



Fungal Mikrobiyom; Mikobiyom

Fungal Microbiome; Mycobiome

  Sema Aşkın Keçeli¹,  Mustafa Altındış²

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Kocaeli

² Sakarya Üniversitesi Tıp Fak Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Sakarya

ORCID ID: Sema Aşkın Keçeli <https://orcid.org/0000-0002-2014-6395>, Mustafa Altındış <https://orcid.org/0000-0003-0411-9669>

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Prof. Dr. Sema Aşkın Keçeli, e-posta / e-mail: sema.keceli@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 18-04-2021

Kabul Tarihi / Accepted: 24-04-2021

Yayın Tarihi / Online Published: 30-04-2021

Keçeli S.A., Altındış M. Fungal mikrobiyom; Mikobiyom, J Biotechnol and Strategic Health Res. 2021;5(1):22-32

Öz

Bakteriyel mikrobiyom analiz ve araştırmaları, mantar mikrobiyomu kavramı ve çalışmalarının önüne geçmiştir. Tüm insanlar ve laboratuvar hayvanları, sağlıklı olduklarında doğal mantar topluluklarını taşırlar. Mantar mikrobiyomu, bakteriyel mikrobiyomdan önemli ölçüde daha küçüktür. Hastalıkta kofaktör olarak mantar mikrobiyomunun rolü de belirgindir ancak bunca zamanda hafife alınmıştır. Sağlıklı bir derinin fungal mikrobiyomunda yer alan başlıca türler *Malassezia* ve *Candida* türleridir. Sağlıklı deride daha fazla maya formu görülürken, etkilenen bölgelerde daha çok hifal formda görülmektedir. Ağız mikrobiyomunun fungi içerdiği kabaca *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Cryptococcus sp* den oluşmaktadır. Sağlıklı akciğerlerin steril olduğu savı da son yıllarda yapılan sekans çalışmaları ile değişmiş, fungal topluluklardan *Aspergillus fumigatus* başta olmak üzere *Ceriporia lacerata*, *Saccharomyces cereviceae* ve *Penicillium brevicompactum*'un bulunduğunu gösterilmiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında belirgin fungal mikrobiyal disbiyoz bulunmuş, *Basidiomycota / Ascomycota* oranı ve *C. albicans*'ın arttığı, *Saccharomyces cerevisiae* oranının ise azalmış olduğu belirlenmiştir. Sonuçta; Bu tür karmaşık ve birbirine bağlı mikrobiyal sistemlerde, mikrobiyom, bir dizi hastalığa ve bunların patogeneze katkıda bulunan bir faktör olabilir. İleri çalışmalar kısa sürede bu tür konulara açılım getirecektir.

Anahtar Kelimeler Fungal mikrobiyom, mikobiyom, mantar, mikrobiyota

Öz

Fungal microbiome concept and studies are dominated by bacterial microbiome analysis and researches. All humans and laboratory animals carry natural fungal communities when they are healthy. The fungal microbiome is significantly smaller than the bacterial microbiome. The role of the fungal microbiome as a cofactor in disease is also apparent, but has been underestimated in this time. The main species in the fungal microbiome of a healthy skin are *Malassezia* and *Candida* species. While more yeast forms are seen in healthy skin, it is mostly seen in hyphae form in the affected areas. The oral microbiome consists roughly of *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Cryptococcus sp*. The argument that healthy lungs are sterile has also changed with the sequence studies carried out in recent years, and it has been shown that there are fungal communities such as *Aspergillus fumigatus*, *Ceriporia lacerata*, *Saccharomyces cereviceae* and *Penicillium brevicompactum*. It was found that significant fungal microbial dysbiosis was found in inflammatory bowel diseases, *Basidiomycota / Ascomycota* ratio and *C. albicans* increased, and *Saccharomyces cerevisiae* ratio decreased. After all; In such complex and interconnected microbial systems, the mycobiome can be a contributing factor to a number of diseases and their pathogenesis. Further studies will open up such issues in a short time.

Keywords Fungal microbiome, mycobiome, fungus, microbiota.

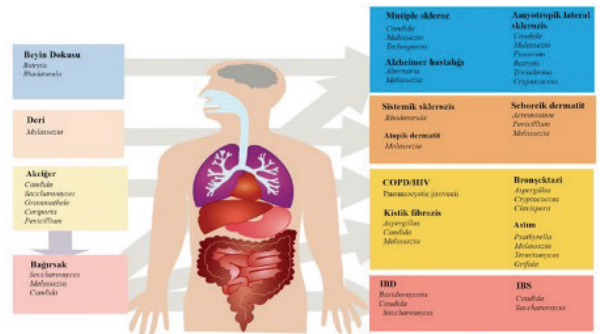
GİRİŞ

Mikrobiyom terimi, mikrobiyomun mantar bileşenini tanımlamak için kullanılır. Bakteriye benzer bir çekirdek mikrobiyomun insanlarda var olup olmadığı henüz belirsizdir. Bakterioma göre ([toplam mikrobiyotanın %99'u), insan mikrobiyomu daha az çeşitlidir (genellikle numune başına \ 20 operational taksanomik ünit (OTU) ve daha düşük bir bollukta (toplam mikrobiyotanın %0,1'den azı) bulunur. Mikrobiyom çalışmaları, bakteriyel mikrobiyom araştırmalarının gölgesinde kalan ancak yeni ve hızla üzerine odaklanılan bir alan olmuştur. Her insanda genel mikrobiyotanın bir parçası olarak mantarlar vardır, tabii ki toplam mantar hücre sayısı, bakteriyel mikrobiyota kümülasyonundan oldukça küçüktür. Bununla birlikte, fungal mikrobiyomun insanların sağlıkları üzerine etkisi; özellikle konağın immün yetmezlik gibi tehlikeye girmesi hallerinde patojen mikroorganizmaların çoğalmasına rezervuar olması, enflamatuvar hastalıklar ve metabolik bozukluklarda potansiyel bir kofaktör gibi davranması önemlidir.

Sekanslama yaklaşımları, bebeklerin doğumdan kısa bir süre sonra ağırlıklı olarak *Candida*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* ve *Malassezia* cinslerinin üyeleri tarafından kolonize edildiğini ortaya koymaktadır. Sağlıklı yetişkinlerden alınan dışkı mikrobiyomları *Saccharomyces*, *Malassezia* ve *Candida*'nın baskın ve bu cinslerin yaşam boyunca sağlıklı bir mikrobiyomun temel bileşenleri olduğunu öne sürer. Bununla birlikte, insan bakteriyom çalışmalarının aksine, sağlıklı bireylerde mikrobiyom ile konakçı fenotip metadataları arasında çok az bir korelasyon kurulmuştur ve bu nedenle, mantar mikrobiyomu-konak etkileşimi hakkındaki bilgilerimiz mantar kolonizasyonu ve/veya hastalıklarla sınırlı kalmaktadır. Mevcut çalışmalardaki moleküler analiz sonuçlarına göre, karmaşık immünolojik sistemlerin mantar homeoostazını düzenlemek için evrimleştiği ve bozulduğunda enfeksiyona veya diğer patolojilere yol açtığı açıktır¹.

