

# Keratit Olgularından Elde Edilen *Fusarium* İzolatlarının Virülans Faktörlerinin ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

## Detection of Virulence Factors and Antifungal Susceptibilities of *Fusarium* Strains Isolated from Keratitis Cases

Tuğba ÇUHADAR<sup>1</sup>, Nilgün KARABIÇAK<sup>2</sup>, Tuğba ÖZDİL<sup>3</sup>, Didem ÖZGÜR<sup>4</sup>, Feza OTAĞ<sup>4</sup>, Kenan HİZEL<sup>3</sup>, Ayşe KALKANCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>1</sup> Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarı, Ankara.

<sup>2</sup> Turkish Public Health Institution, Mycology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup> Gazi University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>4</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>4</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

\* Bu çalışma, 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (8-12 Kasım 2017, Antalya)'nde bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 31.01.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.03.2018

### ÖZ

*Fusarium* türleri keratit etkeni olarak giderek önem kazanmaktadır. Patogenez özellikleri ve virülans faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Mantarların en çok bilinen virülans faktörleri arasında biyofilm, proteinaz ve diğer hidrolitik enzimlerin üretimi yer almaktadır. *Fusarium* türleri genel olarak antifungal-lere dirençli olmakla birlikte, direncin türe hatta izolata bağlı olarak değişebileceği vurgulanmaktadır. Bu nedenle, *Fusarium*'a bağlı keratit olgularının takibinde, izolatların patojenik özellikleri ve antifungal duyarlılık testleri (AFDT) önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, klinik *Fusarium* izolatlarının virülans özelliklerinin ve AFDT sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Keratit olgularından elde edilen 25 *Fusarium* izolatu cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bu izolatlar arasından, 13 tanesi rRNA üzerindeki ITS bölgesi dizilenecek tür kompleksi düzeyinde tanımlanmıştır. Bu 13 izolatın hemoliz oluşturma, kazeinaz, esteraz, proteinaz ve fosfolipaz aktiviteleri incelenmiştir. Biyofilm üretimi 25 izolatın tamamında incelenmiştir. İn vivo deneysel enfeksiyon modeli olarak *Galleria mellonella* larvaları kullanılmıştır. İzolatların amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazole duyarlılıkları Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) M38-A2 rehberinde önerilen mikrodilüsyon yöntemine göre çalışılmıştır. Antifungal Duyarlılık Testleri Alt Komitesi tarafından *Fusarium* tür kompleksine özgü klinik direnç sınır değeri (clinical breakpoint; CBP) be-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06500, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 532 357 0684, E-posta (E-mail): aysekalkanci@email.com

İrilenmediğinden, antifungal ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin yorumunda epidemiyolojik eşik değerleri (epidemiological cutoff value; ECV) uygulanmıştır. İzolatlardan altı tanesi *Fusarium oxysporum* tür kompleksi, altı tanesi *Fusarium solani* tür kompleksi, biri de *Fusarium brachygybbosum* türü olarak tanımlanmıştır. Birer *F.solani* ve *F.oxysporum* izolatı alfa hemoliz oluşturmuş; bütün izolatlar kazeinaz pozitif; üç *F.oxysporum* ve iki *F.solani* izolatı esteraz pozitif; bir *F.solani* izolatı proteinaz pozitif; beş *F.oxysporum* ve iki *F.solani* izolatı fosfolipaz pozitif ve 25 izolattan %52'sinin biyofilm aktivitesi pozitif bulunmuştur. *G.mellonella* larva modelinde *Fusarium* inokülasyonu sonrasında larvaların yedi gün canlı kaldığı gözlenmiştir. Antifungal duyarlılık sonuçlarına göre, amfoterisin B için MİK aralığı 0.5-8 µg/ml, itraconazol için 2-32 µg/ml, vorikonazol için 0.5-8 µg/ml, posakonazol için 0.5-16 µg/ml olarak belirlenmiş ve ECV değerlerine göre *F.solani* ve *F.oxysporum* izolatlarının tümü dört antifungal için de vahşi tip (wild type) olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; *Fusarium* izolatlarının bazı virülans faktörlerine sahip oldukları, in vitro virülans özellikleri ile in vivo virülans özellikleri arasında uyumsuzluk olduğu ve bazı izolatların antifungalere duyarlı vahşi tip izolatlar olarak farklılık gösterdikleri belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Fusarium*; virülans; antifungal duyarlılık; *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

