

## Klinik *Aspergillus* spp. İzolatlarında Virülans Faktörü Olarak Asit Proteinaz ve Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması

### Investigation of Acid Proteinase and Phospholipase Activity as Virulence Factors in Clinical *Aspergillus* spp. Isolates

Asuman BİRİNCİ<sup>1</sup>, Kemal BİLGİN<sup>2</sup>, Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

<sup>2</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Samsun.

<sup>2</sup> Ondokuz Mayıs University Vocational Higher School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Samsun, Turkey.

<sup>3</sup> Ankara Meslek Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>3</sup> Ankara Occupational Diseases Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey

Geliş Tarihi (Received): 03.12.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 26.05.2014

#### ÖZET

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunmakta ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. *Aspergillus fumigatus* kompleks insanlarda aspergilloz enfeksiyonlarından en sık izole edilen etken olmakla beraber; *Aspergillus flavus* kompleks ve *Aspergillus niger* kompleks de son zamanlarda önemi artan enfeksiyon etkenleri olmuşlardır. İnvazif aspergilloz enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynayan faktörler arasında; immün süpresyon, hematolojik malignensi ve kortikosteroid kullanımı gibi konağa bağlı faktörlerin yanı sıra, *Aspergillus* spp. suşlarında bulunan elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz enzimleri gibi çeşitli virülans faktörleri de yer almaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilmiş olan 30 *A.fumigatus* kompleks, dokuz *A.flavus* kompleks ve dört *A.niger* kompleks izolatında asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. İzolatlarda asit proteinaz aktivitesi siğir serum albuminli agar (BSA); fosfolipaz aktivitesi ise yumurta sarısı içeren agar plakları kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmamızda, *A.fumigatus* kompleks izolatlarının %76.7 (23/30)'ünde asit proteinaz; %93.3 (28/30)'ünde ise fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Dokuz *A.flavus* kompleks izolatının hiçbirisinde asit proteinaz veya fosfolipaz aktivitesi tespit edilmemiştir. *A.niger* kompleks (n= 4) izolatlarının hiçbirisinde asit proteinaz aktivitesi saptanmazken, 1 (%25) izolatta fosfolipaz aktivitesi belirlenmiştir. *A.fumigatus* kompleks izolatlarından asit proteinaz saptananların tümünde (n= 23) aynı zamanda fosfolipaz aktivitesi de saptanmıştır. Sonuç olarak, *Aspergillus* spp. suşlarında asit proteinaz ve

**İletişim (Correspondence):** Prof.Dr. Asuman Birinci, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. Tel (Phone): +90 362 312 1919, E-posta (E-mail): asumanbirinci@yahoo.com

fosfolipaz gibi enzimlerin patogenezi ile ilişkisinin aydınlatılabilmesi için, çok sayıda izolatin çalışıldığı çok merkezli çalışmaların yapılması ve bunların klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekli görünmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Aspergillus*; virülans faktörleri; asit proteinaz; fosfolipaz.

## ABSTRACT

*Aspergillus* spp. are widespread in nature and cause severe infections especially in immunocompromised patients. *Aspergillus fumigatus* complex is the most common species that causes infections in humans; however *Aspergillus niger* complex and *Aspergillus flavus* complex are the emerging agents that are isolated frequently from clinical specimens more recently. Besides the host factors such as immunosuppression, hematologic malignancy and corticosteroid use, fungal virulence factors such as elastase, acid protease and phospholipase enzymes are considered among the factors that affect the development of invasive aspergillosis. The aim of this study was to detect the acid proteinase and phospholipase enzyme activities in 30 *A.fumigatus* complex, nine *A.flavus* complex and four *A.niger* complex strains isolated from clinical specimens. Acid proteinase and phospholipase activities of the isolates were investigated by using bovine serum albumin agar (BSA), and egg yolk agar plates, respectively. Acid proteinase and phospholipase activity was detected in 76.7% (23/30) and 93.3% (28/30) of *A.fumigatus* complex isolates, respectively. None of the nine *A.flavus* complex isolates exhibited acid proteinase or phospholipase activity. Acid proteinase activity was not detected in any of the *A.niger* complex isolates (n= 4), however phospholipase activity was detected in one (25%) isolate. All of the acid proteinase positive *A.fumigatus* complex strains (n= 23) were also positive for phospholipase activity. In conclusion, further larger scale multicenter studies supported by clinical data, are needed to enlighten the roles of acid proteinase and phospholipase in the pathogenesis of infections due to *Aspergillus* spp.