Mantarlara karşı bağışıklık, hem sporları hem de mantar

hücre duvarı bileşenlerini tanıyan doğuştan gelen sinyal yollarıyla desteklenir, mantarlara toleransı ve uygun bağışıklık denetimini düzenleyen uyarlanabilir T hücre yanıtları içerir. Belki de korunmuş bir insan mikrobiyomunun en güçlü kanıtı, aslında insan vücudunda yaşayan sınırlı sayıda mantar etkenidir. Tanımlanmış 50'den fazla bakteri filumuna rağmen, insan bakteriyomu dört ile karakterize edilir: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*. Sonuç olarak, mantar taksonları, çevresel olarak görülene kıyasla in vivo daha düşük çeşitlilik sergiler ve mantarlar ile spesifik vücut bölgeleri arasındaki ilişkiler, seçici adaptasyonun muhtemel varlığını gösterir. Mevcut sınırlı veriler göz önüne alındığında, klinik mikrobiyom çalışmalarının resmi meta-analizini yapmak önemli olmakla birlikte şu anda yapmak zordur. Bununla birlikte, insanlarda kültürden bağımsız mikrobiyom çalışmalarına dayanan hastalık etken ilişkisi Şekil 1'de özetlenmiştir¹.



Şekil 1. Sağlık ve hastalıkta mikrobiyoma genel bakış (kaynak 1'den uyarlanmıştır).

COPD: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı; HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü; IBD: İnflamatuvar bağırsak hastalığı; IBS: Irritabl bağırsak sendromu;

Derinin Fungal Mikrobiyomu

Derimiz dış patojenlere karşı bariyer görevi görmektedir, bununla birlikte komensal funjiyi de barındırmaktadır. Farklı deri bileşenleri farklı fungal türleri gösterir ve fungal türler yaşa ve cinse bağlı olarak değişir. Sağlıklı bir derinin fungal mikrobiyomunda yer alan başlıca türler *Malassezia* ve *Candida* türleridir. *C. albicans*'ın hastanede çalışan sağlık personelinin derisinde taşınma oranı %50-

65 arasındadır. Buna bağlı olarak, sağlık çalışanlarından kaynaklanan *Candida* salgınları bildirilmiştir^{2,3}.

Preterm ve term yenidoğanlarda yapılan panfungal ITS2 bölgelerinin sekans sonuçlarına göre fungal mikrobiyom sıklık sırasına göre *Malassezia*, *Candida*, *Cladosporium*, *Fusarium* ve *Cryptococcus* olarak belirlenmiş, en sık iki tür ise *M. restricta* ve *C. albicans* olarak bulunmuştur.⁴ Vajinal doğumun derideki *Candida* kolonizasyonunu sezeryan doğumlara göre daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir.⁴ Çocuklarda *M. globosa* sık ve *M. sympodialis* in ise hiç rastlanmadığı; buna rağmen erişkinlerde *M. globosa*'ya kıyasla *M. sympodialis*'in daha sık olduğu bildirilmiştir.⁵ Erişkinlerde patern recognition reseptörler (PRRs)deki tek nukleotid polimorfizmi (SNPs)'nin *Aspergillus* ve *Candida* enfeksiyonlarına karşı duyarlılığın artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Deney farelerinde hatalı toll like reseptör (TLR4) bulunmasının da *Candida* enfeksiyonlarına duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir.⁶ *Malassezia*'nın deride bulunmasının *Malassezia*'nın NOD1 ve NOD benzeri reseptör protein 3(NLRP3) inflamazomlarını aktive ettiği ve bu kazanılmış bağışıklık geninin *Malassezia* varlığını kontrol ettiği gösterilmiştir.⁷ NOD 1 defektif farelerin azalmış *Aspergillus* üremesi gösterdikleri ve bu nedenle de NOD1 in *Aspergillus* enfeksiyonlarına karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür.⁸ Oh ve ark.⁹ hiperimmunglobulin E sendromu(HIES)olan hastalarda sağlam deride bile azalmış *Malassezia*, fakat artmış *Aspergillus* ve *Candida* kolonizasyonu gözlemlenmişlerdir. Bu durum, HIES hastalarında mukokütanöz kandidiyaz, pulmoner aspergilloz ve *Scedosporium* enfeksiyonlarının klinik bulgularının görülme nedenini açıklamaktadır.

Malassezia üremesi için uzun zincirli yağ asitlerine gereksinimi olan, lipofilik bir mayadır. Bu nedenle derinin sebundan zengin baş, yüz veya boyun bölgelerinde kolonize olurlar. Erişkinlere göre daha az yağlı bez aktivitesi bulunan çocuklarda *Malassezia*'ya ek olarak fungal topluluk daha geniştir; *Aspergillus*, *Epicoecum* ve *Phoma*'yı içermektedir. Deride *Malassezia* bulunmasının sağlıklı

bireyler için faydalı bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir, fakat *Malassezia*'nın aryl hidrokarbon reseptör ligandı ürettiği ve bunun da epitel hücrelerinin ultraviyole radyasyonundan koruduğu rapor edilmiştir.¹⁰

Ancak *Malassezia* türlerinin de atopik dermatit (AD) gelişiminde uyarıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir. AD hastalarının serumlarında *Malassezia*'ya spesifik IgE tipi antikorların bulunmuş ve antifungal tedavi ile AD semptomlarının gerilediği, aynı zamanda da *Malassezia* kolonizasyon derecesinin azaldığı gözlemlenmiştir.^{11,12} Sağlıklı veya hasta insan derisinden izole edilen *Malassezia* cinsi içerisinde 14 tür tanımlanmıştır. Moleküler çalışmalar AD'li hastaların çoğunda *M. globosa* ve *M. restricta* türlerinin bulunması bu iki türün AD gelişiminde major rol oynadığını düşündürmektedir. *Malassezia* türleri AD dışında psoriasis, kepek oluşumu, seboreik dermatit, egzema ve pityriasis versicolor ile ilişkilidir.¹³ Derinin fungal mikrobiyomu üzerine yapılan moleküler çalışmalar, derinin geniş fungal mikrobiyomunun zarar görmüş deride sayısı artan *Malassezia* gibi türler, diğer daha az sayıda kolonizanlar ve çevreden gelen geçici kolonizanlardan oluştuğunu göstermiştir.

AD veya egzema etkilenen deri bölgelerinde başlıca semptomları kaşınma, ödem ve eritem olan alerjik bir hastalıktır. Derinin fungal mikrobiyomu bu hastalarda allerjenleri yayarak, konak yanıtını değiştiren maddeler salgılayarak veya konak hücrelerine zarar veren enzimler üreterek atopik reaksiyonları tetiklemede rol alabilir. Derinin fungal mikrobiyomunun hafif, orta ve ciddi AD hasta gruplarında yapılan rRNA sekans analiz sonuçlarına göre çalışılan ve sonuçlarının sağlıklı deri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, *Malassezia*'nın tüm gruplarda en fazla sayıda olduğu, bununla birlikte non-*Malassezia* maya türlerinin de AD hastalarında arttığı gözlemlenmiştir. *M. sympodialis*, *M. sloofiae* ve *M. dermatis*'in bazen AD ataklarına yol açtığı ileri sürülmüştür. AD'li hastalardaki *Malassezia* türlerinin RNA içeriği sağlıklı bireylere göre daha farklı bulunmuştur.^{14,15} Ayrıca, *Malassezia*'nın AD'li hastalarda

Malassezia'ya özgü Th17 yanıtı ile kütanöz inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir.^{14,15} *C. albicans*, *Cryptococcus diffluanus* ve *Cryptococcus liquifaciens* bütün AD hastalarında saptanırken sağlıklı bireylerde çok nadir saptanmıştır. *C. albicans* ise sadece bir sağlıklı bireyde saptanmıştır. AD, *C. albicans*'a artmış duyarlılık ile de çok ilişkilidir.¹⁶ *Candida*-özgü IgE'nin artması hastalığın ciddiyeti ile yakından ilişkilidir.¹⁷ Tüm bu bulgular *C. albicans*'ın AD patogenezinde öngörülemez bir katkısının olabileceğini düşündürmektedir.