*Fusarium* species have gained importance as a cause of keratitis. The pathogenicity and virulence factors of genus *Fusarium* remain largely unknown. Several putative virulence factors have been reported for fungal pathogens, including biofilm formation, production of proteinases and other hydrolytic enzymes. It has been emphasized that *Fusarium* species are generally resistant to antifungals but the resistance may vary depending on the species and even according to the isolate. For this reason, pathogenic features and antifungal susceptibility of the clinical isolates gained importance for the management of keratitis cases. The aim of this study was to identify clinical *Fusarium* isolates, to evaluate their virulence factors and to show antifungal susceptibility patterns. The identification of *Fusarium* was made on genus level isolated from 25 keratitis cases. Among them, 13 of the isolates were identified by ITS sequencing on species complex level. The production of hemolytic activity, caseinase, esterase, proteinase and phospholipase activity were investigated in 13 of the isolates. Biofilm production was searched among all 25 isolates. *Galleria mellonella* larvae was used as in vivo infection model. Antifungal susceptibility for amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 microdilution assay guidelines. As the subcommittee on antifungal susceptibility tests did not determine the clinical resistance breakpoints (CBP) specific to *Fusarium* species complex, the epidemiological cut off values (ECV) were used for the interpretation of the minimum inhibitory concentration (MIC) values of the antifungal drugs. Isolates were identified as six *F.oxysporum*, six *F.solani* species complex and one *F.brachygybbosum*. One *F.solani*, one *F.oxysporum* were positive for hemolytic activity; all isolates were caseinase positive; three *F.oxysporum* and two *F.solani* isolate were esterase positive; one *F.solani* isolate was proteinase positive; five *F.oxysporum* and two *F.solani* isolates were phospholipase positive; biofilm activity was positive in 52% of the 25 isolates. The larvae survived for seven days after *Fusarium* inoculation in the *G.mellonella* larvae model. MIC range was 0.5-8 µg/ml for amphotericin B, 2-32 µg/ml for itraconazole, 0.5-8 µg/ml for voriconazole, 0.5-16 µg/ml for posaconazole and according to the ECV values *F.solani* and *F.oxysporum* isolates were determined as wild type for four antifungal agents. As a result, it was shown that *Fusarium* isolates have some virulence factors, there was a concordance between in vitro virulence properties and in vivo virulence characteristics and some of the isolates were classified as antifungal susceptible wild type isolates.

**Keywords:** *Fusarium*; virulence; antifungal susceptibility; *Galleria mellonella*.

## GİRİŞ

*Fusarium* türleri toprak, hava ve bitkilerde yaşayabilen, septalı hife sahip hiyalen küf mantarlarıdır. Son taksonomik düzenlemelerden sonra klinik önemi olan 10 adet tür kompleksi tanımlanmıştır. *Fusarium solani* ve *Fusarium oxysporum* tür kompleksleri insan-

larda en sık hastalığa neden olan türlerdir. *F.solani* tür kompleksi içinde beş tür ile 17 isim verilmemiş yeni tür bulunmaktadır. *F.oxysporum* tür kompleksi içinde ise isim verilmemiş üç tür bulunmaktadır. *F.verticillioides* ve *F.proliferatum* gibi sık görülen türler, *F.fujikuroi* tür kompleksinde toplanmıştır. *F.brachygibbosum* türü *F.sambucinum* tür kompleksi içerisinde sınıflandırılmıştır<sup>1</sup>.

Sağlıklı kişilerde en sık keratit etkeni olarak izole edilen *Fusarium* cinsi mantarların önemi, antifungallere direnç göstermeleridir. Bağışıklık sistemi baskılanmış insanlarda oluşturdukları invaziv enfeksiyonlar, patojenin doğal direnç göstermesi nedeniyle, tedavisi zor hastalıklar arasında yer almaktadır<sup>2</sup>. Keratit, kornea tabakasının yoğun inflamasyonu ve ülseri ile seyreden ciddi bir enfeksiyon hastalığıdır. *Fusarium* cinsinin neden olduğu fungal keratit en sık kontakt lens kullanımı ile ilişkili bulunmuştur<sup>3,4</sup>.

*Fusarium* cinsine ait küflerin virülans özellikleri ve hastalık yapma mekanizmaları ile ilgili çalışmalar, *Aspergillus* cinsi ile karşılaştırıldığında, daha azdır. Enfeksiyon modeli olarak *Galleria mellonella* larvalarının kullanılması son yıllarda ilgi çekmektedir. Mum güvesi olarak isimlendirilen bu canlı, esasen bal kovanlarının zararlısı olarak bilinmektedir. Yaklaşık bir ay süren bir yaşam döngüsü vardır. Larvası virülans modeli olarak kullanıldığında, etik kurul onayı istenmemektedir. *Fusarium*'un kullanıldığı bazı larva modeli çalışmaları yayımlanmıştır<sup>5</sup>.

Mantarlara bağlı göz enfeksiyonlarında virülansın in vitro olarak gösterilmesinde en sık kullanılan virülans parametreleri proteinaz aktivitesi, fosfolipaz aktivitesi ve biyofilm oluşumudur<sup>6</sup>. Fungal biyofilm oluşumunun keratit patogenezindeki önemi bilinmektedir<sup>7</sup>. Biyofilm oluşumu antifungal duyarlılığı azaltması nedeniyle tedaviyi etkilemektedir<sup>8</sup>.

*Fusarium* cinsi mantarlarda antifungal direnç türe özgü özellikler gösterdiği için, tür düzeyinde tanı büyük önem taşımaktadır. Tür düzeyinde direnç görülmesinin yanı sıra, izolata özgü direnç gelişimi de görülebildiğinden, antifungal duyarlılık sonucu önemlidir<sup>9</sup>. Türe özgü klinik sınır değer (CBP) saptanması için yeterli veri bulunmadığı durumlarda, tedaviye daha az yanıt verecek izolatların tanımlanması amacıyla "epidemiyolojik eşik değerlerin (epidemiological cut-off value; ECV) kullanılması gerekmektedir. Epidemiyolojik eşik değerlerin; vahşi tip (wild type, antifungal ile karşılaşmamış veya kazanılmış direnç saptanmayan) ile vahşi olmayan tip (non-wild type, mutasyonel veya kazanılmış dirençli izolatlar) izolatların ayırımında kullanılması önerilmektedir<sup>10</sup>. Bu çalışmada da kullandığımız sınır değerler, in vitro duyarlılık ile klinik yanıtın uyumunu göstermekte yol gösterici olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada, keratit etkeni olarak elde edilmiş 25 *Fusarium* izolatının tür düzeyinde tanımlanması, in vitro virülans özelliği olarak hemolitik aktivite, biyofilm yapabilme özelliği, kazeinaz, esteraz, proteinaz ve fosfolipaz varlığına bakılması, in vivo virülans modeli olarak *G.mellonella* larvalarında enfeksiyon oluşturulması, sağkalım takibi yapılması ve 25 klinik *Fusarium* izolatının amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazole duyarlılıklarının CLSI M38-A2 rehberinde önerilen mikrodilüsyon

yöntemi ile değerlendirilerek, *Fusarium* türlerinde direncin türe hatta izolata bağlı olarak değişebilmesi nedeniyle, in vitro olarak duyarlılığın saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### İzolatların Tür Düzeyinde Tanımlanması

