

KLİNİK ASPERGILLUS İZOLATLARI: TÜR DAĞILIMI VE ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Yasemin ÖZ¹, Filiz AKŞİT¹, Müge ASLAN¹, Nilgün KAŞİFOĞLU¹, Nuri KİRAZ²

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Aspergillus türleri tüm dünyada yaygın olarak bulunmakla birlikte, özellikle immüdüştükün hastalar için invazif *Aspergillus* enfeksiyonları önemli bir problemdir. Bu çalışmada, hastanemizde izole edilmiş *Aspergillus* izolatlarının tür dağılımı ve antifungal duyarlılığı analiz edilmiştir. Toplam 110 izolat analize alınmış ve bunların % 60'ı *Aspergillus fumigatus*, % 21'i *Aspergillus niger*, % 9'u ise *Aspergillus flavus* olarak tanımlanmıştır. İzolatların % 54'ü Göğüs Hastalıkları Servisi hastalarından ve % 75'i solunum yolu örneklerinden elde edilmiştir. Antifungal duyarlılık testi için E-test yöntemi kullanılmış ve minimal inhibitör konsantrasyon aralıkları amfoterisin B için 0.012-32 µg/ml, itraconazol için 0.008-128 µg/ml ve vorikonazol için 0.023-8 µg/ml olarak bulunmuştur. Test edilen üç antifungal arasında en etkili vorikonazol olmuştur. Sonuç olarak invazif aspergillozların en sık etkeni *A.fumigatus*'tur ve vorikonazol amfoterisin B'ye güvenilir bir alternatif olabilir.

Anahtar sözcükler: antifungal duyarlılık, *Aspergillus*, tür dağılımı, vorikonazol

SUMMARY

Clinical *Aspergillus* Isolates: Evaluation of Species Distribution and Antifungal Susceptibility Results

Although *Aspergillus* spp. are widespread in the world, invasive *Aspergillus* infections are important problems for especially immunocompromised patients. In this study, the species distribution and antifungal susceptibility test results of *Aspergillus* spp. isolated in our hospital were analyzed. A total of 110 isolates were included and 60 % of them were *Aspergillus fumigatus*, 21 % *Aspergillus niger* and 9 % *Aspergillus flavus*. Of the isolates, 54 % were obtained from the patients of Department of Chest Diseases and 75 % were isolated from respiratory tract specimens. E-test method was performed for antifungal susceptibility testing and minimal inhibitory concentration ranges were found as 0.012-32 µg/ml for amphotericin B, 0.008-128 µg/ml for itraconazole and 0.023-8 µg/ml for voriconazole. The most potent agent was voriconazole among three antifungals tested. Consequently, the most common agent of invasive aspergillosis is *A. fumigatus* and voriconazole may be a reliable alternative to amphotericin B.

Keywords: antifungal susceptibility, *Aspergillus*, species distribution, voriconazole

GİRİŞ

Aspergillus cinsi mantarlar toprakta, bitkilerde ve çürüyen organik maddeler üzerinde bulunur, insan çevresindeki en yaygın küf mantarları arasında yer alırlar. Çevresel sporların solunması ile oluşan invazif *Aspergillus* enfeksiyonu özellikle immüdüştükün bireyler için morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ciddi bir tehdittir. Kanser nedeniyle ölen hastalardaki fungal

enfeksiyonların % 30'undan *Aspergillus* sorumlu tutulmakta, mortalite oranının yaklaşık % 85 olduğu ve tedavi ile % 50 civarına düştüğü bildirilmektedir⁽⁷⁾. Klinik örneklerden en sık izole edilen türler başta *Aspergillus fumigatus* olmak üzere *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus*'tur⁽⁷⁾. Flukonazol gibi iyi bilinen bazı antifungallere direçli olduklarından, tedavide sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle antifungal tedavinin doğru şekilde yönlendirile-

İletişim adresi: Yasemin Öz, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ESKİŞEHİR

