İNVAZİF ASPERGİLLOZ TANILI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS* TÜRLERİ VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI

Fatma MUTLU SARIGÜZEL[1], A.Nedret KOÇ[1], Pınar SAĞIROĞLU[1], M.Altay ATALAY[1], Arda BORLU[2], Özlem CANÖZ[3], Bedia DİNÇ[4]

1.Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ.

2. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, KAYSERİ.

3. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ.

4. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

Giriş ve Amaç:

Çevre ve hastane ortamında yaygın olarak bulunan *Aspergillus* türleri, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortalite etkenidir. *Aspergillus* infeksiyonlarının tanısı, güvenilir ve kolay uygulanabilen tanı testlerinin olmaması nedeniyle genellikle geç konur ve hastalara zamanında etkin tedavi başlanamaz.

Bu çalışmada, Ocak 2018 - Haziran 2019 tarihleri arasında laboratuarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *Aspergillus* cinsi küf mantarı üreyen hastaların demografik verileri ve suşların in vitro antifungal duyarlılık sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem:

Ocak 2018 - Haziran 2019 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Laboratuarı'na mantar enfeksiyonu şüphesi ile gönderilen ve kültür üremesi pozitif olan 44 hastanın çeşitli demografik özellikleri ve klinik örneklerinden izole edilen *Aspergillus spp.* suşları değerlendirilmiş. Ayrıca direk mikroskobisi, kültür üremesi ve GM antijeni negatif olan 19 hastanın verileriyle karşılaştırılmıştır. *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler kullanılmıştır. Aspergillus türlerinin tanımlanması için hem makroskopik hem de mikroskopik özellikler incelenmiştir. Sabouraud Dekstroz Agar'da (SDA) üreyen koloniler konidyum üretimini ve pigment üretimini arttırmak için patates dekstroz agar (PDA) besiyerine, tür tanımı için ise Czapek-Dox Agar'a ekilmiştir. Üreyen türlerin herbirinin koloni rengi, morfolojisi, üreme hızı ve 25°C, 35°C ve 44°C'de üreme özellikleri kayıt edilmiştir. Mikroskopik incelemede ise laktofenol pamuk mavisi ile preparat hazırlanmış ve konidya biçimi, rengi, sterigmata sayısı, vezikül şekli, konidyoforların yapısı, hülle hücrelerinin varlığı ve şekli dikkate alınmıştır. Hastalarda "invazif aspergilloz" tanımı

ise, Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Kuruluşu, İnvazif Fungal Enfeksiyon Çalışma Grubunun Aspergilloz tanı kriterlerine göre yapılmıştır. Suşların antifungal duyarlılıkları gradient difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. İstatistiksel analizlerde ki-kare ve oneway anova testleri kullanılmış, $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular:

Çalışmaya dahil edilen 44 hastanın 13ü kadın, 31i erkekdi ve yaş ortalamalarının 55.07 olduğu belirlenmiştir. Hastaların çoğu Gögüs hastalıkları (%27) ve Hematoloji-Onkoloji servislerinde (%20.4) yatmakta ve gelen örneklerin 24 (%56.8)'i BAL-balgam, 10 doku, dördü yara, beşi steril vücut sıvısı ve bir örneğin de lens olduğu saptanmıştır. Çoğunda malignite gibi altta yatan (n.24,%54.5) bir faktör olan hastaların örneklerin 24'ünda direk mikroskobisinde ve Gram boyamasında, beşinin histopatolojik incelemesinde hif yapıları saptanmıştır (Tablo 1). Hastaların yedisi nötropenik olduğu, 25'ünde kateter, 23'ünün kemoterapi aldığı ve 17'sinin profilaktik antifungal tedavi aldığı saptanmıştır. Mortalite oranı %20.4 olarak belirlenmiştir. EORTC/MSG kriterlerine göre hastaların 11'i kanıtlanmış, 17'si yüksek olasılıklı, 16'sı şüpheli İnvazif Aspergilloz (İA) olarak sınıflandırılmıştır. İA tanısı olan hastaların yaş ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Şüpheli İA tanısı olan hastalarda kateter varlığı ve kemoterapi alma oranları kanıtlanmış ve olası İA tanılı hastalara göre daha düşüktür ve hiçbiri profilaktik antifungal tedavi almamıştır. Alt hastalık açısından ise kanıtlanmış İA hastaların hematolojik kanser ile birliktelik oranı diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2). İA tanısı almış tüm hastaların örnek gönderme zamanına göre dağılımları incelendiğinde en fazla vaka görülen zaman aralıkları sırasıyla; Ekim-Aralık 2018 (%36.4), Ocak-Mart 2019 (%31.8) ve Temmuz-Eylül 2018 (%18.2) olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Toplam 44 izolatın 23'ü *A. fumigatus*, 12'i *A. niger*, 6'ı *A. flavus*, ikisi *A. terreus* ve biri *A.nidulans* olarak tanımlanmıştır. A*spergillus spp.* suşların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) aralıkları amfoterisin B için 0.002-1.5 µg/ml, vorikonazol için 0.036-0.5 µg/ml, posakonazol için 0.002-0.25 µg/ml, anidulofungin için 0.002-0.032 µg/ml, ıtrakonazol 0.125-1 ve kaspofungin için 0.002-0.25 µg/ml arasında bulunmuştur (Tablo 3).