Saçlı derideki kepek oluşumu ile sonuçlanan fungal mikrobiyomunun değişimini inceleyen çalışmada; sağlıklı ve kepekli kafa derisi 26S rRNA analizlerine göre *Ascomycota* sınıfı fungi hem sağlıklı hem kepekli deride saptanırken, *Malassezia* türlerini içeren *Basidiomycota* sınıfı fungi kepekli deride daha fazla saptanmıştır.¹⁸ Bu da *Acremonium*, *Penicillium* ve *Malassezia* türlerinin fazlalığı demektir. Ciddi kepek olgularında *Filobasidium* sınıfı (toplam *basidiomycetes*'lerin %94'ü ve %5 *Malassezia*) sağlıklı deriye göre iki kat fazla saptanmıştır. Sağlıklı kafa derisinde çoğunlukla *Basidiomycetes* fungi sınıfından *Cryptococcus* yer almaktadır. *Ascomycota* sınıfından *Acremonium spp.* hem sağlıklı hem de kepekli deride fazla bulunur. Bununla birlikte, *Didymella* sağlıklı örneklerde, *Penicillium spp.* ise özellikle ciddi kepek olgularında artmıştır. Bu çalışma *Malassezia*'nın kepek ile ilişkisini doğrularken, bu hastalıkta *Filobasidium* sınıfı fungusun de rolü ortaya çıkarmıştır. Seboreik dermatiti olan olgularda *M. restricta* ve *M. globosa* saptanmıştır ve sağlıklı kafa derisi ile karşılaştırıldığında yeni kolonize olmaya başlayan *Malassezia*'nın hastalığın başlangıcının bir belirtisi olduğu kabul edilmektedir.¹⁹ Song ve ark.²⁰, ve Numata ve ark.²¹ *M. restricta* ve *M. globosa*'nın genellikle akne hastalarından izole edildiğini bildirmişlerdir bu nedenle birçok yazarın desteklediği *Malassezia*'nın refrakter akne gelişiminde potansiyel rolü olduğu görüşü ileri sürülmüştür.²² Akaza ve ark., *Malassezia*'nın *Propionobacterium acne*'den yaklaşık 100 kat daha fazla lipaz aktivitesinin olduğunu göstermiştir.²³ *Malassezia* sebundan yağ asitleri üretebilmek için trigliseridleri hidrolize ederek kıl folikül

kanallarının anormal keratinizasyonuna neden olabileceği ve böylece polimorfonükleer nötrofilleri de ortama çekekerek keratinosit ve monositlerden anormal proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açabileceği ileri sürülmüştür.^{24,25} Akne patogenezinde *Malassezia*'nın rolünü açıklığa kavuşturmak için ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Psoriasis gelişiminde çevresel faktörler kadar bakteriyel veya fungal deri mikrobiyomunun da rolü olduğu düşünülmektedir.²⁶ Blaser ve ark. sağlıklı ve psoriasisli derinin fungal mikrobiyomunu 18S rRNA primerleri ve *Malassezia*'nın 5.8 rDNA/ITS2 bölgesine yönelik primerler kullanılarak karşılaştırmışlardır. Bir bireyin sağlıklı derisinde saptanan klonların %98 den fazlasının *Malassezia furfur* ile ilişkili fakat ayrı olan iki *Basidiomycota filotipine* gruplandırılabilirliği, buna rağmen aynı bireyin iki farklı psoriyatik lezyonlarının aynı filotipleri farklı oranlarda içerdiği gösterilmiştir. *Malassezia*'ya özgü primer ile 5 *Malassezia* türü ve 4 bilinmeyen filotip tanımlanmıştır. *Malassezia* tür dağılımı kişiye göre değişmekle birlikte sağlıklı derinin farklı bölgelerinde daha fazla izole edilmiştir.²⁷ Sonuç olarak *Malassezia* türleri sağlıklı deride baskın mikrobiyom elemanıdır, kolonizasyon konağa spesifik olarak değişir ve *Malassezia* kolonizasyonunda psoriasisli hastası ile sağlıklı bireylerde fark oluşturacak tutarlı bir değişim bulunmamaktadır. Benzer şekilde Paulino ve ark. *M. restricta* en fazla olmak üzere *M. globosa* ve *M. sympodialis* türlerinin sağlıklı ve psoriasisli bireylerdeki oranlarını aynı bulmuştur.²⁶ Bununla birlikte, Jagielski ve ark.'nın psoriasisli hastaların AD'li ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığı çalışmada psoriasisli hastalarda *M. furfur*'u daha fazla saptanmıştır.²⁶ Bu sonuçlar *Malassezia* türlerinin psoriasisli hastalığındaki rolünün daha fazla çalışmalarla aydınlatılması gerektiğini göstermektedir.

Fungal mikrobiyom, kronik yara örneklerinden izole edilen bakteri ve fungusun birlikte olduğu mikrobiyal biyofilmlerden %23 oranında saptanmaktadır ve kronik yaraların iyileşmesinin gecikmesine sebep olarak gösterilmektedir.²⁸ Mikrobiyal biyofilmlerden izole edilen fungi-

nin çoğunluğunu *Candida* cinsi mayalar oluşturmaktadır: bununla birlikte *Malassezia*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Aureobasidium*, *Engodontium* ve *Trichophyton*'lar da bulunmaktadır. Kronik yara örneklerinde bakteri/fungi kantitasyonu karşılaştırıldığında mikrobiyal yükün %50 den fazlasını fungi oluşturmaktadır. Bazı olgularda yara bölgesine antifungal tedavi uygulanması yaranın iyileşmesini sağlamaktadır. Bu klinik survey, yaranın mikrobiyal biyofilm enfeksiyonlarında fungal patojenlerin insidansının fazla olduğunu ve birçok yaranın antibakteriyel ajanlara inatçı oluşunun nedenini göstermektedir. Deri mikrobiyomunun çalışıldığı tür belirlemeye yönelik analizler sonucunda *C. albicans* ve *Staphylococcus aureus*' un kombine biyofilm oluşturabildikleri ve kendilerini antifungal ve antibakteriyel ajanlardan koruyabildikleri bilinmektedir. Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa* yanık yaralarında *C. albicans* biyofilmini inhibe etmektedir. Bu nedenle, fungi-bakteri türleri arasındaki etkileşimi de mikrobiyomun araştırmalarının merak edilen diğer bir alanıdır. Derinin fungal mikrobiyomu ile dermatolojik bulgular gösteren sistemik hastalıklar arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir: örneğin deri kalınlaşmasının görüldüğü otoimmün sistemik skleroz hastalığında sağlıklı bireylere kıyasla *Rhodotorula glutinis* türü oldukça fazla bulunmuştur.^{1,29} Tinea versicolor (Ptyriazis versicolor) derinin *Malassezia* tarafından oluşturulan hastalığıdır ve *Malassezia* proteini ile indüklenen melanosit apoptozu ve UV maruziyeti sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Etkilenen bölgelerde çok fazla miktarda *M. globosa*, *M. sympodialis* ve *M. furfur* türleri bulunur. Sağlıklı deride daha fazla maya formu görülürken, etkilenen bölgelerde daha çok hifal formda görülmektedir.³⁰