Tel: (0222) 239 29 79/4550, GSM: (0530) 560 58 74

e-posta: dryaseminoz@gmail.com

Alındığı tarih: 26.02.2012, Yayına kabul: 18.04.2012

bilmesi için duyarlılık testleri önemlidir. Bu amaçla Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen referans yöntem mikro ya da makro sıvı dilüsyon testidir. Bunun yanında ticari olarak geliştirilmiş disk difüzyon ve E-test gibi agar bazlı yöntemler de klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle E-test yöntemi, ilaçların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini de kolaylıkla saptayabilmesi açısından oldukça kullanışlıdır ve referans yöntemle yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda oldukça yüksek uyum oranları elde edildiği bildirilmektedir^(7,10,14).

Bu çalışmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında klinik örneklerden izole edilmiş *Aspergillus* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2003 - Ocak 2012 tarihleri arasında laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *Aspergillus* cinsi küf mantarları ve bunların antifungal duyarlılık sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların identifikasyonunda geleneksel yöntemler kullanılmış; koloni rengi ve morfolojisi, üreme hızı, mikroskopik özellikleri (konidili başların biçimi ve rengi, sterigmata sayısı, vezikül şekli, konidyoforların yapısı, hücre hücrelerinin varlığı ve şekli) dikkate alınmıştır. Bir hastada aynı türe ait ardışık üreme varlığında, birden fazla kültür plağın- dan saf olarak aynı tür izole edildiğinde ya da eş zamanlı direkt mikroskopik incelemede

kültürde üreyen mantarla uyumlu bulgular gözlemlendiğinde (septalı hif yapıları) bu izolat- lara antifungal duyarlılık testi uygulanmıştır. Aynı hastanın birden fazla örneğinden aynı etken tekrar izole edilmişse, sadece ilk izolat değerlendirmeye alınmıştır. Antifungal duyarlılık testi üretici önerilerine göre itrakonazol, vorikonazol ve amfoterisin B E-test stripleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) kullanılarak yapılmıştır. Antifungal duyarlılık test sonuç- larının değerlendirilmesinde itrakonazol ve vorikonazol için belirgin üreme inhibisyonun- un gözlemlendiği elips ile E-test sribinin kesiş- tiği, amfoterisin B için üremenin tamamen engellendiği elips ile sribin kesiştiği nokta MİK değeri olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Belirtilen dönemde toplam 334 klinik örnekten küf mantarı izole edilmiştir. Bunların 194'ü (% 58) *Aspergillus* cinsine ait mantar tür- lerinden oluşmuştur ve tekrarlayan izolasyon- lar dışlandığında 110 izolat değerlendirmeye alınmıştır. *Aspergillus* spp. izole edilen örnekler sıklıkla alt solunum sistemi kaynaklıdır (Tablo 1). En sık izole edilen tür *A.fumigatus* olmuş (% 60), onu *A.niger* takip etmiştir. Etkenlerin izole edildikleri hastaların buldukları servis- lerin dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre *Aspergillus* spp. izole edilen hastalar genellikle Göğüs Hastalıkları Servisinde yatmaktaydı. Antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre en düşük MİK değerleri sergileyen antifungal vorikonazol olmuştur ve amfoterisin B için elde edilen yüksek MİK değerleri dikkat çekici bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 1. *Aspergillus* türlerinin klinik örneklere göre dağılımı [n].

Klinik örnekler	Aspergillus türleri							Toplam
	fumigatus	niger	flavus	terreus	candidus	versicolor	spp.	
Balgam	36	4	5	0	1	1	0	47
Diğer solunum örnekleri	19	10	1	2	1	0	2	35
Yara örnekleri	7	3	4	1	0	0	1	16
Steril vücut sıvıları	2	0	0	0	0	0	2	4
Kulak örnekleri	1	5	0	0	0	0	0	6
Göz örnekleri	1	1	0	0	0	0	0	2
Toplam	66	23	10	3	2	1	5	110

Tablo 2. *Aspergillus* spp. izole edilen hastaların servislere göre dağılımı [n].