Sonuç:

Çalışmamızda *A.fumigatus* en sık izole edilen tür olmuştur. Bulaşma yoluyla ilişkili olarak sıklıkla solunum yollarında infeksiyona neden olmakta ve bu nedenle solunum örneklerinden daha sık izole edilmiştir. Tüm suşlar için vorikonazol, posakonazol, anidulofungin ve kaspofungin Amfoterisin B ve itrakonazol' e göre daha düşük MİK değerine sahip oldukları görülmüştür. Hastanemizde İA tanısı konan hasta sayısının 2018'in Temmuz ayından itibaren artış gösterdiği, Ekim-Aralık aylarında pik yaptığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, duyarlılık, antifungal.

KAYNAK:

1. De-Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group, Clin Infect Dis 2008;46(12):1813-21. http://dx.doi.org/10.1086/588660

2. C. Lass-Florl. Susceptibility testing in Aspergillus species complex. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl. 6): 49–53

Tablo 1. İA tanısı almış hastaların klinik örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirilmesi.

Tanı	Örnek Kabul Tarihi	Örnek	Direkt Mikroskopi	Histopatoloji	GM ng/ml	Suş
Kanıtlanmış İA (n: 11)	24.12.2019	Doku	Hif	Nonspesifik	0.23	*A.fumigatus*
	24.12.2019	Doku	Hif	Nonspesifik	0.40	*A.fumigatus*
	02.11.2018	Doku	Hif	Hif	-	*A.fumigatus*
	27.09.2018	Plevral s.	Hif	Class II	-	*A.fumigatus*
	30.07.2018	Doku	Hif	Hif	0.19	*A.niger*
	11.04.2019	Plevra	Hif	Hayır	0.23	*A.niger*
	27.09.2018	Doku	Hif	Hayır	-	*A.flavus*
	17.10.2018	Doku	Hif	Hif	-	*A.flavus*
	09.07.2018	Doku	Hif	Hif	0.97	*A.flavus*
	25.06.2018	Doku	Hif	İltihabi reak	-	*A.flavus*
	27.09.2018	Plevra	Hif	Class II	-	*A.terreus*
Olası İA (n:17)	22.02.2019	BAL	Hif	Class II	0.19	*A.fumigatus*
	11.02.2019	BAL	Hif	Class II	0.20	*A.fumigatus*
	24.01.2019	BAL	Hif	Class II	7.7	*A.fumigatus*
	15.01.2019	BAL	Hif	Class II	7.7	*A.fumigatus*
	19.02.2019	BAL	Hayır	Class II	0.1	*A.fumigatus*
	12.12.2018	BAL	Hif	Hif	5.8	*A.fumigatus*
	18.10.2018	BAL	Hif	Class II	-	*A.fumigatus*
	26.12.2018	BAL	Hayır	Class ıı	0.48	*A.fumigatus*
	05.11.2018	BAL	Hif	-	6.1	*A.fumigatus*
	31.12.2018	BAL	Hayır	ClassII	3.6	*A.fumigatus*
	07.12.2018	BAL	Hif	Class II	0.2	*A.niger*
	23.11.2018	BAL	Hif	Class II	0.59	*A.niger*
	08.02.2018	BAL	Hif	Class II	-	*A.niger*
	22.03.2019	BAL	Hif	Class II	5.6	*A.niger*
	14.09.2018	BAL	Hif	Clas II	-	*A.niger*
	21.02.2019	Balgam	Hif	-	-	*A.niger*
	22.02.2019	BAL	Hif	Class II	0.19	*A.flavus*
Şüpheli İA (n:16)	18.01.2019	BAL	Hayır	Class II	-	*A.fumigatus*
	04.12.2018	Yara	Hayır	-	-	*A.fumigatus*
	03.12.2018	Yara	Hayır	-	-	*A.fumigatus*
	19.02.2019	Balgam	Hayır	-	-	*A.fumigatus*
	10.12.2018	Doku	Hayır	-	-	*A.fumigatus*
	07.11.2018	Balgam	Hayır	-	-	*A.fumigatus*
	05.11.2018	BAL	Hayır	-		*A.fumigatus*
	06.12.2018	Doku	Hayır	Nonspesifi	-	*A.fumigatus*
	15.04.2019	Yara	Hayır	Nonspesifi	-	*A.fumigatus*
	08.01.2019	BAL	Hayır	Class II	-	*A.niger*
	17.02.2019	Yara	Hayır	-	-	*A.niger*
	19.09.2018	OKS	Hayır	-	-	*A.niger*
	29.08.2018	BAL	Hayır	-	-	*A.niger*
	30.01.2019	OKS	Hayır	-	-	*A.flavus*
	22.11.2018	Apse	Hayır	-	-	*A.terreus*
	10.01.2019	Balgam	Hayır	-	0.48	*A.nidulans*