Ağız ve Akciğerlerin Fungal Mikrobiyomu

Ağız mikrobiyomunun fungi içerdiği bilinmektedir. Ghanoum ve ark.'nın çalışmasında oral fungal mikrobiyata dağılımının kişiler arasında farklılık gösterdiği ve çalışmaya katılanların %20'sinde 4 fungal cins: *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Cryptococcus* olduğu saptanmıştır. Bunlarda en fazla *Candida* türleri: *C. albicans* (%40), *C. parapsilosis*

(%15), *C. tropicalis* (%15), *C. khmerensis* (%5) ve *C. metapsilosis* (%5) rastlandığı belirtilmiştir. Sağlıklı bireylerin oral kavitesinde saptanan funjinin yaklaşık %40'ı kültürlenemeyen fungi olduğu ve 60 non-patojenik fungi cinsini içerdiği gösterilmiştir.³¹ Aslında sağlıklı bireylerin oral kavitesinde bu tür funjinin bulunması yiyeceklerle ve solunum yolu ile alındığından şaşırtıcı değildir. Bununla birlikte, özellikle üst hava yollarının ve oral kavitenin çevre kaynaklı fungi ile kolonizasyonunun hipersensitivite hastalıklarına yol açmada potansiyel rollerinin olduğu akıldatılmalıdır.

Sağlıklı akciğerlerin steril olduğu kabul edildiğinden uzun süredir mikrobiyom içerdiği bilinmiyordu. Günümüzde, kültürden bağımsız sekans teknolojileri ile akciğerlerin de çok çeşitli mikrobiyoma sahip olduğu gösterilmiştir.^{1,31} Fungi topluluğunda ITS sekans analizlerine göre ana patojen *Aspergillus fumigatus* olmak üzere *Ceriporia lacerata*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Penicillium brevicompactum*'un bulunduğunu gösterilmiştir.^{32,33} Akciğer-barsak aksisi yolu ile akciğer ve barsak mikrobiyomunun ilişkili olduğu ve barsak mikrobiyomundaki değişimin akciğerlerde immünojenik reaksiyonlara ve allerjik hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir.^{34,35}

Sağlıklı akciğerin mikrobiyomu astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibröz (KF) ve bronşiyektazi gibi kronik inflamatuvar solunum hastalığı olan hastalardan oldukça farklıdır. Sağlıklı akciğerlere kıyasla astım hastalarında, *Psathyrella candolleana*, *Malassezia pachydermatis*, *Termitomyces clypeatus* ve *Grifola sordulenta* vb. gibi fungal çeşitlilik gözlemlenmektedir.^{1,36} Çok ciddi astımı olan çocuklarda astımı olmayanlardan daha fazla *Rhodotorula*, *Rhodospodidium*, *Leucosporidium* ve *Pneumocystis* saptanmıştır.³⁷

Hava yollarının kalıcı ve geridönüşümü olmayan genişlemesi anlamına gelen bronşiyektazisi olan hastalarda fungal kolonizasyon riski çok yüksektir. Bronşiyektazide mukosilier temizleme fonksiyonunun da bozuk olması nedeni

ile hava ile solunan fungal sporlar fungal kolonizasyonda artışa yol açar. Bu durumda hava yollarının patojenik potansiyeli yüksek olan fungal mikrobiyomu ön plana çıkar. İmmun yanıtın veya alerjik duyarlılığın bozuk olduğu birçok hastada *Aspergillus* ön planda olmak üzere, *Penicillium*, *Clavispora* ve *Cryptococcus* saptanmaktadır.³⁸

Charson ve ark.'nın çalışmasında sağlıklı akciğerleri olan ve akciğer transplantasyonu yapılan hastalarda ITS bölgelerine göre sekans analizleri ile ağız ve akciğer fungal mikrobiyomu araştırılmıştır. Akciğer transplant hastalarında yoğun antibiyotik ve immunsupresif ajan kullanımına bağlı olarak oral kavitede *Candida* yoğunluğu gözlenmiştir.³⁹ Sağlıklı bireylerin bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvılarında minimal bir ITS transkripsiyonu olduğu, bununla birlikte akciğer transplant hastalarının BAL sıvılarında ise *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, veya *Cryptococcus spp.* yoğun miktarda saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda, konak savunması ve muhtemel bakteri mikrobiyomu kaynaklı direnç mekanizmalarının fungal mikrobiyomun akciğerlerde az miktarda da olsa bulunmasında major rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.^{1,38}

Fungal mikrobiyomun önemli bir elemanı da son yıllarda Ascomycota ailesinden olduğu kanıtlanan *Pneumocystis* cinsidir.⁴⁰ Yeni moleküler analizlere göre *Pneumocystis*'in sağlıklı bireylerin akciğerlerinde bile düşük miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarında kofaktör olabileceği düşünülmektedir. KOAH'lı hastaların %17'sinde *Aspergillus spp* izole edilmiştir ve taksonomik olarak belirlenen *Pneumocystis jirovecii*, HIV pozitif ve KOAH-ilişkili HIV pozitif bireylerde saptanması immünolojik bir yatkınlığı kanıtlamaktadır.⁴¹

Fungal çeşitliliğin gözlemlendiği bir diğer hastalık da KF hastalığıdır. Transmembran iletken düzenleyici genin fonksiyonundaki bozukluk nedeni ile oluşan KF hastalığında *A. fumigatus* oranı %6-60 arasında değişmektedir.⁴² Sekans analiz sonuçlarına göre KF'li hastalardan alınan örneklerin tek başına mikolojik kültüründe izole edilen fun-

gal etkenlerin yanısıra kültürü yapılamayan etkenlerin de olduğu saptanmıştır.⁴³ Bu hastalarda *Aspergillus* (özellikle *A. fumigatus*), *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *Malassezia* türleri izole edilmiştir.⁴⁴ Astım ve KF'de *Aspergillus* tarafından indüklenen alerjik yanıt "alerjik bronkopulmoner hastalık" şeklinde tanımlanmaktadır.

Carpagnano ve ark.⁴⁵ 43 akciğer kanseri hasta ve 21 sağlıklı bireylerde ekshalasyon ile verilen havada ve bronşiyal fırça örneklerinde fungi varlığını araştırmışlardır. Bu çalışma sonucuna göre, Hastaların %27,9'unda ekshalasyon havasında *A. niger*, *A. ochraceus* ve *Penicillium spp.* saptamışlar, buna rağmen sağlıklı bireylerde izolasyon elde edememişlerdir. *Aspergillus* türlerinin kanserojenik mikotoksinler olan okratoksin ve fononisinler salgıladığı ve bu toksinlerin veya diğer toksik ikincil metabolitlerinin akciğer kanseri gelişiminde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Gastrointestinal Kanalin Fungal Mikrobiyomu

İntestinal kanalın bakteriyel mikrobiyomu ile ilgili kapsamlı literatüre rağmen, bağırsak sisteminin fungal mikrobiyomu hakkında çok az şey bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyomunu inceleme çalışmalarında, büyük ölçüde gastrointestinal sistem ile ilişkili hastalıklara odaklanılmıştır ve diğer gastorointestinal olmayan hastalık durumlarında, mikrobiyom değişiminin nasıl olduğu araştırılmaktadır.