Keratit etkeni olarak kornea kazıntı örneklerinden izole edilen küf kolonileri, koloni renkleri, yapısal özellikleri, üreme hızları ve makro-mikro konidya morfolojilerine göre *Fusarium* cinsi olarak tanımlandı. Tür tanımı morfolojik özelliklere göre yapılamadığından DNA dizi analizi temeline dayalı tür tanımlaması yapılması için, 25 izolata 13 tanesinin Sabouraud dekstroz agar (SDA) plağındaki kolonilerinden DNA izolasyonu yapıldı. Dizi analizi yapılamayan 12 izolat cins düzeyinde bırakıldı.

DNA izolasyonu için, koloni süspansiyonları önce proteinaz K içeren parçalama tamponu (Metis Biyoteknoloji, Ankara) içinde 3 saat 65°C'de bekletildi. Ardından elde edilen DNA'lar fenol-kloroform-izoamilalkol ile saflaştırıldı. DNA miktarı ve saflığı spektrofotometrik (Nanodrop, Thermo Scientific™) olarak ölçüldü. Mantarların 5.8S rRNA gen bölgelerini çoğaltan ITS 1 (F-5'-TCCGTAGGTGAACC-3') ve ITS 4 primerleri (R-5'-TCCTCCGCTTATTGATATGA-3') kullanılarak tek bölge çoğaltıldı. Elde edilen diziler "BLAST" arama motoru üzerinden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) daha önce tanımlanmış ve depolanmış olan ITS1-5.8S-ITS2 dizileri ile karşılaştırılarak dizi benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu koşullarda tanımlama sonucu olarak kabul edildi. Tek bölge dizilendiği için tür tanımı "tür kompleksi tanımı" olarak kabul edildi<sup>11</sup>.

### Virülans Faktörlerinin Gösterilmesi

Tür kompleksi düzeyinde tanımlanan 13 izolata hemolitik aktivite, kazeinaz, esteraz, proteinaz ve fosfolipaz özellikleri araştırıldı. Yirmi beş izolata tamamında biyofilm yapabilme özelliği araştırıldı. Hemolitik aktivite için, %5 koyun kanlı agar kullanıldı. Koloni etrafındaki hemoliz zonu değerlendirildi. Kazeinaz aktivitesi için, 225 ml distile su içinde 25 g süt tozu, 7.5 g agar bulunan kazeinaz besiyeri hazırlandı. Koloni oluşumundan itibaren etrafındaki şeffaf zonlar değerlendirildi. Esteraz oluşumu için, tween 80 agar hazırlandı. İçeriğinde 10 g pepton, 5 g NaCl, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, 15 g agar, 1000 ml distile su bulunan besiyerine, otoklavdan çıktıktan sonra 5 ml tween 80 eklendi. Esteraz oluşumu koloni etrafında kristalleşme, partikül oluşumu şeklinde değerlendirildi. Proteinaz aktivitesi için, 11.7 g "yeast carbon base", 0.1 g "yeast extract", 2 g siğir serum albumin 200 ml distile su içinde hazırlandı, süzülde ve içinde 16 g agar bulunan 800 ml distile su otoklavlandıktan sonra, karışım eklendi. Koloni etrafındaki şeffaf zon değerlendirildi. Fosfolipaz aktivitesini göstermek için, iki adet steril yumurta sarısı, 58.4 g NaCl, 5.5 g CaCl<sub>2</sub> karışımı, içinde 65 g SDA tozu içeren 980 ml distile su içerisine otoklavlandıktan sonra eklendi. Koloni etrafındaki bulanık zon oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edildi<sup>12,13</sup>. Biyofilm oluşturma özellikleri safranin kullanılan tüp adezyon yöntemiyle araştırıldı<sup>6</sup>. İn vitro virülans deneyleri üç kez tekrar edildi. Üç tekrarın sonunda aynı

olan sonuçlar kabul edildi. *Fusarium* cinsi içinde *solani* ve *oxysporum* tür kompleksindeki izolatların bulunduğu bağımsız iki grup, virülans özellikleri bakımından ki-kare testi (SPSS Statistics 20) kullanılarak karşılaştırıldı.

### **G.mellonella Virülans Modeli**

Larvalar 22 g buğday unu, 22 g buğday kepeği, 11 g süt tozu, 5.5 g ekmek mayası, 17.5 g balmumu, 11 ml gliserin ve 11 ml bal içeren sentetik besiyerinde üretildi. *Fusarium* izolatlarından hazırlanan süspansiyonlar, serum fizyolojik (SF) içinde  $5 \times 10^8$  hücre içerecek şekilde, her larvaya sol bacak önünden Hamilton enjektörü ile 10 µl enjekte edildi. Her izolat için 10 larva enfekte edildi. Larvalar 30°C'de 10 gün bekletildi ve her gün canlı larva sayısı kayıt edildi. Kontrol grubu olarak girişim yapılmamış bir grup, 10 µl SF verilen bir grup ve enjektörün batırılıp çıkarıldığı bir grup kullanıldı. Canlı kalan larva sayıları esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri elde edildi<sup>14,15</sup>. Larva deneyleri iki kez tekrar edildi. Canlı kalan larva sayısı en çok bir larva farklı ise benzer kabul edilip, ikinci deneyin sonucu olan sayı kayıt edildi.

