rhizopus oryzae</i> (sinüzit)	-	+	-	-	+	+	-
	Havadan izole edilen küfler						
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus nigri</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Aspergillus nigri</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>Aspergillus flavi</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>Ulocladium</i> sp.	+	-	-	+	+	+	-
<i>Ulocladium</i> sp.	+	-	-	-	+	+	-
<i>Mucor</i> sp.	-	-	-	-	+	+	-

karşılaştırma yapacak düzeyde aynı türe ait köken bulunmamaktadır. Bu nedenle her kökenin in vitro virülans özelliği in vivo virülansı ile karşılaştırılmıştır. İn vivo virülans özelliği *G. mellonella* larvalarını öldürme güçleri üzerinden değerlendirilmiştir.

İN vitro virülansı en yüksek olan iki köken yedi virülans faktörü de pozitif olan sinüzit etkeni bir *A. fumigati* ile keratit etkeni bir *Paecilomyces variotii*'dir. İncelenen yedi virülans faktöründen altısı pozitif olan keratit etkeni *A. terreus*'dur. İncelenen yedi virülans faktöründen beşi pozitif olan hasta izolatları pnömoni etkeni üç *A. fumigati* kökeni, keratit etkeni *F. solani*, kan izolatu *P. lilacinus* ve keratit etkeni *A. alternata* kökenidir. Üç virülans faktörü pozitif olan sinüzit etkeni *R. oryzae*, iki faktör pozitif olan keratit etkenleri olan *A. fumigati* ile *F. solani*'dir.

Virülansı en yüksek kökenler sistemik infeksiyon etkeni kökenler değildir. İn vitro virülans faktörü içermek ile sistemik enfeksiyon etkeni olmak arasında ilişki gösterilememiştir.

Havadan izole edilen küf kökenlerinden incelenen yedi faktörün yedisine ve altısına sahip olan köken bulunmamaktadır. En yüksek in vitro virülans faktörüne sahip olan beş faktör ile iki *P. citrinum* kökeni ve iki *A. nigri* kökenidir. Dört virülans faktörüne sahip kökenler bir *P. citrinum*, bir *C. cladosporoides*, bir *Ulocladium* sp. kökenidir. Üç virülans faktörüne sahip olanlar *P. chrysogenum*, *A. flavi* ve *Ulocladium* sp. kökenidir. İki virülans faktörüne sahip olan *Mucor* sp. kökeni, tek faktör olarak yalnızca eskülin hidrolizi özelliği olan *C. cladosporoides* kökenleridir.

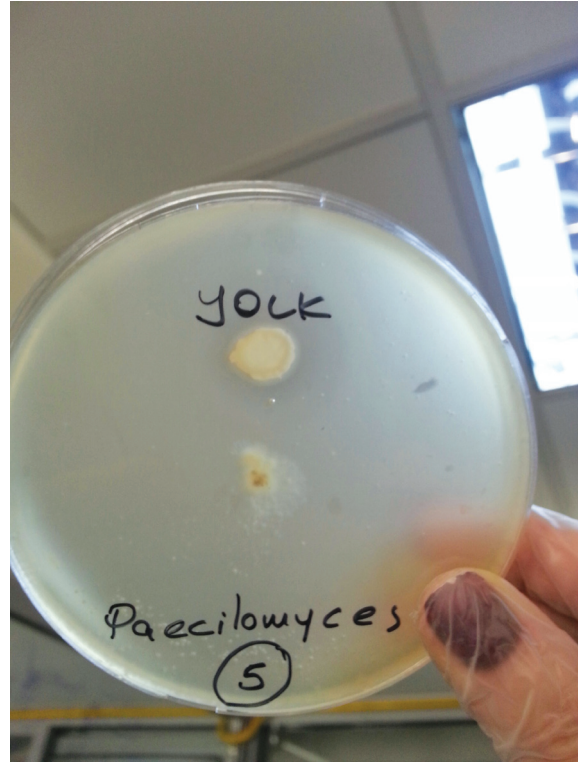


Resim 1. *Fusarium* kolonisinin Yolk agar ve kazein agardaki görünümü.