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında (IBH), 18S rRNA ve rDNA dizilimi kullanılan ilk çalışmada, Crohn hastalığında mantar çeşitliliğinin artmış olduğu gösterilmiş, buna karşılık ülseratif kolitte herhangi bir artış bildirilmemiştir.^{46,47} İltihaplı ve iltihapsız dokular arasında başka farklılıklar da tespit edilmiştir.⁴⁶ Yakın zamanda, ITS2 (internal transcribed spacer) sekanslama yöntemi ile, IBH'da belirgin fungal mikrobiyal disbiyoz bulunmuştur. Basidiomycota / Ascomycota oranının, *C. albicans* oranının arttığı ve *Saccharomyces cerevisiae* oranının ise azalmış olduğu tespit edilmiştir.⁴⁸ Chron hastalığında ITS2 sekanslama ile,

hastalık alevlenmeleri sırasında bağırsağın genel mantar yükünün arttığı ve *Cystofilobasidiaceae* ailesi ve *C. glabrata* türlerinin yüksek oranlarda olduğu doğrulanmıştır. Başka bir çalışmada, ITS1 sekanslama ile, Chron hastalığı olmayan akrabalara kıyasla hastalığı olanlarda *C. tropicalis* oranı artmış olarak tespit edilmiştir.⁴⁹ İlginç bir şekilde, *S. cerevisiae* ve *Filobasidium uniguttulatum*, Chron hastalığındaki iltihaplı olmayan doku ile ilişkilidir.⁵⁰ *Malassezia restta*'nın, CARD9 polimorfizimli hastaların bir kısmında bu hastalığın şiddetini arttırdığı bulunmuş ve bu da belirli hasta fenotiplerinde spesifik mantarların hedeflenmesinin değerli olabileceğini düşündürmektedir.⁵¹

Antifungal ilaçların, ITS1 ampikon sekanslamasının *Candida spp.*'de bir azalma ve *Aspergillus*, *Wallemia* ve *Epicoccum spp.*'de eş zamanlı artış ile karakterize bağırsak fungal disbiyozunu ortaya çıkardığı ve hayvan modellerinde kolit şiddetinde artışa yol açtığı gösterilmiştir.⁵² Benzer şekilde, antibiyotikler bağırsak bakteriyomunun modifikasyonu yoluyla bağırsak iltihabını etkiler ve sonuç olarak mantar kolonizasyonu üzerinde etki yapar. Barsaktaki *Enterobacteriaceae*'deki değişiklik mantar kolonizasyonunu ve ülseratif kolit şiddetini etkilemektedir.⁵³ Fare bağırsağı mikrobiyomu değişimi, insanlarda bağırsak mikrobiyomunu tam olarak temsil etmese de bulgular IBH'daki mantar disbiyozunun sonucunu desteklemektedir.

Candida spp., bağırsaklarda rahatça çoğalabilir ve bağırsaklardaki bakteriyel mikrobiyom ile yoğun olarak bir arada bulunabilir. Mikrobiyom antibiyotik kullanımı sırasında bozulabilir ve bağırsağın iltihaplı mukozasını kolonize edebilir. Peki ya diğer mantar cinsleri? Bir çalışmada hem spesifik bir patojen içermeyen hem de kısıtlı bir bakteri florasına sahip fareler kullanılarak, moleküler tekniklerle çeşitli ve bol miktarda mantar mikrobiyomu saptandığı tespit edilmiştir.⁵⁴ Dört ana mantar filumunun (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* ve *Zygomycota*) tümü tespit edilmiş ve bu iki tip fare grupları arasındaki mantar mikrobiyomu içindeki tür dağılımında açık farklılıklar olduğu görülmüştür. Farelerin gastrointestinal yoldaki

Candida kolonizasyonu, mukozal bariyerlerini etkileyerek gıda antijenlerine karşı alerjik duyarlılığı arttırabilir.⁵⁵ Barsaktaki komensal fungi Dectin-1 reseptörleri aracılığı ile tanınmaktadır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, Dectin-1 kodlayan geni eksik olan farelerde ülseratif kolite karşı duyarlılığın artmış olduğu gösterilmiştir. Yabani tip laboratuvar farelerinde (wild type), ITS 1-2 ampikon pirosekanslama ile tespit edilen mantarların %65,2' ini özellikle hasarlı mukozalar için daha virulan bir kandida türü olan *Candida tropicalis* ve daha az oranlarda *Trichosporon* ve *Saccharomyces* oluşturduğu rapor edilmiştir.⁵⁶ Pediatrik IBH' da, 18SrDNA piroz dizilimi, *Basidiomycota* baskınlığını göstermektedir.⁵⁷ Diğer pediatrik IBH çalışmalarında, ITS1 sekanslama ile, yüksek *Candida* yükü ve azalmış mantar çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır.⁵⁸

Sağlıklı bağırsak fungal mikrobiyomuna yönelik çalışmalar sınırlıdır ancak çok gereklidir. Nash ve ark. sağlıklı insan bağırsak mikrobiyomunun çeşitlilikten yoksun olduğunu ve *Saccharomyces*, *Malassezia* ve *Candida* gibi maya cinslerinin hakimiyetinde olduğunu gözlemlemişlerdir.⁵⁹ Fonksiyonel bir gastrointestinal hastalık olan irritabl bağırsak sendromunda (IBS), dışkı örnekleri ITS1 sekanslama ile, önemli bir çeşitlilik kaybıyla birlikte bir bağırsak mikrobiyom disbiyozunu ortaya çıkarır. *Saccharomyces* ve *Candida* IBS'da ve sağlıklı kontrollerde baskın bulunmuş ancak IBS' li kişilerde bu mantarlar daha yüksek oranda gözlenmiştir.⁶⁰ Fungal mikrobiyom, aşırı duyarlı ve normal IBS2' li hastalar arasında açıkça farklılık göstermektedir.⁶¹ Bu bulgular klinik açıdan ilgi çekicidir ve bu gözlemlerin mekanik temellerini daha da açığa kavuşturmak için daha çok kanıt ve biyolojik doğrulamaya ihtiyaç duyulmaktadır.⁶⁰

Onkolojik ortamda antifungal tedavi, pankreatik duktal karsinomda azalmış tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilirken, *Malassezia*'nın postterapötik repopülasyonu tümör büyümesini hızlandırmaktadır.⁶² Ek olarak, *Moniliophthora*, *Rhodotorula*, *Aremonium*, *Thielaviopsis* ve *Pisolithus* ile birlikte kolorektal kanserde artan *Malassezia* tanımla-

nır ve daha yüksek *Basidiomycota* ise daha ilerlemiş hastalıkla ilişkilidir.^{63,64}

Bağırsak mikrobiyomu, ayrıca akciğer ve merkezi sinir sistemi gibi diğer organ sistemlerini de kendi eksenleri aracılığı ile etkileyebilir, ancak kesin mekanizmalar tam anlaşılammıştır. Bağırsak mikrobiyomu çeşitli kronik iltihaplı akciğer hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir.⁶⁵ Örneğin, bağırsakta *C. albicans*'ın varlığı, Th17 ile ilişkili bağışıklık yollarını etkiler, bu da kronik havayolu hastalığında *Aspergillus* ile ilişkili solunum hastalığı patolojisinde rol oynar.⁶⁶ Bağırsak mikrobiyom disbiyozu, şizofreni, otizm ve Rett sendromu gibi psikonörolojik bozukluklarda daha fazla *Candida* bolluğunun meydana geldiğini bildirmiştir.^{67,68} Bu mikrobiyom – bağırsak - beyin eksenindeki bağırsak mantarlarının araştırılmasına yol açmıştır.⁶⁹

Son çalışmalar, fungal disbiyoz ve IBS arasındaki ilişkileri tanımlarken, IBS hastalarındaki anksiyete ve depresyon gibi nörolojik semptomların, mikrobiyom – bağırsak- beyin ekseninde bağırsak mantarları ile ilişkili olduğunu desteklemiştir.⁷⁰

Şu anda bu bulgulardaki biyolojik mekanizmayı daha net açıklamak için, daha fazla çalışmaya gerek vardır. Yine de bu bulgular, spekülatif olmakla beraber, insan hastalıklarında fungal mikrobiyomun önemini göstermektedir. Bağırsak yolundaki mantar mikrobiyomunun incelenmesi henüz emekleme aşamasındadır ve keşfedilmeyi bekleyen daha birçok şey bulunmaktadır.