### **Antifungal Duyarlılık Testleri**

İzolatların amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol duyarlılıkları CLSI M38-A2 mikrodilüsyon yöntemiyle Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikoloji Referans Laboratuvarında çalışıldı, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 ve *Aspergillus terreus* ATCC MYA-3633 referans kalite kontrol suşları olarak kullanıldı. Potensi bilinen saf antifungal ilaç tozlarının (vorikonazol, Pfizer; itrakonazol ve posakonazol, Merck-Sharp-Dohme, Almanya), seri çift kat dilüsyonlarını içeren (posakonazol, vorikonazol ve itrakonazol: 0.015-32 µg/ml; Amfoterisin B 0.06-32 µg/ml) mikropaklar hazırlandı. Test edilecek inokülumun yoğunluğu spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda 0.15-0.17 aralığında ayarlandıktan sonra, hazırlanan plaklara son inokülum konsantrasyonu  $0.4-5 \times 10^4$  cfu/ml olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. Mikropaklar, 35°C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında, çıplak gözle değerlendirilerek MİK değerleri saptandı. Amfoterisin B ve azoller için üremenin kontrole göre %100 inhibe olduğu ilk kuyucuk MİK değeri (µg/ml) değeri olarak belirlendi. Vahşi tip [WT (WT; MIC ≤ ECV) ] *Fusarium* tür kompleksi izolatlarını, vahşi olmayan tip (non-WT; MIC > ECV) izolatlardan ayırmak amacıyla itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol için ECV değerleri, sırasıyla, *F.oxysporum* tür kompleksi (32 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml) ve *F.solani* tür kompleksi üç azol için de 32 µg/ml olarak ve amfoterisin B ECV değeri her iki tür kompleksi için de; 8 µg/ml olarak kabul edildi<sup>10</sup>.

## **BULGULAR**

Tür kompleksi düzeyinde tanımlanan 13 klinik izolat altı *F.oxysporum*, altı *F.solani* tür kompleksi ve bir *F.brachygibbosum* türü (*F.sambucinum* tür kompleksi altında) olarak isimlendirilmiştir. Keratit etkeni olan ancak, dizi analizi yapılamayan 12 izolat *Fusarium* cinsi olarak tanımlanmıştır.

Virülans özellikleri test edilen 13 izolat içerisinde bir *F.solani*, bir *F.oxysporum* izolatının alfa hemoliz yapma özelliği olduğu belirlenmiştir. İzolatların tamamı kazeinaz pozitif bulunmuştur. Üç *F.oxysporum* ile iki *F.solani* izolatında esteraz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Tek bir *F.solani* izolatında proteinaz varlığı pozitif bulunmuştur. Dört *F.oxysporum* ve üç *F.solani* izolatında fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Biyofilm oluşturma özellikleri test edilen 25 izolatın, tür kompleksi tanımlaması yapılan 13'ünün arasında, üç *F.oxysporum* ve iki *F.solani* izolatında pozitiflik gösterilmiştir. Toplam 25 *Fusarium* izolatının iki tanesinde 1+, on tanesinde 2+, bir tanesinde 4+ olmak üzere, toplam 13 (%52) izolatta biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

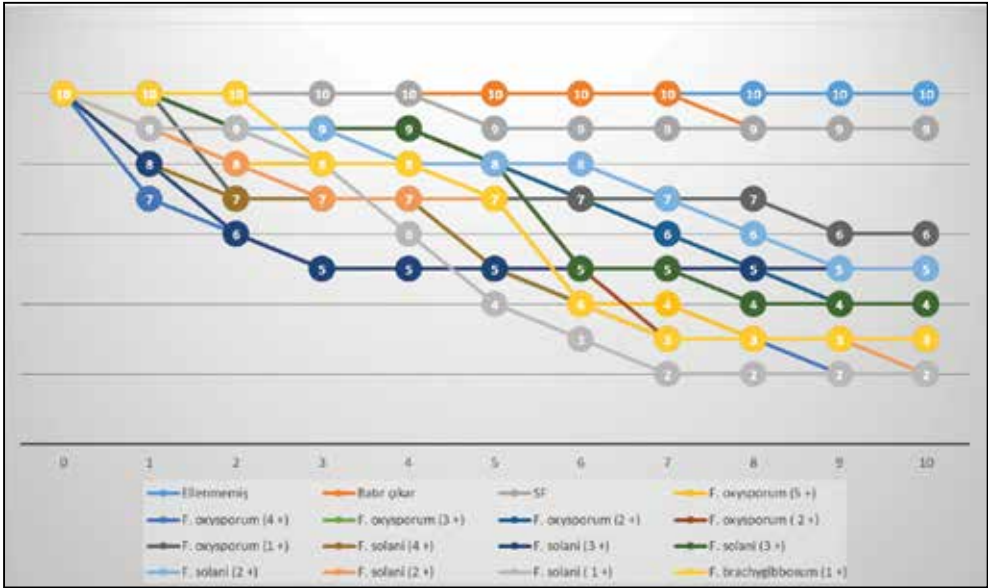
Test edilen altı virülans özelliği tür kompleksi düzeyinde analiz edildiğinde; altı *F.oxysporum* izolatının bir tanesinde altı virülans faktöründen beşi, bir tanesinde altı virülans faktöründen dördü, bir tanesinde altı virülans faktöründen üçü, iki tanesinde altı virülans faktöründen ikisi, birinde de altı virülans faktöründen biri pozitif bulunmuştur. *F.solani* tür kompleksi için aynı şekilde değerlendirme yapıldığında, altı *F.solani* izolatının birinde altı virülans faktöründen dördü pozitif, ikisinde altı virülans faktöründen üçü pozitif bulunmuştur. İki izolatta iki virülans faktörü, bir izolatta da bir virülans faktörü pozitif bulunmuştur. Virülans özellikleri bakımından *F.solani* ve *F.oxysporum* grupları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Tür kompleksi düzeyinde tanımlanan 13 izolatın virülans özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Tür Kompleksi Düzeyinde Tanımlanan 13 İzolatın Virülans Özellikleri