Resim 2. *Aspergillus terreus*'un Tween 80 opasite testi.

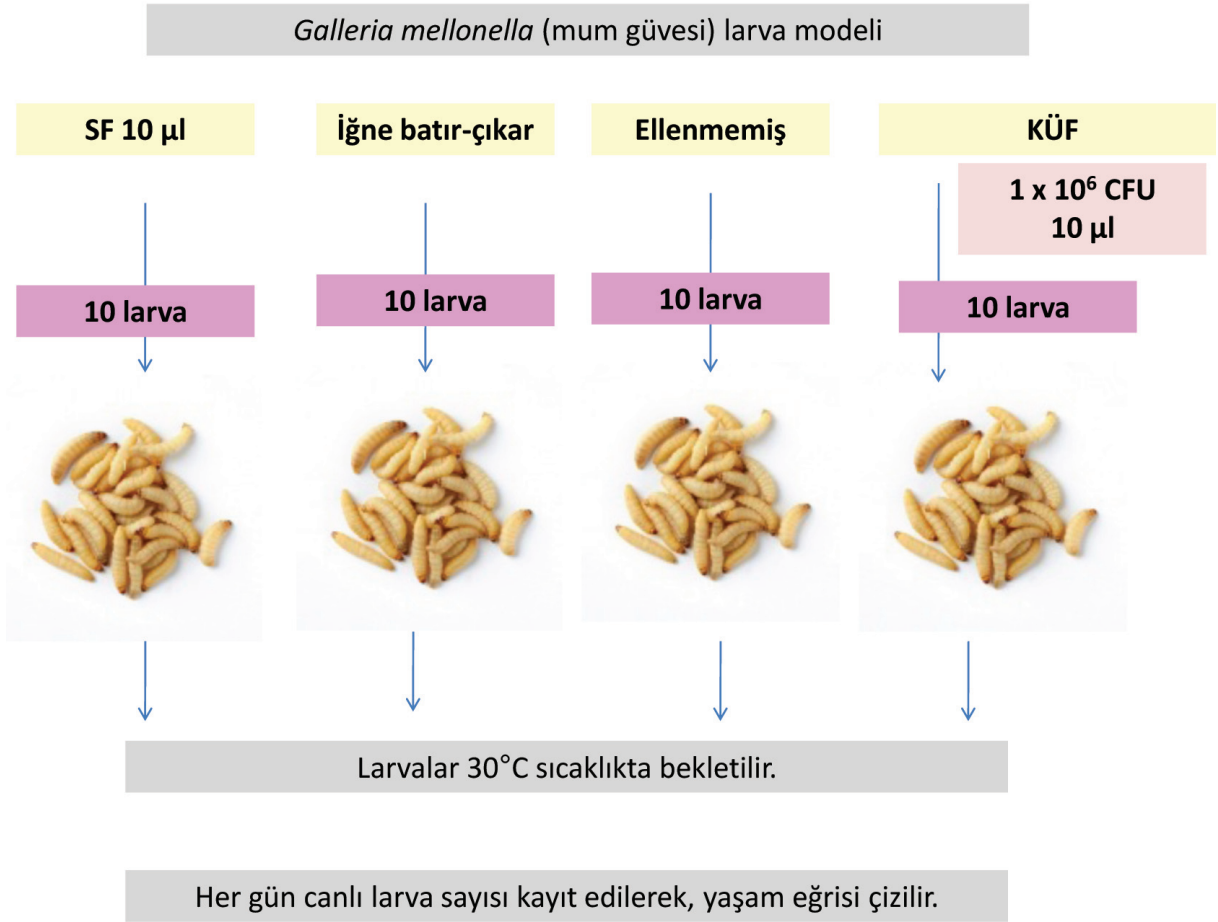
İn vitro virülans özelliği düşük olan *Mucor* kökeni, hava örneği olarak izole edilen cinsler arasında en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir. *Penicillium* cinsi ise enfeksiyon etkeni olarak neredeyse hiç izole edilmemekle birlikte, in vitro virülans özelliği diğer havasal küflerden yüksek bulunmuştur. Az köken olması nedeniyle kesin bir yargıya varılamamakla birlikte, havadan izole edilen kökenler için in vitro



Resim 3. *Paecilomyces* kolonisinin Yolk agardaki görünümü.

virülansın önemli bir faktör olmadığı düşünülmüştür.