Tablo .Kanıtlanmış, Olası, Şüpheli İA tanısı almış ve kontrol grubu hastaların demografik özelliklerinin değerlendirilmesi

	Kanıtlanmış	**Olası**	**Şüpheli**	**Kontrol Grubu**	x^2	***p***
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Cinsiyet						
Erkek	8 (72.7)	13 (76.5)	10 (62.5)	14 (73.7)	0.89	0.82
Kadın	3 (27.3)	4 (23.5)	6 (37.5)	5 (26.3)		
Yaş ortalaması	57.18±11.98 (min:11,max:70) Median:59.0	54.82±14.76 (min:11,max:76) Median:55.0	51.62±19.07 (min:4,max:75) Median:55.5	38.73±17.83 (min:6,max:87) Median:35.0	F:4.155*	**0.01**
Nötropeni						
Var	3 (27.3)	4 (23.5)	0 (0.0)	3 (15.8)	4.84	0.184
Yok	8 (72.7)	13 (76.5)	16 (100)	16 (84.2)		
Kateter varlığı						
Var	9 (81.8)	13 (76.5)	3 (18.8)	9 (47.4)	15.22	**0.002**
Yok	2 (18.2)	4 (23.5)	13(81.2)	10 (52.6)		
Kemoterapi alma durumu						
Alıyor	7 (63.6)	14 (82.6)	2 (12.5)	14 (73.7)	19.88	**<0.001**
Almıyor	4 (36.4)	3 (17.6)	14 (87.5)	5 (26.3)		
Profilaktik Antifungal tedavi alımı						
Almış	7 (63.6)	10 (58.8)	0 (0.0)	5 (26.3)	17.47	**<0.001**
Almamış	4 (36.4)	7 (41.2)	16 (100)	14 (73.7)		
Mortalite						
Var	4 (73.7)	5 (29.4)	0 (0.0)	6 (31.6)	6.88	0.757
Yok	7 (36.4)	12 (70.6)	16 (100)	13 (68.4)		
Alt hastalık						
Hematolojik kanserler	7 (63.6)	3 (17.6)	0 (0.0)	6 (31.6)	45.43	**<0.001**
Diğer kanserler	3 (27.3)	7 (41.2)	0 (0.0)	1 (5.3)		
KOAH	0 (0.0)	3 (17.6)	2 (12.5)	1 (5.3)		
HIV	0 (0.0)	1 (5.9)	0 (0.0)	1 (5.3)		
Diğerleri	1 (9.1)	3 (17.6)	10 (62.5)	10 (52.6)		
Yok	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (25.0)	0 (0.0)		
Toplam	**11**	**17**	**16**	**19**		

*: *karşılaştırma için oneway anova testi kullanılmıştır*

Tablo 3. İzole edilen *Aspergillus* suşların antifungal duyarlılık test sonuçları (µg/ml)

Antifungal	*A.fumigatus* (n:23)			*A.niger* (n:12)			*A.flavus* (n:6)	*A.terreus* (n:2)	*A.nidulans*(n:1)
	MIK aralıkları	MIK_{50}	MIK_{90}	MIK aralıkları	MIK_{50}	MIK_{90}	MIK aralıkları	MIK aralıkları	MIK değeri
Amfoterisin B	0.016-1.5	0.125	0.50	0.125-0.5	0.125	0.25	0.25-0.5	0.25-0.50	0.002
Vorikonazol	0.064-0.25	0.125	0.125	0.036-0.25	0.125	0.25	0.064-0.5	0.064-0.125	0.125
Posakonazol	0.002-0.25	0.032	0.125	0.002-0.25	0.064	0.125	0.032-0.25	0.016-0.02	0.032
Anidulafungin	0.002-0.032	0.002	0.032	0.002-0.02	0.002	0.008	0.002-0.006	0.002-0.02	0.002
İtrakonazol	0.125-1	1	1	0.125-1	1	1	0.25-1	0.25-0.25	0.125
Kaspofungin	0.016-0.25	0.032	0.125	0.002-0.25	0.008	0.016	0.008-0.064	0.032-0.125	0.032