**Key words:** *Aspergillus*; virulence factors; acid proteinase; phospholipase.

## GİRİŞ

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunmakta ve sporlarının inhalasyonu yoluyla özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda bronkopulmoner enfeksiyonlara neden olmaktadır<sup>1</sup>. İmmün yetmezlikli hasta sayısındaki artışla birlikte, *Aspergillus* türleri son yıllarda klinik örneklerden daha sık izole edilir olmuştur. İnsanlarda meydana gelen hastalıklara çoğunlukla *Aspergillus fumigatus* kompleks türleri neden olurken; onu *Aspergillus flavus* kompleks ve *Aspergillus niger* kompleks takip etmektedir<sup>2</sup>. *Aspergillus* türlerine bağlı invazif enfeksiyonların gelişmesinde immün süpresyon, hematolojik malignensi ve kortikosteroid kullanımı gibi konağa ait faktörlerin yanında, *Aspergillus* türlerinin sahip olduğu virülans faktörleri de önemli rol oynamaktadır<sup>3,4</sup>. En önemli virülans faktörlerinden biri, konak dokulara invazyona yardımcı olan elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz gibi ekstraselüler enzimlerdir<sup>3</sup>. Bu çalışmanın amacı; *A.fumigatus* kompleks, *A.flavus* kompleks ve *A.niger* kompleks türlerinde asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesinin araştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mikoloji Laboratuvarında tanımlanan 30 *A.fumigatus* kompleks, 9 *A.flavus* kompleks ve 4 *A.niger* kompleks izolatu dahil edildi. Mantarların tanımlanması konvansiyonel yöntemlerle<sup>5</sup> yapıldı ve izolatlar Sabouraud dekstroz agar (SDA) içeren tüplerde -80°C'de çalışılincaya kadar saklandı.

Çalışma için, *Aspergillus* spp. izolatları önce SDA içeren tüplere ekildi ve 37°C'de 5 gün inkübe edildi. Beş günlük inkübasyon sonrasında Alp ve Arıkan<sup>6</sup> tarafından tanımlanan şekilde, üremiş olan küf kolonilerinden alınıp 1 ml serum fizyolojik (SF) içerisinde süspansiyon edildi; sonrasında konidyalar bir eküvyon yardımıyla toplanarak başka bir steril tüpe aktarıldı. Bu uygulamadan sonra konidyal süspansiyonun üst kısmı toplandı; SF içeren başka bir tüpe aktararak süspansiyonun bulanıklığı McFarland 0.5'e göre ayarlandı.

Asit proteinaz aktivitesi, Staib<sup>7</sup> tarafından tanımlandığı şekilde sığır serum albümini (BSA) içeren agar plaklarında araştırıldı. BSA agar plakları; %2 glukoz, %0.01 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.05 MgSO<sub>4</sub>, %2 agar ve %1 BSA eklenerek hazırlandı. Her bir küf kolonisinden hazırlanan süspansiyondan 10 µl plaklara inoküle edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Asit proteinaz aktivitesi 3. günün sonunda koloninin çevresinde halo oluşmasıyla değerlendirildi<sup>6,7</sup>.

Fosfolipaz aktivitesi, yumurta sarısı içeren agar plaklarında Price ve arkadaşları<sup>8</sup> tarafından tanımlandığı şekilde çalışıldı. Bu besiyerinin hazırlanmasında SDA besiyeri, 1 M sodyum klorür, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 yumurta sarısı kullanıldı. Yumurta sarısı, besiyerine eklenmeden önce 15 dakika 500x g'de santrifüj edildi; süpernatant steril bir tüpe alınıp, besiyeri otoklav sonrasında 50°C'ye ulaştığında besiyerine eklendi. Hazırlanan besiyeri sonrasında plaklara döküldü. Küf kolonisinden hazırlanmış olan süspansiyondan 10 µl hazırlanmış olan besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun 3. gününde koloni çevresinde beyaz zon oluşması fosfolipaz aktivitesi lehine değerlendirildi<sup>6,7</sup>.