Bu çalışmanın in vivo bölümünde 12 klinik köken ile 14 hava örneği larvalara verilmiştir. Larvalar 12 gün boyunca takip edilmiştir. Her grupta 10 larva bulunmaktadır. Yaşamda kalan larva sayıları esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri çizilmiştir. İn vivo virülansı en yüksek kökenler hastalardan izole edilen keratit etkeni *F. solani* ve *A. terreus* kökenleri ile hava örneğinden izole edilen *Ulocladium* sp. ve *Mucor* sp. kökenleridir. Bu kökenlerin in vitro virülans faktörü kapasiteleri ile in vivo öldürme güçleri uyumlu bulunmamıştır. İn vivo virülansı en düşük olan kökenler havadan izole edilen *Cladosporium* kökenleri, *Penicillium* kökenleri ve *A. nigri* kökenleridir. Hastalardan izole edilen kökenler ile oluşturulan larva enfeksiyonunda 12 günde az sayıda larva canlı kalmıştır. Canlı larva kalan kökenler *Paecilomyces* kökenleri, *Aspergillus*'un keratit ve sinüzit etkenleri



Şekil 1.

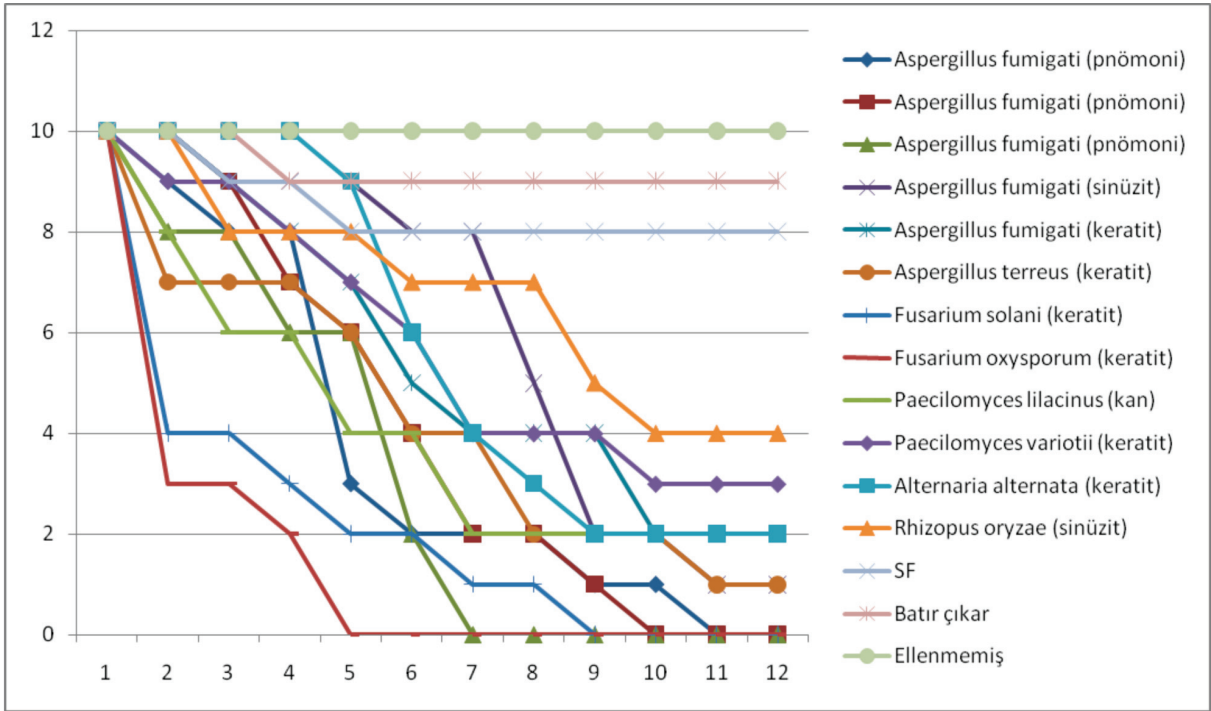
Alternaria ve *Rhizopus* kökenidir. Bu düşük in vivo virülans gösteren kökenler in vitro virülans faktörü bakımından güçlü kökenlerdir. Burada da yine in vitro virülans ve in vivo virülans uyumlu bulunmamıştır.