	SAP	Kazeinaz	Esteraz	Fosfolipaz	Biyofilm	Hemoliz
<i>F.oxysporum</i>	-	+	+	-	-	-
<i>F.oxysporum</i>	-	+	-	+	1+	-
<i>F.oxysporum</i>	-	+	-	+	-	-
<i>F.oxysporum</i>	-	+	+	+	2+	-
<i>F.oxysporum</i>	-	+	+	+	2+	Alfa
<i>F.oxysporum</i>	-	+	-	-	-	-
<i>F.solani</i>	+	+	-	+	-	-
<i>F.solani</i>	-	+	-	+	1+	-
<i>F.solani</i>	-	+	+	+	-	Alfa
<i>F.solani</i>	-	+	+	-	-	-
<i>F.solani</i>	-	+	-	-	2+	-
<i>F.solani</i>	-	+	-	-	-	-
<i>F.brachygibbosum</i>	-	+	-	-	-	-

*Fusarium* izolatları ile enfekte edilen 10 *G.mellonella* larvası için elde edilen sağkalım durumu Şekil 1'de gösterilmiştir. Girişim yapılmamış kontrol grubunda larva kaybı olmamış, SF verilen kontrol grubunda bir larva kaybedilmiş, enjektörün batırılıp çıkarıldığı kontrol grubunda bir larva kaybedilmiştir. Elde edilen Kaplan-Meier grafiklerinde de görüldüğü gibi, ölümlerin hemen başlamadığı, beşinci günde larva sayısında belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Yedinci günden itibaren grupların çoğunda larvaların %50'si kaybedilmiştir. En hızlı ölüme neden olan *F.solani* izolatında pozitif bulunan tek virülans faktörünün salgısal aspartil proteinaz (SAP) olduğu saptanmıştır. *Fusarium* izolatlarının larva öldürme hızlarının düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

*F.oxysporum* tür kompleksi için ECV değerleri itrakonazol 32 µg/ml, posakonazol 8 µg/ml ve vorikonazol 16 µg/ml, *F.solani* tür kompleksi için üç azol için de 32 µg/ml, amfoterisin B ECV değeri her iki tür kompleksi için de; 8 µg/ml olarak kabul edildiğinde<sup>10</sup> *F.solani* ve *F.oxysporum* izolatlarının tümü dört antifungal için de vahşi tip (wild type) olarak değerlendirilmiştir (Tablo II).



Şekil 1. Günlere göre canlı kalan larva sayıları.

\* Her izolatın yanında belirtilen pozitiflik değerleri, virülans faktörlerini temsil etmektedir. 5+ olan izolatta beş farklı virülans faktörü saptanmıştır.

**Tablo II.** Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile 48 Saatlik İnkübasyon Sonrası Keratit Etkeni *Fusarium* Türlerinin Seçilmiş Triazol Antifungaller ve Amfoterisin B İçin Epidemiyolojik Eşik Değerleri (ECV) ve MİK Aralıkları

<i>Fusarium</i> tür kompleksi	Antifungal ilaçlar	ECV (µg/ml)		MİK aralığı (µg/ml)
		WT	Non-WT	
<i>F.oxysporum</i> (n= 6)	Amfoterisin B	≤ 8	> 8	0.5-8
	İtrakonazol	≤ 32	> 32	2-16
	Posakonazol	≤ 8	> 8	0.5-8
	Vorikonazol	≤ 16	> 32	0.5-1
<i>F.solani</i> (n= 6)	Amfoterisin B	≤ 8	> 8	2-8
	İtrakonazol	≤ 32	> 32	16-32
	Posakonazol	≤ 32	> 32	1-16
	Vorikonazol	≤ 32	> 32	1-8
<i>F.brachyglabosum</i> (n= 1)	Amfoterisin B	UM	UM	4
	İtrakonazol	UM	UM	8
	Posakonazol	UM	UM	0.5
	Vorikonazol	UM	UM	0.5

ECV: Epidemiyolojik eşik değerleri, WT: Vahşi tip, Non-WT: Vahşi olmayan tip, UM: Uygulanamaz.