İzolatlar	Göğüs Hastalıkları	İç Hastalıkları	Çocuk Hastalıkları	Hematoloji	KBB	Diğer*	Toplam (%)
<i>A.fumigatus</i>	41	7	2	7	1	8	66 (60)
<i>A.niger</i>	9	1	0	1	6	6	23 (21)
<i>A.flavus</i>	5	0	4	1	0	0	10 (9.1)
<i>A.terreus</i>	0	0	1	0	0	2	3 (2.7)
<i>A.candidus</i>	2	0	0	0	0	0	2 (1.8)
<i>A.versicolor</i>	0	0	0	1	0	0	1 (0.9)
<i>Aspergillus</i> spp.	2	1	1	0	0	1	5 (4.5)
Toplam	59	9	8	10	7	17	110

*Diğer; Anestezi ve Reanimasyon, Beyin Cerrahi, Dermatoloji, Genel Cerrahi, Göğüs Kalp Damar Cerrahi, Göz Hastalıkları, Plastik Cerrahi servisleri.

Tablo 3. E-test yöntemi ile antifungal duyarlılık test sonuçları ($\mu\text{g/ml}$).

İzolatlar (n)	Amfoterisin B			İtrakonazol			Vorikonazol		
	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralıkları	MİK ₅₀	MİK ₉₀
<i>A.fumigatus</i> (66)	0.012-32	0.5	8	0.008-32	1	8	0.023-0.94	0.125	0.38
<i>A.niger</i> (23)	0.023-4	0.38	1	0.125-128	4	32	0.064-8	0.25	0.75
<i>A.flavus</i> (10)	0.094-32	4	32	0.047-32	0.47	12	0.094-1	0.25	0.75
<i>A.terreus</i> (3)	0.047-0.5	-	-	0.008-1.5	-	-	0.125	-	-
<i>A.candidus</i> (2)	1-1.5	-	-	6	-	-	0.047-0.75	-	-
<i>A.versicolor</i> (1)	8	-	-	0.25	-	-	0.125	-	-
<i>Aspergillus</i> spp. (5)	0.094-32	-	-	0.38-32	-	-	0.023-0.25	-	-
Tüm <i>Aspergillus</i> spp. (110)	0.012-32	0.5	3	0.008-128	1.5	8	0.023-8	0.125	0.38

TARTIŞMA

Aspergillus cinsinde yer alan mantarlar invazif küf infeksiyonlarının en sık nedenleridir. Çünkü *Aspergillus* türleri çevrede, toprakta, suda yaygın olarak bulunurlar ve sporları kolaylıkla inhale edilerek invazif pulmoner hastalığa neden olabilirler. Bu sporlar sağlıklı bireylerde immün sistem tarafından hızla bertaraf edildiğinden herhangi bir infeksiyona neden olmazlar. Ancak, özellikle ağır kemoterapi rejimlerinin uygulandığı hastalar ile kemik iliği ya da solid organ transplant alıcıları bu infeksiyonlar açısından yüksek risk altındaki hasta grubunu oluşturmaktadırlar. Küf mantarlarında bulaşma, hemen daima çevreye yayılan sporların inhalasyonu ile gerçekleştiğinden, infeksiyonlar primer olarak bu sporların giriş yolları olan akciğerler ya da sinüsler ile ilişkilidir. Bu infeksiyonlardaki inceleme materyali, infeksiyon bölgesi ile ilişkili olarak sinüs ya da solunum örnekleri ve genellikle de elde edilme kolaylığı nedeniyle balgamdır. Bu bilgilerle uyumlu olarak, laboratuvarımızda *Aspergillus* spp. izole edilen klinik örneklerin çoğunluğunu balgam ve BAL gibi solunum

yolu örnekleri ve bu örneklerin kaynağını da Göğüs Hastalıkları Servisinde yatmakta olan hastalar oluşturmuştur.