TARTIŞMA

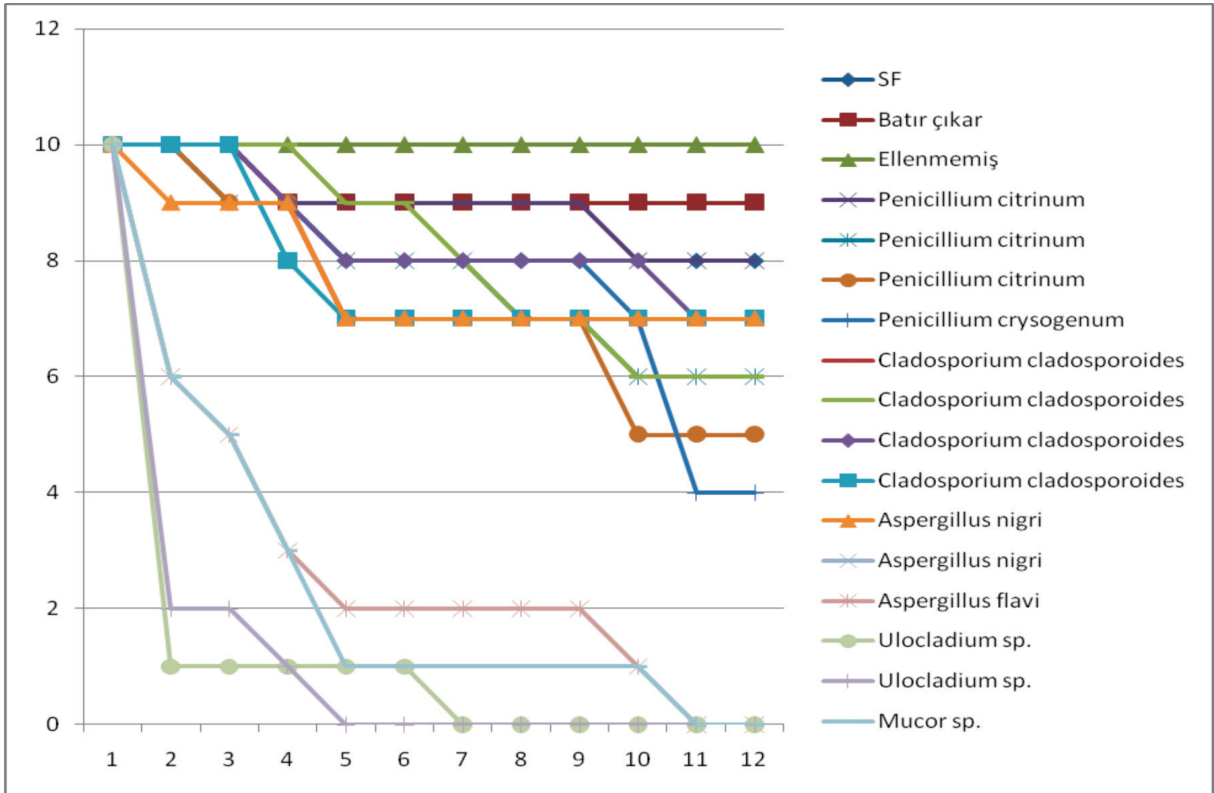
Mantar enfeksiyonlarında patogenezin temelinde mantara ait olan virülans özellikleri yanında konağın bağışık durumu da yer almaktadır. Doğada bulunan ve virülansı çok düşük olan Mucoromycotina alt şubesine ait mantarlardan *Mucor*, *Rhizopus* gibi cinsler, uygun konağa öldürücü enfeksiyonlara yol açarlar. Virülans özellikleri bugüne kadar çok ayrıntılı şekilde çalışılmamış olan ve havada bol bulunan *Alternaria*, *Penicillium* ve *Cladosporium* gibi

cinsler ise çok nadiren enfeksiyon etkenidir. Ancak çok düşük konaklarda etken olarak izole edilmişlerdir⁽²¹⁾.