## TARTIŞMA

Keratit oluşumunda patojenez basamakları etken mantarın virülansı ile doğrudan ilişkilidir. Biyofilm oluşturan, dokuyu parçalayan enzimler üreten mantarların kornea dokusunda yerleşmesi daha kolaydır<sup>16-18</sup>. *Fusarium* keratit olgularında en sık karşılaşılan etkenlerden biridir. Bu sıklığın nedeni biyofilm oluşturma ve enzim üretme gibi virülans özelliklerine bağlı olabilir. Keratit etkenleri arasında *Fusarium* cinsinin önemini artıran bir başka faktör, mantarın antifungal direncine sahip olmasıdır. Antifungal direnç *Fusarium* türlerine bağlı olarak farklı özellikler göstermektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada *Fusarium*'a bağlı keratitlerde, çoklu ilaca dirençli olgular incelenerek, ileri moleküler tanımlama yapılmış ve izolatların *F.solani* tür kompleksi içinde yer alan *F.keratoplasticum* türü olduğu belirlenmiştir<sup>19</sup>. Bu durum fenotipik yöntemlerle *F.solani* olarak tanımlanan *Fusarium* izolatlarında, özellikle dirençli olgularda, ayrıntılı tür tanımlaması yapılması gerektiğini göstermektedir. *Fusarium* cinsi küflerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için, en az üç olmak koşuluyla ortalama beş ile yedi arasında, değişmemiş gen bölgesinin çoğaltıldığı "Multi Locus Sequence Typing (MLST)" yönteminin kullanılması gerekmektedir<sup>20,21,22</sup>. Fenotipik özelliklere bakılarak tür düzeyinde tanımlama yapılması mümkün olmamaktadır. Tek gen bölgesinin çoğaltılarak dizilenmesi sonucunda elde edilecek dizi



benzerliğinin, yalnız tür kompleksi düzeyinde adlandırma için kullanılabilirliği bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, sahip olduğumuz imkanlar çerçevesinde, tek gen bölgesi dizilerek tür kompleksi düzeyinde tanımlama yapılmıştır. İzolatların virülans özellikleri ve antifungal duyarlılık sonuçları bu tanımlamaya göre değerlendirilmiştir.

Mantarların temel virülans faktörleri olan enzimler arasında yer alan proteinaz ve fosfolipazın önemi uzun yıllardır bilinmektedir. Esteraz, kazeinaz gibi sekonder öneme sahip enzimler de son yıllarda araştırılmaktadır. Hemolitik aktivite ise dokunun parçalanmasında önemli olarak kabul edilen bir özelliktir. Biyofilm üretimi özellikle keratit patogeneğinde önemli bir virülans faktörüdür<sup>23,24</sup>. *Fusarium* cinsi küflerin biyofilm oluşturması özellikle kontakt lens kullanımına bağlı gelişen keratit olgularında, hazırlayıcı faktör olarak kabul edilmektedir<sup>7</sup>. Çalışmamızda proteinaz, fosfolipaz, esteraz ve kazeinaz aktivitelerinin yanı sıra hemoliz ve biyofilm oluşturma özelliği de araştırılmıştır. Keratit etkeni olarak izole edilen ve tür kompleksi düzeyinde tanımlanan 13 izolattan altısı *F.solani* tür kompleksi, altısı *F.oxysporum* tür kompleksi ve biri *F.brachygybbosum* türü (*F.sambucinum* tür kompleksi altında) olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların virülans özellikleri değerlendirildiğinde tamamının kazeinaz pozitif olduğu, dört *F.oxysporum* ve üç *F.solani* olmak üzere yedi izolatın (toplam izolatların %53'ü, 7/13) fosfolipaz pozitif olduğu, üç *F.oxysporum* ve iki *F.solani* tür kompleksi izolatının esteraz pozitif olduğu, sadece bir *F.solani* tür kompleksi izolatında proteinaz pozitifliği olduğu tespit edilmiştir. *F.solani* veya *F.oxysporum* tür kompleksi olarak ayrılan izolatlar arasında virülans özellikleri bakımından istatistiksel fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Sav ve arkadaşlarının<sup>6</sup> 2016 yılında yaptıkları benzer bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, göz örneklerinden elde edilen ve Mantar Biyoçeşitlilik Merkezinin (CBS-KNAW, Utrecht, Hollanda) koleksiyonunda yer alan 12 *Fusarium* referans suşu incelenmiştir. Bu suşların proteinaz aktivitesi %42 (5/12), fosfolipaz aktivitesi %100 (12/12), biyofilm oluşturma özelliği ise %25 (3/12) oranında pozitif bulunmuştur.

*Fusarium*'un biyofilm oluşturma özelliğinin keratit patogenezindeki yeri bilinmektedir<sup>7</sup>. Bu nedenle çalışmamızda özellikle keratit etkeni *Fusarium* izolatlarında in vitro olarak biyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada kullandığımız izolatların biyofilm oluşturma sıklığı %52 olarak bulunmuştur (13/25). Sonuçlarımız, in vitro olarak kanıtlanan bir özelliğin gerçek hastalık patogenezi sırasında aynı güçte etki göstermeyebileceğinin bilinmesi, bununla birlikte in vitro ve in vivo çalışma sonuçlarının uyumunun bütün deneysel modeller için geçerli olduğunun kabul edilmesi çerçevesinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda *Fusarium* virülansının in vivo koşullarda değerlendirilmesinde, günlere göre canlı kalan larva sayısı kullanılmıştır. Bu sayılar esas alınarak Kaplan-Meier grafikleri oluşturulmuştur. Her bir izolat için 10 adet larva kullanılmıştır. Her izolatın virülans özellikleri dikkate alınarak yapılan değerlendirme sonrasında virülans ile öldürme gücü arasında bir ilişki saptanamamıştır. Test edilen altı virülans faktörünün beşine sahip bir *F.oxysporum* izolatı ile belirgin larva azalması altıncı günde gözlenirken, tek virülans özelliğine sahip

*F.solani* izolatının altıncı günde larva sayısının 10'dan üçe, yedinci günde ikiye düştüğü tespit edilmiştir. Larva modelinde mortalitesi en yüksek olan izolatın, tek bir virülans faktörüne sahip bu izolat olduğu saptanmıştır. Virülansı yüksek izolatlar beklediği üzere yüksek mortaliteye sebep olmamıştır.