## BULGULAR

*A.fumigatus* kompleks izolatlarının %76.7 (23/30)'ünde asit proteinaz; %93.3 (28/30)'ünde ise fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Dokuz *A.flavus* kompleks izolatının hiçbirisinde asit proteinaz veya fosfolipaz aktivitesi tespit edilmemiştir. *A.niger* kompleks (n= 4) izolatlarının hiçbirisinde asit proteinaz aktivitesi saptanmazken, 1 (%25) izolatta fosfolipaz aktivitesi belirlenmiştir. *A.fumigatus* kompleks izolatlarından asit proteinaz saptananlarda aynı zamanda fosfolipaz aktivitesi de saptanmıştır.

## TARTIŞMA

*Aspergillus* türlerinin virülans faktörleri arasında, adheziner, pigmentler, toksik moleküller ve enzimler yer almaktadır<sup>3</sup>. Bu faktörlerden asit proteinaz, akciğer dokusuna kolonizasyonda ve/veya hümmoral faktörlerin etkisizleştirilmesinde rol oynarken, fosfolipidlerin indirgenmesinde rol oynayan fosfolipaz, epitelyal hasara neden olmaktadır<sup>9</sup>. Bu nedenle klinik *Aspergillus* spp. suşlarında virülans faktörlerinin araştırılması, hastalığın gidişi açısından prognostik değere sahip olabilir. Alp ve Arıkan<sup>6</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, *A.fumigatus* kompleks izolatlarının %44.4 (20/45)'ünde asit proteinaz aktivitesi saptanırken, fosfolipaz aktivitesi tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan fosfolipaz aktivitesi bizim sonuçlarımızla benzerken, asit proteinaz aktivitesine sahip izolat sayısı bizim çalışmamızda daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda ayrıca, Alp ve Arıkan'ın<sup>6</sup>

çalışmasında olduğu gibi, *A.flavus* kompleks izolatlarında asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesi bulunmamıştır. Diğer taraftan, Alp ve Arıkan<sup>6</sup> *A.niger* kompleks izolatlarının (n= 5) hepsinde fosfolipaz aktivitesi saptarken, asit proteinaz aktivitesi saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda da, *A.niger* kompleks izolatlarının (n= 4) hiçbirisinde asit proteinaz aktivitesi tespit edilmemiş, fosfolipaz aktivitesi ise sadece bir izolatta görülmüştür.

Asit proteinaz ve fosfolipaz aktivitesi, *A.fumigatus* kompleks izolatlarının çoğunda bulunmaktadır<sup>3</sup>. Reichard ve arkadaşlarının<sup>10</sup> çalışmasında *A.fumigatus* ile enfekte hastaların akciğer dokularında immüno Floresans yöntemiyle asit proteinaz varlığı gösterilmiştir. Birch ve arkadaşları<sup>11</sup> ise, *A.fumigatus* suşlarının dört farklı tip fosfolipaza (A, B, C, D) sahip olduğunu belirterek, özellikle fosfolipaz C'nin çevresel örneklerden ziyade klinik örneklerden izole edilen suşlara ait olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, hem asit proteinaz hem de fosfolipaz enzimleri *A.fumigatus* kompleks izolatlarının çoğundan (sırasıyla %76.7 ve %93.3) izole edilmiştir. Ancak *A.flavus* kompleks izolatlarında her iki enzim aktivitesi de tespit edilmemiştir. Bu konu üzerinde daha yeterli yorumlar yapılabilmesi için, *A.niger* kompleks ve *A.flavus* kompleks izolatlarının sayısının daha fazla olduğu yeni çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur Respir Rev 2011; 20(121): 156-74.
2. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. Mycoses 2009; 52(3): 206-22.
3. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol 2010; 27(4): 155-82.
4. Karthaus M, Buchheidt D. Invasive aspergillosis: new insights into disease, diagnostic and treatment. Curr Pharm Des 2013; 19(20): 3569-94.
5. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (eds). Mycology pp: 1174-9. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
6. Alp S, Arıkan 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(5): 331-7.
7. Staib F. Serum proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. Sabouraudia 1965; 4(3): 187-93.
8. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20(1): 7-14.
9. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microb Rev 1999; 12(2): 310-50.
10. Reichard U, Eiffert H, Ruchel R. Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. J Med Vet Mycol 1994; 32(6): 427-36.
11. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. Med Mycol 2004; 42(1): 81-6.