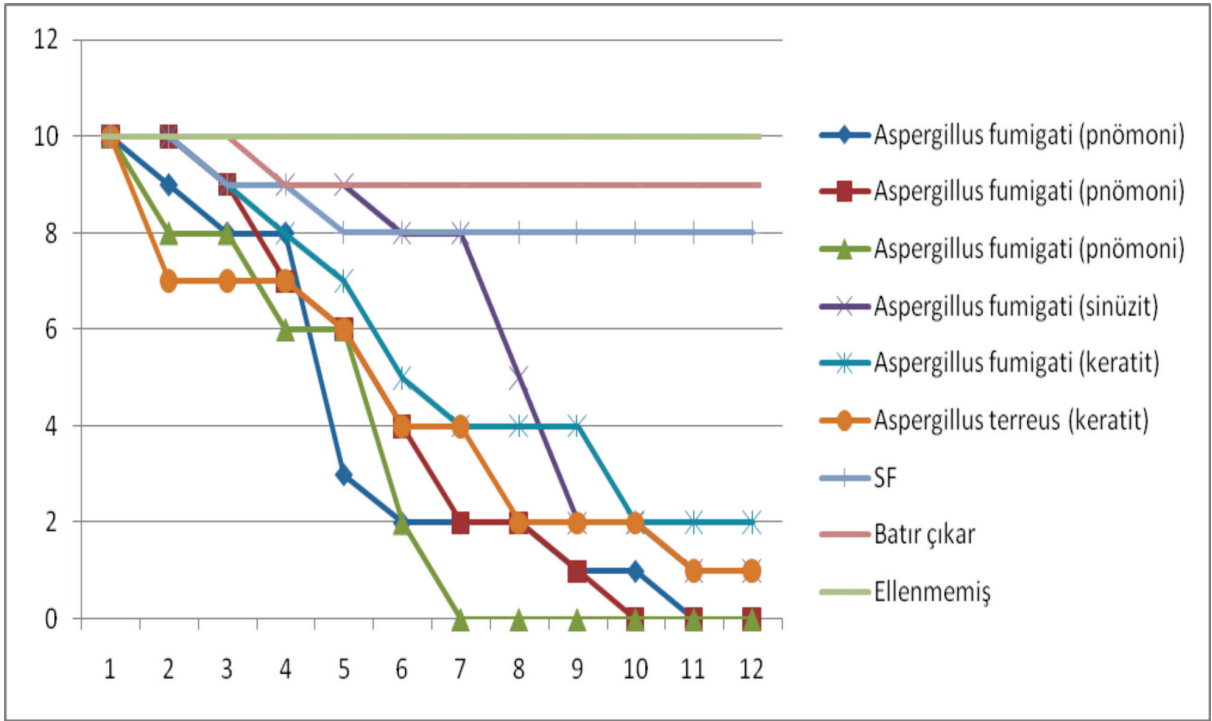
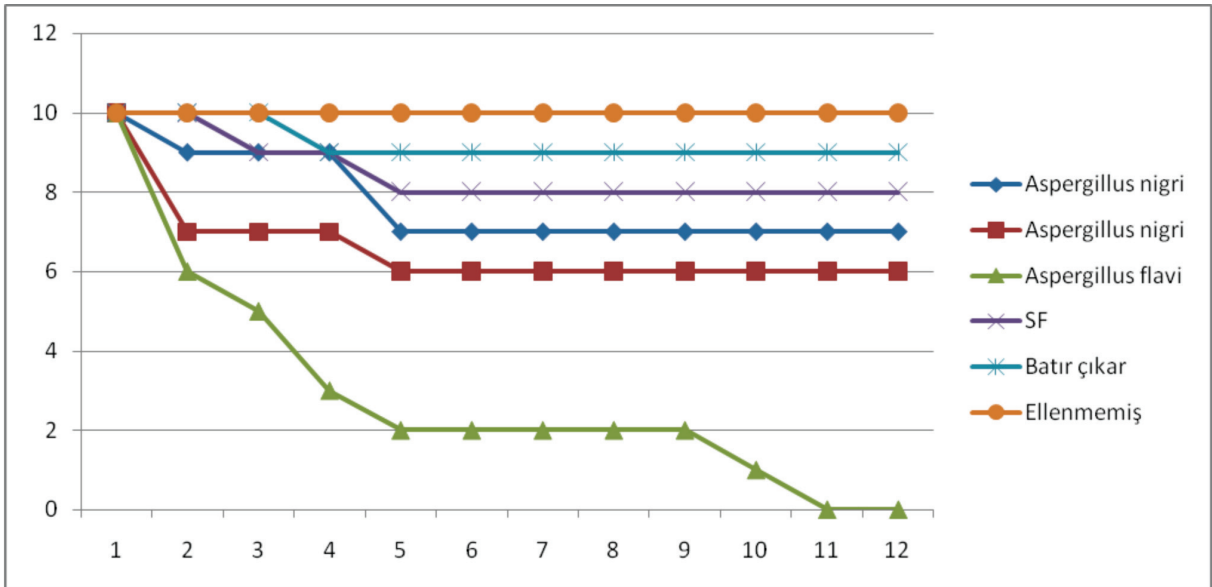
Çalışmamızda hastalardan izole edilen küf kökenlerinde belirgin bir virülans yüksekliği gösterilememiştir. Aynı şekilde, havadan izole edilen kökenler için de virülans düşüklüğüne dair kanıt elde edilememiştir. İn vivo virülans ile in vitro virülans arasında da uyumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu sonuçlar bize küf mantarlarının enfeksiyon etkeni olabilmesinde içerdikleri virülans faktörlerinden çok, konak faktörlerinin önemli olduğunu düşündürmektedir. Maya mantarlarından *Candida*'lar ile yapılan virülans çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Virülansı yüksek kökenlerin sistemik enfeksiyon, düşük kökenlerin lokal enfeksiyon oluşturu-