Bu çalışmadaki larva modelini (*G.mellonella*) kullanan Navarro-Valesco ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>5</sup>, *F.oxysporum* ile enfekte edilen ve 30°C'de takip edilen larvalarda üçüncü günden itibaren belirgin mortalite artışı görülmüştür. Sıcaklık 37°C olarak değiştirildiğinde, çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, ölüm hızının azaldığı ve ilk ölümlerin yedinci günde başladığı görülmüştür. Çalışmamızda da larvalar 37°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Çalışma sonuçlarımızın söz konusu çalışmayla benzer olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, *Fusarium* türlerinde direncin türe hatta izolata bağlı olarak değişebilmesi nedeniyle, in vitro olarak duyarlılığın referans mikrodilüsyon yöntemiyle saptanması amaçlanmıştır. Direnç yorumlanmasında, Espinel-Ingroff ve arkadaşlarının<sup>10</sup> 2016 yılında belirlemiş oldukları önerilere göre türe özgü ECV sınır değerleri kullanılmıştır. Bu ECV değerlerine göre, *F.solani* ve *F.oxysporum* izolatlarının tümünün dört antifungal ilaç açısından vahşi tip olduğu tespit edilmiştir. *F.brachygibbosum* nadir bir tür olduğundan yapılan çalışmalarda ECV değeri saptanamamıştır. Çalışmamızda, bu izolatla ilgili düşük MİK değerleri belirlenmiştir. Sav ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>6</sup> ECV değerleri kullanılmamış, *Fusarium* izolatlarının vorikonazol MİK değerleri 8 µg/ml ve altında, amfoterisin B MİK değerleri 2 µg/ml ve altında bulunmuştur. Başka bir çalışmada, *Fusarium* izolatlarında (n=125) vorikonazol için MİK<sub>50</sub> değeri 8 µg/ml, MİK<sub>90</sub> değeri 16 µg/ml olarak saptanmıştır<sup>25</sup>. Espinel-Ingroff'un önerdiği ve çalışmamızda kullanılan ECV değerleri ile bu çalışmanın MİK<sub>90</sub> değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Taj-Aldeen ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>26</sup> toplam 51 *Fusarium* izolatında amfoterisin B, vorikonazol, posakonazol ve itrakonazol duyarlılığı incelenmiş ve izolatların tamamı duyarlı bulunmuştur. Söz konusu çalışmada, *Fusarium* izolatlarında antifungal duyarlılık sonuçlarının türe hatta izolata özgü değişiklikler gösterebileceği vurgulanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Fusarium*'un etken olduğu fungemi ve keratit olguları bildirilmiştir<sup>27,28</sup>. Birden fazla cins mantarı kapsayan ve *Fusarium* izolatlarının duyarlılık ve virülans özelliklerini değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır<sup>6,29</sup>. Ülkemizde gerçekleştirilen en kapsamlı fusaryoz çalışmasında Dalyan Cilo ve arkadaşları<sup>30</sup> 47 *Fusarium* izolatında MLST sonucuna dayalı tür kompleksi düzeyinde tanımlama ve antifungal duyarlılık değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışmamızda *F.solani* tür kompleksine ait yedi izolatta amfoterisin B için MİK aralığı 0.25-2 µg/ml, vorikonazol için 2-8 µg/ml bulunmuştur. *F.solani* tür kompleksine ait izolatlarda posakonazol MİK değerlerinin tamamı > 16 µg/ml, itrakonazol MİK değerleri > 64 µg/ml olarak bulunmuştur. Dalyan Cilo ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>30</sup>, saptanan *F.oxysporum* izolatında amfoterisin B için 0.5 µg/ml, vorikonazol için 2 µg/ml, posakonazol için 16 µg/ml ve itrakonazol için > 64 µg/ml MİK değerleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ECV değerleri hesaplanmamış olup belirlenen MİK aralıklarının çalışmamız ile benzer olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Çalışma kapsamında 25 keratit etkeni *Fusarium* bulunmasına rağmen, bunlardan 13 tanesinde dizi analizi ile tanımlama yapılabilmektedir. Bu nedenle izolat sayısının virülans çalışması için yetersiz olduğu söylenebilir. Her tür kompleksi grubunda yer alan altı izolat bulunmaktadır. Bu sayının minimum değeri olduğu düşünülerek, değerlendirme bu sayı üzerinden yapılmıştır. Yukarıda belirtildiği üzere, *Fusarium* cinsi için tür tanımlaması MLST analizi ile mümkün olmaktadır. Çalışmamızda tek gen bölgesinin dizilenecek tür kompleksi düzeyinde tanımlama yapılmış olması eleştirilebilir. Virülans özellikleri ve antifungal sonuçların tür kompleksi düzeyinde değerlendirilmiş olması çalışmanın en önemli kısıtlayıcı bölümüdür. MLST analizinin yüksek maliyeti ve rutin şartlarında yapılmasının güçlüğü nedeniyle tek gen bölgesi dizilenmiştir. Bir diğer kısıtlılık, *G.mellonella* modelinin insan enfeksiyonu ile eşdeğer olup olmadığıdır. Yapılan bir analizde, *Fusarium* enfeksiyonları için *G.mellonella* larva modelleri kullanılması, fare modeli ile eş değer sonuçlar verdiği bildirilmiştir<sup>31,32</sup>.