Sonuçta; Bakteriye odaklanan mikrobiyom çalışmalarının sayısı mantar mikrobiyomunun (ve viromun) çok üzerindedir. Daha kapsamlı mantar veri tabanı platformu ile birleştirilen standartlaştırılmış ve güvenilir bir mikrobiyom dizileme yöntemi, mantar mikrobiyomları için benzer ölçkelebilirlik elde etmek için çok önemlidir. Çeşitli mikroplar arasında bilinen etkileşime rağmen, bakteriyel mikrobiyomları, mantar mikrobiyomlarını, viromları ve parazitleri entegre eden çalışmalar sınırlıdır. Mikrobiyal

grupların üyeleri arasındaki etkileşim, muhtemelen tek tek mikropların işlevinde ve davranışında bir değişikliğe neden olur ve bunlar da hastalık patogeneğinde önemli roller oynar. Ana vücut bölgelerinde barındırılan mikroplar, başlangıçtaki disbiyoz bölgesi dışında hastalığın sistemik tezahürlerine yol açan, konakçı bağışıklığı ile karşılıklı konuşma ve etkileşim sergiler¹.

Bağırsak mikrobiyomunun düzensizliği, bağırsakta artmış *Clostridium* varlığı, akciğer-bağırsak eksenini yoluyla alerjik hava yolları hastalığında, astımda akciğer mikrobiyomunun değişiminde rolü olduğunu göstermiştir^{1,71}. Bu teorem sağlıklı bağırsak mikrobiyom bileşiminin oral antifungallerle bozulmasının, allerji hava yolu hastalığının alevlenmesine nasıl yol açabileceği gibi klinik fenomenler için açıklamalar sağlar⁷². Mikrobiyomun kesin rolünü ve hastalık patogenezine katkısını daha iyi anlamak için, gelecekteki çalışmalar, bütünsel bir sistem tabanlı yaklaşımla birden fazla vücut bölgesinde konakçı bağışıklığı ile çeşitli mikrobiyal aileler arasındaki etkileşimleri değerlendirmelidir. Bu tür karmaşık ve birbirine bağlı mikrobiyal sistemlerde, mikrobiyom, bir dizi hastalığa ve bunların patogenezine katkıda bulunan bir faktör olabilir.

Fungal Mikrobiyom Analizi

Fungal mikrobiyomun tanımlanması yukarıdaki çalışmalarda da bahsedildiği gibi farklı anatomik bölgelerden izole edilen verimli bir mikrobiyal DNA eldesinin gerekli olduğu sekans yöntemi ile olmaktadır. Bakteri mikrobiyom çalışmalarından farklı olarak, fungal mikrobiyom çalışmalarında taksonomik sınıflandırma ve primer seçimi henüz net değildir.^{1,73} Bakterinin genomik DNA'sını elde etmek için kullanılan yöntemler glukoz, mannan ve glikoproteinler içeren sert fungal hücre duvarı için uygun değildir.

Fungal DNA elde oranını arttırmak için alternatif bir yöntem olarak DNA ekstraksiyonundan önce enzimatik lizis uygulanması önerilmektedir.⁷³ DNA eldesi için kullanılan farklı ekstraksiyon kitleri laboratuvarlar arasında farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Metagenomik Shotgun olarak adlandırılan yöntem, fungal ve bakteri sekanslarının birarada elde edildiği ve bunların arasından fungal sekansı ayırabilmek için çok ayrıntılı derin bir sekanslamanın gerektiği yöntemdir. Bu yöntemi kullanarak, Lewis ve ark.⁷⁴ insan gaita örneklerinden 5 farklı fungi izole etmişlerdir, bununla birlikte fungal spesifik sekanslama ile 50-60 fungal cins tanımlanabilmiştir.⁷⁵ Bu fungal spesifik yaklaşımlar “hedef amplikon sekansı” olarak da adlandırılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu ve rRNA'nın ITS1 veya ITS2 bölgelerinin sekanslanmasına dayanmaktadır. Günümüze kadar yapılan fungal mikrobiyom çalışmalarında ITS1 bölgesini hedef alan primerler kullanılmıştır. Fakat bu çalışma sonuçlarına kıyasla ITS2 alt bölgesini hedef alan forward primer (gITS7ngs) ve reverse primer (ITS4ng) kullanıldığında daha kapsamlı bir fungi tanımlanması elde edildiği ve daha az taksonomik sapmaların olduğu bildirilmiştir⁷⁶. Daha sonraki döngülerde düşük GC içeriği olan PZR polimeraz proofreading olması hata oranını azaltmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise PZR sikluslarının ve DNA dilüsyonlarının doğru ve iyi düşünülerek hazırlanması gerektirir. Ayrıca, negatif kontrol kullanılması kontaminasyonu tespit edeceğinden son derece önemlidir.¹

ITS bölgelerinin sekanslama sonuçları elde edildikten sonra, sonuçların analizi biyoinformatik çalışmalar ile gerçekleştirilir. Kalite kontrollü referans veritabanlarının eksikliğinden dolayı yeni fungal tür tanımlanması veya sıklıkla karşılaşılan fungal türlerin eşeyli veya eşeysiz formlarına farklı isimler ile tanımlanması gibi sorunlar ile karşılaşmaktadır.⁷⁷ Bu durum, güncel fungal taksonomi bilgisinden farklı olduğundan kafa karışıklığına yol açmaktadır. Gen bankalarına eklenen fungal sekansların tür isimlerini çok zayıf veya yanlış olduğu ileri sürülmüştür. Gen bankasına eklenen ITS sekanslarının çoğunda “tanımlanamayan fungus” veya “tanımlanamayan OTU” şeklindedir. ITS bölgesini referans olarak kullanılan veritabanları INSDC, UNITE and Warcup'tır. En sık kullanılan ve fungal sekansların arındırılmış olduğu gelişmiş veri tabanı ise “UNITE” veritabanıdır.⁷⁸ Bazı araştırmacılar, bazı bölgeler

örneğin barsak⁷⁹ ve patojenik fungi⁸⁰ için elde ettikleri ITS sekans bilgilerini düzenleyerek manuel olarak düzenleyerek geliştirmişlerdir.

Donovan ve ark.'nın fungal metagenomik analizindeki zorlukların giderilmesine yönelik önerdikleri biyoinformatik inceleme de oldukça önemlidir. “FindFungi” olarak adlandırılan geliştirdikleri bu yöntemde yalancı pozitiflikleri tespit edilmesinin mümkün olduğunu savunmuşlardır⁸¹

Sekans işlemi sonlandıktan sonra fungi tanımlanması ve sayısı belirlenmiş olur. Veritabanı hizalamaları ile en iyi eşleşmeyi bulmaya yarayan iyi bir yöntemdir, fakat bu eşleşmenin ne derece doğru olduğunu araştırmak gerekmektedir. Fungal tür sekans çalışmalarına göre, ITS sekansları klinik açıdan önemli iki tür olan *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında oldukça yararlıdır, fakat *Cladosporium* türleri arasındaki ITS varyasyonu çok yetersizdir.⁸² Fungal mikrobiyom analizinde yapılan sekans çalışmaları problemler gibi gözükse de, internal kontrollerin olduğu daha birçok çalışma ile bu problemler çözüm bulacaktır düşüncesindeyiz.