Grafik 1. Hasta örneklerinin Kaplan-Meier grafiği.



Grafik 2. Hava örneklerinin Kaplan-Meier grafiği

Grafik 3. Hastalardan izole edilen *Aspergillus* kökenlerinin Kaplan-Meier grafiği.Grafik 4. Havadan izole edilen *Aspergillus* kökenlerinin Kaplan-Meier grafiği.

duğu gösterilmiştir⁽²²⁾. Maya mantarları ile oluşan enfeksiyonlarda konak faktörleri de çok önemlidir⁽³⁾. Ancak mantarlara ait virülans faktörlerinin de patogeneze önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, incelediğimiz in vitro virülans faktörleri kazein hidrolizi, fosfolipaz, esterase, DNaz, katalaz ve SAP varlığı ile eskülin hidrolizidir. Bu faktörler daha önce küf mantarlarını içeren geniş gruplarda çalışılmamıştır. Bu nedenle, elde ettiğimiz sonuçlar başka çalışmalar ile

karşılaştırılmamıştır. Küf mantarlarından *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Mucor* cinsi gibi insanlarda sık enfeksiyon etkeni olan cinslerin virülans özellikleri daha çok bilinmektedir.

Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ yaptıkları yeni tarihli bir çalışmada, göz enfeksiyonlarından izole edilen 14 *Aspergillus* kökeninden bir tanesinde proteinaz üretimi pozitif bulunurken, fosfolipaz üretimi tamamında negatif bulunmuştur. Bizim *A. fumigati* kökenlerimizden biri hariç hepsi fosfolipaz pozitif, *A. nigri* kökenlerimiz fosfolipaz negatif, *A. flavi* proteinaz negatif, *A. nigri* kökenleri proteinaz pozitif bulunmuştur. Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ çalışmasında, 12 *Fusarium* kökeninden 5'inde proteinaz aktivitesi pozitif ve tamamında fosfolipaz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Bizim *Fusarium* kökenleri fosfolipaz negatif iken, *F. solani* proteinaz negatif, *F. oxysporum* pozitif bulunmuştur. Her iki tür için de iki çalışmada kısmen farklı sonuçlar elde edilmiştir. *Fusarium* cinsi küflerin virülans faktörleri sınırlı sayıda çalışmada konu edilmiştir. Fosfolipaz ve esteraz ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, *Fusarium* kökenlerinden fosfolipaz aktivitesi fazla olanın esteraz aktivitesinin azaldığı, tersine esteraz fazla olanın da fosfolipaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir⁽²³⁾. Bu durumda, virülans türden çok, kökenler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu sonuç, Sav ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ çalışmasında elde ettikleri sonuçlar ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların farklı olmasını açıklayabilir.