Belirtilen dönemde izole edilen *Aspergillus*'ların % 90'ını *A.fumigatus*, *A.flavus* ve *A.niger* oluşturmuştur. Bunun yanında, solunum yolu örneklerinde baskın tür *A.fumigatus* olduğu halde, yara (doku) örneklerinde *A.flavus*, kulak örneklerinde ise *A.niger*'in yüksek oranları dikkat çekmiştir. Birçok epidemiyolojik çalışmada da invazif infeksiyonlardan sıklıkla izole edilen türler *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger* ve *A.terreus*; en sık olanı da *A.fumigatus* olarak bildirilmiştir^(2,11). Otomikoz olarak da adlandırılan dış kulağın mantar türlerince oluşturulan infeksiyonlarında ise, sıklıkla izole edilen etken olarak *Aspergillus* türleri bildirilmekte ve onların başında da *A.niger* gelmektedir^(1,4,5,8). *Aspergillus* türlerinin hızlı üremesi ve çok miktarda, kuru, küçük, kolayca aerosolleşebilen sporlarının çevreye saçılması, insanların kolayca kolonize olmasına neden olmaktadır. *A.niger*'in diğer türlere göre dış kulaktan daha sık izole edilmesine neden olarak da, dış kulaktaki fungustatik etkili salgılara muhtemelen daha dirençli olması gösteril-

mektedir⁽¹³⁾. *A.flavus*'un bronkopulmoner *Aspergillus* infeksiyonlarının yaklaşık % 10'undan sorumlu olduğunu ve primer kutanöz aspergilloz ile komşuluk yoluyla gelişen kutanöz aspergillozda baskın tür olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Ayrıca travma ya da cerrahi sonrası gelişen kemik ve yumuşak doku infeksiyonlarından da sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir⁽⁶⁾.

Bu çalışmada klinik *Aspergillus* izolatlarının antifungal duyarlılık sonuçları da değerlendirilmiştir. Buna göre en düşük MİK aralıklarına sahip ve en etkili görünen antifungal vorikonazol olmuştur. Değerlendirilen bütün türler için benzer vorikonazol MİK aralıkları gözlenmiştir. Ancak, sınırlı sayıda izolat bulunmakla birlikte, *A.flavus* izolatlarına karşı hem amfoterisin B hem de vorikonazol için *A.fumigatus* izolatlarından daha yüksek MİK değerleri elde edilmiştir. Aksine itrakonazol MİK değerleri *A.flavus* izolatlarında *A.fumigatus* ve *A.niger*'den daha düşük bulunmuştur. Rudramurthy ve ark.⁽¹²⁾'nin 208 *A.flavus* izolatının antifungal duyarlılığını değerlendirdikleri çalışmalarında izolatların % 95.1'i için vorikonazol MİK'leri ≤ 2 µg/ml bulunduğu halde, *A.flavus* izolatlarının *A.fumigatus* izolatlarından daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada en yüksek MİK değerleri amfoterisin B ile elde edilmiş ve izolatların $> \% 90$ 'ı için amfoterisin B MİK değerleri ≥ 2 µg/ml bulunmuştur. Benzer sonuçlar Cuenca-Estrella ve ark.⁽³⁾ tarafından da bildirilmiş ve ayrıca *A.flavus* için itrakonazol MİK'leri *A.fumigatus*'a benzer, *A.niger*'den daha düşük bulunmuştur.