Kaynaklar

1. Tiew PY, Mac Aogain M, Ali NABM, Thng KX, Goh K, Lau KJX, Chotirmall SH. The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia*. 2020 Apr;185(2):207-231. doi: 10.1007/s11046-019-00413-z
2. Limon, J.J., Skalski, J.H., Underhill, D.M., 2017. Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell Host & Microbe* 22, 156–165. doi:10.1016/j.chom.2017.07.002
3. Brunetti L, De Caro F, Boccia G, Cavallo P, Capunzo M. Surveillance of nosocomial infections: a preliminary study on yeast carriage on hands of healthcare workers. *J Prev Med Hyg*. 2008 Jun;49(2):63-8.
4. Paul AA, Hoffman KL, Hagan JL, Sampath V, Petrosino JF, Pammi M. Fungal cutaneous microbiome and host determinants in preterm and term neonates. *Pediatr Res*. 2020 Aug;88(2):225-233. doi: 10.1038/s41390-019-0719-7.
5. Gupta AK, Kohli Y. Prevalence of Malassezia species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. *Med Mycol*. 2004 Feb;42(1):35-42. doi: 10.1080/13693780310001610056
6. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002 May 15;185(10):1483-9. doi: 10.1086/340511.
7. Kistowska M, Fenini G, Jankovic D, Feldmeyer L, Kerl K, Bosshard P, Contassot E, French LE. Malassezia yeasts activate the NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells via Syk-kinase signalling. *Exp Dermatol*. 2014 Dec;23(12):884-9. doi: 10.1111/exd.12552.
8. Gresnigt MS, Jaeger M, Subbarao Malireddi RK, Rasid O, Jouvion G, Fitting C, Melchers WJG, Kanneganti TD, Carvalho A, Ibrahim-Granet O, van de Veerdonk FL. The Absence of NOD1 Enhances Killing of Aspergillus fumigatus Through Modulation of Dectin-1 Expression. *Front Immunol*. 2017 Dec 13;8:1777. doi: 10.3389/fimmu.2017.01777.
9. Oh, J., Freeman, A.F., Park, M., Sokolic, R., Candotti, F., Holland, S.M., Segre, J.A., Kong, H.H., 2013. The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Research* 23, 2103–2114. doi:10.1101/gr.159467.113
10. Velegriaki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., Boekhout, T., 2015. Malassezia Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. *PLOS Pathogens* 11, e1004523. doi:10.1371/journal.ppat.1004523
11. Savolainen J, Lintu P, Kosonen J, Kortekangas-Savolainen O, Viander M, Pène J, Kalimo K, Terho EO, Bousquet J. Pityrosporum and Candida specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jan;31(1):125-34. PMID: 11167960.
12. Back, O., Scheynius, A., Johansson, S.G.O., 1995. Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Archives of Dermatological Research* 287, 448–451. doi:10.1007/bf00373427
13. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegriaki A. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jan;25(1):106-41. doi: 10.1128/CMR.00021-11.
14. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol*. 2013 Jul;21(7):334-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.04.002.
15. Zhang E, Tanaka T, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A, Sugita T. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol Immunol*. 2011 Sep;55(9):625-32. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00364.x.
16. Sonesson A, Bartosik J, Christiansen J, Roscher I, Nilsson F, Schmidtchen A, Bäck O. Sensitization to skin-associated microorganisms in adult patients with atopic dermatitis is of importance for disease severity. *Acta Derm Venereol*. 2013 May;93(3):340-5. doi: 10.2340/00015555-1465.
17. Chang FY, Lee JH, Yang YH, Yu HH, Wang LC, Lin YT, Chiang BL. Analysis of the serum levels of fungi-specific immunoglobulin E in patients with allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(1):49-56. doi: 10.1159/000319208.
18. Park HK, Ha MH, Park SG, Kim MN, Kim BJ, Kim W. Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. *PLoS One*. 2012;7(2):e32847. doi: 10.1371/journal.pone.0032847.
19. Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, I.D., Boekhout, T., Dawson, T.L., 2018. Malassezia ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology* 56, S10–S25. doi:10.1093/mmy/myx134
20. Song, Y.C., Hahn, H.J., Kim, J.Y., Ko, J.H., Lee, Y.W., Choe, Y.B., Ahn, K.J., 2011. Epidemiologic Study of Malassezia Yeasts in Acne Patients by Analysis of 26S rDNA PCR-RFLP. *Annals of Dermatology* 23, 321. doi:10.5021/ad.2011.23.3.321
21. Numata S, Akamatsu H, Akaza N, Yagami A, Nakata S, Matsunaga K. Analysis of facial skin-resident microbiota in Japanese acne patients. *Dermatology*. 2014;228(1):86-92. doi: 10.1159/000356777
22. Hu G, Wei YP, Feng J. Malassezia infection: is there any chance or necessity in refractory acne? *Chin Med J (Engl)*. 2010 Mar 5;123(5):628-32.
23. Akaza N, Akamatsu H, Takeoka S, Sasaki Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K. Malassezia globosa tends to grow actively in summer conditions more than other cutaneous Malassezia species. *J Dermatol*. 2012 Jul;39(7):613-6. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01477.x.
24. Kesavan S, Walters CE, Holland KT, Ingham E. The effects of Malassezia on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Med Mycol*. 1998 Apr;36(2):97-106.
25. Akaza, N., Akamatsu, H., Takeoka, S., Mizutani, H., Nakata, S., Matsunaga, K., 2012. Increased hydrophobicity in Malassezia species correlates with increased proinflammatory cytokine expression in human keratinocytes. *Medical Mycology* 50, 802–810. doi:10.1093/13693786.2012.678019
26. Yan D, Issa N, Afifi L, Jeon C, Chang HW, Liao W. The Role of the Skin and Gut Microbiome in Psoriatic Disease. *Curr Dermatol Rep*. 2017 Jun;6(2):94-103. doi: 10.1007/s13671-017-0178-5.
27. Paulino LC, Tseng CH, Strober BE, Blaser MJ. Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2933-41. doi: 10.1128/JCM.00785-06.
28. Dowd SE, Delton Hanson J, Rees E, Wolcott RD, Zischau AM, Sun Y, White J, Smith DM, Kennedy J, Jones CE. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care*. 2011 Jan;20(1):40-7. doi: 10.12968/jowc.2011.20.1.40.
29. Arron ST, Dimon MT, Li Z, Johnson ME, Wood TA, Feeney L, et al. High Rhodotorula sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2138–45.
30. Jo J-H, Kennedy EA, Kong HH. Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence*. 2016;8(3):324–33
31. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 8;6(1):e1000713. doi: 10.1371/journal.ppat.1000713.
32. Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, Bowerman KL, Keely S, Hugenholtz P, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir Med*. 2019;7:907–920.
33. Kong HH, Morris A. The emerging importance and challenges of the human mycobiome. *Virulence*. 2017;8(3):310–2.
34. Lyon J. The Lung Microbiome: Key to Respiratory Ills? *JAMA*. 2017 May 2;317(17):1713-1714. doi: 10.1001/jama.2017.3023.
35. Li X, Leonardi I, Semon A, Doron I, Gao IH, Putzel GG, Kim Y, Kabata H, Artis D, Fiers WD, Ramer-Tait AE, Iliev ID. Response to Fungal Dysbiosis by Gut-Resident CX3CR1+ Mononuclear Phagocytes Aggravates Allergic Airway Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Dec 12;24(6):847-856.e4. doi: 10.1016/j.chom.2018.11.003.
36. van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 2013 Feb 5;13:69. doi: 10.1186/1471-2334-13-69.
37. Goldman DL, Chen Z, Shankar V, Tyberg M, Vicencio A, Burk R. Lower airway microbiota and mycobiota in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Feb;141(2):808-811.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.018.
38. Mac Aogáin M, Tiew PY, Lim AYH, Low TB, Tan GL, Hassan T, Ong TH, Pang SL, Lee ZY, Gwee XW, Martinus C, Sio YY, Matta SA, Ong TC, Tiong YS, Wong KN, Narayanan S, Au VB, Marlier D, Keir HR, Tee A, Abisheganaden JA, Koh MS, Wang Y, Connolly JE, Chew FT, Chalmers JD, Chotirmall SH. Distinct “Immunoallotypes” of Disease and High Frequencies of Sensitization in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Apr 1;199(7):842-853. doi: 10.1164/rccm.201807-1355OC.
39. Charlson, E.S., Diamond, J.M., Bittinger, K., Fitzgerald, A.S., Yadav, A., Haas, A.R., Bushman, F.D., Collman, R.G., 2012. Lung-enriched Organisms and Aberrant Bacterial and Fungal Respiratory Microbiota after Lung Transplant. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186, 536–545. doi:10.1164/rccm.201204-0693oc
40. Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat M, Viscogliosi E, Dei-Cas E. Pneumocystis: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res*. 2011 Feb;11(1):2-17. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00698.x.
41. Lawani MB, Morris A. The respiratory microbiome of HIV-infected individuals. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Aug;14(8):719-29. doi: 10.1080/14787210.2016.1206469.
42. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):299-323. doi: 10.1128/CMR.00068-09.
43. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Walleet F, Walleert B, Dei-Cas E, Sime-Ngando T, Chabé M, Viscogliosi E. The airway microbiota in

- cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One*. 2012;7(4):e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313.
44. Nguyen LD, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol*. 2015 Feb 13;6:89. doi: 10.3389/fmicb.2015.00089. PMID: 25762987; PMCID: PMC4327734.
45. Carpagnano, G.E., Susca, A., Scioscia, G., Lacedonia, D., Cotugno, G., Soccio, P., Santamaria, S., Resta, O., Logrieco, G., Foschino Barbaro, M.P., 2019. A survey of fungal microbiota in airways of healthy volunteer subjects from Puglia (Apulia), Italy. *BMC Infectious Diseases* 19. doi:10.1186/s12879-019-3718-8
46. Li Q, Wang C, Tang C, He Q, Li N, Li J. Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(6):513.
47. Ott SJ, Ku'hbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A, et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(7):831–41.
48. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017;66(6):1039–48.
49. Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Hager C, Chandra J, Retuerto MA, et al. Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *MBio*. 2016;7(5):e01250-16.
50. Liguori G, Lamas B, Richard ML, Brandi G, Da Costa G, Hoffmann TW, et al. Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *J Crohn's Colitis*. 2015;10(3):296–305.
51. Limon JJ, Tang J, Li D, Wolf AJ, Michelsen KS, Funari V, et al. Malassezia is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models. *Cell Host Microbe*. 2019;25(3):377–88 e6.
52. Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, Leal CA, Gargus M, Tang J, et al. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2016;19(6):865–73.
53. Sovran B, Planchais J, Jegou S, Straube M, Lamas B, Natividad JM, et al. Enterobacteriaceae are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome*. 2018;6(1):152.
54. Scupham, A.J. et al. (2006) Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl. Environ. Microbiol*. 72, 793–801.
55. Yamaguchi, N. et al. (2006) Gastrointestinal Candida colonisation promotes sensitisation against food antigens by affecting the mucosal barrier in mice. *Gut* 55, 954–960.
56. Iliev, I.D. et al. (2012) Interactions between commensal fungi and the Ctype lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 336, 1314–1.
57. Mukhopadhyaya I, Hansen R, Meharg C, Thomson J, Russell R, Berry S, et al. The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*. 2015;17(4):304–10.
58. Chehoud C, Albenberg LG, Judge C, Hoffmann C, Grunberg S, Bittinger K, et al. Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(8):1948–56.
59. Van der Waaij, D. and Van der Waaij, B.D. (1990) The colonization resistance of the digestive tract in different animal species and in man; a comparative study. *Epidemiol. Infect*. 105, 237–243.
60. Gu Y, Zhou G, Qin X, Huang S, Wang B, Cao H. The potential role of gut mycobiome in irritable bowel syndrome. *Front Microbiol*. 2019;10:1894.
61. Botschuijver S, Roeseleers G, Levin E, Jonkers DM, Welting O, Heinsbroek SEM, et al. Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology*. 2017;153(4):1026–39.
62. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim JI, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature*. 2019;574:264–7.
63. Coker OO, Nakatsu G, Dai RZ, Wu WKK, Wong SH, Ng SC, et al. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut*. 2019;68(4):654–62.
64. Luan C, Xie L, Yang X, Miao H, Lv N, Zhang R, et al. Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Sci Rep*. 2015;5:7980.
65. Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, Bowerman KL, Keely S, Hugenholtz P, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir Med*. 2019;7:907–920.
66. Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, Rocker M, Blango MG, Kaufmann S, et al. Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*. *Cell*. 2019;176(6):1340–55 e15.
67. Severance EG, Alaedini A, Yang S, Halling M, Gressitt KL, Stallings CR, et al. Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2012;138(1):48–53.
68. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1):24.
69. Dinan TG, Cryan JF. The microbiome–gut–brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin N Am*. 2017;46(1):77–89.
70. Thijssen AY, Jonkers DM, Leue C, van der Veek PP, Vidakovic-Vukic M, van Rood YR, et al. Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44(10):e236–41.
71. Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, Rocker M, Blango MG, Kaufmann S, et al. Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*. *Cell*. 2019;176(6):1340–55 e15.
72. Wheeler ML, Limon JJ, Underhill DM. Immunity to commensal fungi: detente and disease. *Ann Rev Pathol*. 2017;12:359–85.
73. Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. *PLoS One*. 2017 Jan 18;12(1):e0169877. doi: 10.1371/journal.pone.0169877.
74. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe*. 2015 Oct 14;18(4):489–500. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.008. Erratum in: *Cell Host Microbe*. 2017 Aug 9;22(2):247.
75. Hoarau, G., Mukherjee, P.K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M.A., et al. Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *MBio* 7, 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01250-16>.
76. Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Jan;17(2):95–109. doi: 10.1038/s41579-018-0116-y.
77. Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Högenauer C, Thallinger GG, Gorkiewicz G. Critical Issues in Mycobiota Analysis. *Front Microbiol*. 2017 Feb 14;8:180. doi: 10.3389/fmicb.2017.00180.
78. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol*. 2013 Nov;22(21):5271–7. doi: 10.1111/mec.12481.
79. Tang J, Iliev ID, Brown J, Underhill DM, Funari VA. Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi. *J Immunol Methods*. 2015 Jun;421:112–121. doi: 10.1016/j.jim.2015.04.004.
80. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2015 May;53(4):313–37. doi: 10.1093/mmy/mv008.
81. Donovan PD, Gonzalez G, Higgins DG, Butler G, Ito K. Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLoS One*. 2018 Feb 14;13(2):e0192898. doi: 10.1371/journal.pone.0192898.