Aspergillus cinsi küflerin virülans faktörleri gliotoksin üretimi, katalaz aktivitesi, fagositoz sonrası makrofaj içinde canlı kalabilme özelliğidir⁽²⁴⁾. Fosfolipaz üretimi in vitro virülans faktörü olarak bazı çalışmalarda incelenmiştir. 2004 tarihli bir çalışmada, *Aspergillus* cinsine ait çevresel ve klinik kökenler fosfolipaz üretimi bakımından karşılaştırılmış ve bütün kökenler fosfolipaz pozitif bulunmuştur. Fosfolipaz C'nin klinik kökenlerde daha fazla üretiliyor olması nedeniyle, A ve B'den daha

fazla aspergilloz patogenezine katılmış olabilecekleri vurgulanmıştır⁽²⁵⁾.

Ülkemizden yapılan Alp ve ark.'nın⁽²⁶⁾ çalışmasında, çeşitli tür komplekslerine ait 73 *Aspergillus* kökeni elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz açısından incelenmiştir. Elastaz aktivitesi *A. fumigatus* kökenlerinin % 95.6'sında, *A. flavus* kökenlerinin % 82.6'sında pozitif ve *A. niger* kökenlerinde negatif bulunmuştur. Asit proteinaz aktivitesi ise 45 *A. fumigatus* kökeninden 20 tanesinde pozitif bulunmuştur. Bütün *A. fumigatus* kökenleri fosfolipaz pozitif iken, *A. flavus* ve *A. niger* negatif bulunmuştur⁽²⁶⁾. Çalışmamızda, yüzde hesaplamaya yetecek sayıda köken bulunmadığı için tam bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak iki çalışma sonuçlarına bakıldığında, *Aspergillus* cinsi içinde esteraz, fosfolipaz ve proteinaz üretiminin kökenler arasında değişken olabileceği görülmektedir.

Ülkemizden yapılan bir başka çalışmada, *Aspergillus* kökenleri asit proteinaz ve fosfolipaz üretimi açısından incelenmiştir. Test edilen 30 *A. fumigatus* kökeninden 23 tanesinde asit proteinaz, 28 tanesinde fosfolipaz pozitifliği bulunmuştur. *A. flavus* kökenlerinden hiç birinde proteinaz ve fosfolipaz gösterilememiştir. Test edilen 4 *A. niger* kökeninden hiçbirinde asit proteinaz görülmezken, bir tanesinde fosfolipaz pozitif bulunmuştur⁽¹⁹⁾.

Çalışmamızda, temel hipotezimiz, çevresel küf örnekleri ile hastalardan elde edilen örnekler arasında virülans farkı olduğunun gösterilmesidir. Ancak hipotezimiz doğrulanamamıştır. Yani çevresel küf kökenlerinin daha düşük virülansa sahip oldukları gösterilememiştir. Bu çalışmanın en önemli özgün değerini larva modeli oluşturmaktadır. Larvalarda oluşturulan küf enfeksiyonlarında etken olan çevresel ve klinik kökenler arasında öldürme gücü bakımından bir fark olmadığı ilk kez gösterilmiştir. Bir önceki çalışmamızda, *Fusarium* ve *A. terreus* kullanarak

oluşturduğumuz larva modellerinden elde edilen in vivo virülans sonuçları ile bu çalışmamızda aynı etkenler için elde ettiğimiz sonuçlar benzer bulunmuştur⁽²⁰⁾.