Bu çalışma, keratit etkeni olarak izole edilen *Fusarium* izolatlarında virülans özelliklerinin ve antifungal duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmadır. Elde edilen sonuçlar izolatların in vitro koşullarda keratit tedavisinde kullanılan antifungallere duyarlı olduğunu ve bazı virülans özelliklerine sahip olduklarını göstermiştir.

## KAYNAKLAR

1. Al-Hatmi AM, Meis JF, de Hoog GS. *Fusarium*: Molecular diversity and intrinsic drug resistance. PLoS Pathog 2016; 12 (4): e1005464.
2. Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. Virulence 2011; 2(2): 91-6.
3. Thomas PA, Kalliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. Clin Microbiol Infect 2013; 19(3): 210-20.
4. Kredics L, Narendran V, Shobana CS, Vágvölgyi C, Manikandan P, Indo-Hungarian Fungal Keratitis Working Group. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. Mycoses 2015; 58(4): 243-60.
5. Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet Biol 2011; 48(12): 1124-9.
6. Sav H, Ozdemir HG, Altınbaş R, Kiraz N, İlkit M, Seyedmousavi S. Virulence attributes and antifungal susceptibility profile of opportunistic fungi isolated from ophthalmic infections. Mycopathologia 2016; 181(9-10): 653-61.
7. Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E, Ghannoum MA. Characterization of *Fusarium* keratitis outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53(8): 4450-7
8. Zhang X, Sun X, Wang Z, Zhang Y, Hou W. Keratitis-associated fungi form biofilms with reduced antifungal drug susceptibility. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53(12): 7774-8.
9. Al-Hatmi AM, Normand AC, Ranque S, et al. Comparative evaluation of Etest, EUCAST, and CLSI methods for amphotericin B, voriconazole, and posaconazole against clinically relevant *Fusarium* species. Antimicrob Agents Chemother 2016; 61(1): e01671-16.
10. Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S, et al. International evaluation of MIC distributions and Epidemiological Cutoff Value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother 2015; 60(2): 1079-84.

11. Gajjar DU, Pal AK, Ghodadra BK, Vasavada AR. Microscopic evaluation, molecular identification, antifungal susceptibility, and clinical outcomes in *Fusarium*, *Aspergillus* and dematiaceous keratitis. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 605308.
12. Atalay MA, Koc An, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. *Niger J Clin Pract* 2015; 18(1): 52-5.
13. Yagmur G, Sav H, Ziyade N, et al. Evaluation of virulence factors and antifungal susceptibility in yeast isolates from postmortem specimens. *J Forensic Sci* 2016; 61(4): 1000-6.
14. Aliyeva Z, Erdem H, Karakuş AK, Kalkancı A. Klinik örneklerden ve havadan izole edilen küf mantarlarının in vitro virülans faktörlerinin ve *Galleria mellonella* larva ölüm hızlarının karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2017; 47(2): 67-77.
15. Oechsler RA, Feilmeier MR, Miller D, Shi W, Hofling-Lima AL, Alfonso EC. *Fusarium* keratitis: genotyping, in vitro susceptibility and clinical outcomes. *Cornea* 2013; 32(5): 667-73.
16. Shobana CS, Mythili A, Homa M, et al. In vitro susceptibility of filamentous fungi from mycotic keratitis to azole drugs. *J Mycol Med* 2015; 25(1): 44-9.
17. Wu J, Zhang WS, Zhao J, Zhou HY. Review of clinical and basic approaches of fungal keratitis. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(11): 1676-83.
18. Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microb Pathog* 2017; 104: 97-109.
19. Prajna VN, Prajna L, Muthiah S. Fungal keratitis: The Aravind experience. *Indian J Ophthalmol* 2017; 65(10): 912-9.
20. Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech* 2017; 7(1): 28.
21. Tupaki-Sreepurna A, Al-Hatmi AM, Kindo AJ, Sundaram M, de Hoog GS. Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: A clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. *Mycoses* 2017; 60(4): 230-3.
22. Alanio A, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S. Investigating clinical issues by genotyping of medically important fungi: Why and How? *Clin Microbiol Rev* 2017; 30(3): 671-707.
23. van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TA, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* infections: approaches to identification by the clinical mycology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep* 2015; 9(3): 135-43.
24. Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol* 2016; 32: 89-95.
25. Lalitha P, Sun CQ, Prajna NV, et al. In vitro susceptibility of filamentous fungal isolates from a corneal ulcer clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2014; 157(2): 318-26.
26. Taj-Aldeen SJ, Salah H, Al-Hatmi AM, et al. In vitro resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; 85(4): 438-43.
27. Yücesoy M, Ergon MC, Ören H, Gülay Z. Olgu raporu: Bir *Fusarium* fungemisi. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(3): 265-71.
28. Berkem R, Türkoğlu G, Yılmaz SE, Burcu A, Kalkancı A. *Fusarium solani*'nin etken olduğu fungal keratit olgusu. *FLORA* 2016; 21(1): 33-7.
29. Direkel Ş, Otağ F, Aslan G, Ülger M, Emektaş G. Klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların iki farklı yöntemle tanımlanması ve duyarlılık sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(1): 65-78.
30. Dalyan Cilo B, Al-Hatmi AM, Seyedmousavi S, et al. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(8): 1683-91.
31. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al. Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(3): 366-76.
32. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol* 2011; 115(12): 1279-89.