Pfaller ve ark.⁽⁹⁾ dört triazol antifungal ile amfoterisin B'nin etkinliğini 198 *Aspergillus* türüne karşı değerlendirmişler ve MİK aralıklarını amfoterisin B için 0.12-4 µg/ml, itrakonazol için 0.25-8 µg/ml ve vorikonazol için 0.06-8 µg/ml; sırasıyla MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini ise amfoterisin B için 1 ve 2 µg/ml, itrakonazol için 1 ve 2 µg/ml, vorikonazol için 0.25-0.5 µg/ml olarak saptamışlardır. *A.fumigatus* izolatlarına karşı MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise amfoterisin B için 1 ve 1 µg/ml, itrakonazol için 1 ve 2 µg/ml, vorikonazol için 0.25 ve 0.5 µg/ml bulunmuştur. Sonuçta vorikonazolün de içinde bulunduğu yeni jenerasyon azol antifungallerin *Aspergillus* türlerine karşı daha etkili bulunduğu bildiril-

miştir. Bu bilgiler sonuçlarımızla benzer olmakla birlikte, gözlemediğimiz daha geniş MİK aralığının uyguladığımız duyarlılık testi yöntemiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, klinik örneklerden izole edilen küf mantarları arasında ilk sırada *Aspergillus* spp. yer almaktadır ve en sık izole edilen tür *A.fumigatus*'tur. Bulaşma yoluyla ilişkili olarak sıklıkla solunum yollarında infeksiyona neden olmakta ve bu nedenle solunum örneklerinden daha sık izole edilmektedir. İn-vitro antifungal duyarlılık testlerinde vorikonazol, amfoterisin B ve itrakonazolden çok daha etkili bulunmuştur. Bu durumda, düşük MİK değerleri ve nispeten düşük yan etki potansiyeli nedeniyle vorikonazolün invazif *Aspergillus* infeksiyonlarının tedavisinde amfoterisin B'ye önemli bir alternatif olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aneja KR, Sharma C, Joshi R. Fungal infection of the ear: a common problem in the northeastern part of Haryana, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74(6):604-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.03.001>
PMid:20347163
2. Bodey G, Bueltmann B, Duguid W et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy study, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(2):99-109.
PubMedPMID:1396746
3. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Activity profile in vitro of micafungin against Spanish clinical isolates of common and emerging species of yeasts and molds, *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):2192-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01543-08>
PMid:19223630 PMCid:2681500
4. Değerli K, Akçalı S, Sezgin C, Ünlü H, Özbakaloğlu B. Manisa ve çevresinde soyutlanan otomikoz etkenleri, *İnfeksiyon Derg* 2002;16(2):211-3.
<http://infeksiyon.dergisi.org/text.php3?id=179>
5. Jia X, Liang Q, Chi F, Cao W. Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy, *Mycoses* 2011;doi: 10.1111/j.1439-507.2011.02132.x.
PubMed PMID: 21999222
6. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus

- Aspergillus* species of significance, *Mycoses* 2009;52(3):206-22.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x>
PMid:19207851
7. Lass-Flörl C, Perkhofer S. In vitro susceptibility-testing in *Aspergillus* species, *Mycoses* 2008; 51(5):437-46.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01510.x>
PMid:18422914
 8. Ozcan KM, Ozcan M, Karaarslan A Karaarslan F. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, aetiology and therapy, *J Laryngol Otol* 2003;117(1):39-42.
PubMed PMID: 12590854
<http://dx.doi.org/10.1258/002221503321046621>
 9. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, SENTRY Participants Group. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(4):1032-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.4.1032-1037.2002>
PMid:11897586 PMCid:127116
 10. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of E test and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs, *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3359-61.
PubMed PMID: 10970383; PubMed Central PMCID: PMC87386.
 11. Rolston K. Overview of systemic fungal infections, *Oncology (Williston Park)* 2001;15(11 Suppl 9):11-4.
PubMed PMID: 11757845
 12. Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Geertsens E, Mouton JW, Meis JF. In vitro activity of isavuconazole against 208 *Aspergillus flavus* isolates in comparison with 7 other antifungal agents: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71(4):370-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.006>
PMid:21937186
 13. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW. On the safety of *Aspergillus niger*-a review, *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59(4-5):426-35.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>
PMid:12172605
 14. Szekeley A, Johnson E, Warnock D. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of moulds, *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1480-3.
PMid:10203509 PMCid:84808