Sonuç olarak, farklı cins ve türlerde küf mantarları ile yapılan çalışmalardan elde edilen farklı yüzdeler bulunmaktadır. Küf mantarlarının virülans özellikleri kökenler arasında değişken olabilir. Hastalık oluşması için gerekli temel virülans faktörleri konağa uyumluluk, bağışık sisteme ait mekanizmalardan kurtulabilme ve konağın mantarı öldürme gücüne karşı direnebilmektir. Küf mantarları ancak düşük konaklarda sistemik enfeksiyon oluşturabilirler. Patogenezi konağa ait faktörler küfe ait faktörlerden daha önemli olmaktadır. Bu bakımdan normal floramızda yer almaları nedeniyle endojen enfeksiyon oluşturan maya mantarlarının patogenezi küflerden bütünüyle farklıdır.

KAYNAKLAR

1. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol* 2017; 10:296-322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>
2. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol* 2010; 12:1535-43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x>
3. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:469-88.
4. Kasprzyk I. Aeromycology-main research fields of interest during the last 25 years. *Ann Agric Environ Med* 2008; 15:1-7.
5. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, et al. *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016; 84:2724-39. <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>
6. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7:324-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.001>
7. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832:1378-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.008>
8. Ortiz GE, Noseda DG, Ponce Mora MC, Recupero MN, Blasco M, Albertó E. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. *Enzyme Res* 2016; 2016:3016149. <https://doi.org/10.1155/2016/3016149>
9. Ellepola AN, Samaranayake LP, Khan ZU. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Braz J Microbiol* 2016; 47:911-6. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.009>
10. Fatahinia M, Poormohamadi F, Zarei Mahmoudabadi A. Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8:e20893. <https://doi.org/10.5812/jjm.20893>
11. Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* 1957; 73:590-1.
12. de Paula Menezes R, de Melo Riceto ÉB, Borges AS, de Brito Röder DV, dos Santos Pedrosa R. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol* 2016; 66:61-5. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>
13. Edberg SC, Trepeta RW, Kontnick CM, Torres AR. Measurement of active constitutive beta-D-glucosidase (esculinase) in the presence of sodium desoxycholate. *J Clin Microbiol* 1985; 21:363-5.
14. Edberg SC, Chaskes SJ, Altire-Werber E, Singer JM. Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1980; 12:332-5.
15. Chester B, Moskowitz LB. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:439-41.
16. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965; 4:187-93. <https://doi.org/10.1080/00362176685190421>
17. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. *J Mycol Med* 2016; 26:255-60. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.05.001>
18. Sav H, Ozdemir HG, Altınbas R, Kiraz N, İlkit M, Seyedmousavi S. Virulence attributes and antifungal susceptibility profile of opportunistic fungi isolated from ophthalmic infections. *Mycopathologia* 2016; 181:653-61. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0018-3>
19. Birinci A, Bilgin K, Tanrıverdi Çaycı Y. Klinik *Aspergillus* spp. izolatlarında virülans faktörü olarak asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:491-4. <https://doi.org/10.5578/mb.7782>
20. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, Altay A, Aliyeva Z, Bozdayı G, Çağlar K. Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:366-76. <https://doi.org/10.5578/mb.9701>

21. **Ruangritchankul K, Chindamporn A, Worasilchai N, Poumsuk U, Keelawat S, Bychkov A.** Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:14840-52.
22. **Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B.** Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol* 2016; 32:89-95.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
23. **Ishida K, Alviano DS, Silva BG, et al.** Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45:411-6.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500034>
24. **Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG.** Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia* 2014; 178:363-70.
<https://doi.org/10.1007/s11046-014-9768-y>
25. **Birch M, Denning DW, Robson GD.** Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2004; 42:81-6.
<https://doi.org/10.1080/13693780310001610029>
26. **Alp S, Arikian S.** Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol* 2008; 48:331-7.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200700349>