

İNVAZİF ASPERGİLLOZLU OLGULARDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS* SPP. SUŞLARININ ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES OF *ASPERGILLUS* SPP. STRAINS ISOLATED FROM INVASIVE ASPERGILLOSIS CASES

Şaban GÜRCAN¹, Melek TIKVEŞLİ¹, Canan ERYILDIZ¹, Canan EVCI², Beyza ENER²

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne. (sabangurcan@trakya.edu.tr)

²Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Çevrede ve hastane ortamında yaygın olarak bulunan *Aspergillus* türleri, özellikle bağışıklık sistemi yetersiz ya da baskılanmış hastalarda ciddi morbidite ve mortalite etkenidir. Bu retrospektif çalışmada, hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden etken olarak izole edilen *Aspergillus* spp. suşlarının antifungal duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2002-Ekim 2007 tarihleri arasında mantar enfeksiyonu şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen 569 hastaya ait toplam 678 örnek (420 solunum yolu örneği, 202 steril vücut sıvısı örneği, 56 biyopsi/doku örneği) dahil edilmiştir. Örnekler, beyin kalp infüzyonlu kanlı agar ve Sabouraud dekstroz agara ekilerek 25°C ve 35°C'de inkübe edilmiş; ayrıca tüm örneklerden hazırlanan Gram ve Giemsa boyalı preparatlar direkt mikroskopik olarak incelenmiştir. Küf mantarı üreyen örneklerde tanımlama konvansiyonel yöntemlerle yapılmış; olgularda "invazif aspergilloz" tanımı ise, Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Kuruluşu, İnvazif Fungal Enfeksiyon Çalışma Grubunun aspergilloz tanı kriterlerine göre yapılmıştır. Çalışmada, tümünde malignite gibi altta yatan bir faktör olan 12 (%2.1) olgunun klinik örneklerinden (9 alt solunum yolu, birer asit, beyin biyopsisi ve plevral sıvı örneği) *Aspergillus* spp. izole edilmiş ve bu suşlar *A.fumigatus* (n= 8), *A.flavus* (n= 2) ve *A.niger* (n= 2) olarak tanımlanmıştır. İzolatların, kaspofungin, vorikonazol, itrakonazol ve amfoterisin B'ye karşı duyarlılıkları buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle, posakonazole karşı duyarlılıkları ise E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile araştırılmıştır. *Aspergillus* spp. suşlarında en düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri kaspofungin ve posakonazol için (≤ 0.125 µg/ml); en yüksek MİK değerleri ise amfoterisin B için (≥ 1 µg/ml) tespit edilmiştir. Vorikonazol ve itrakonazol için, biri hariç tüm suşlarda MİK değerleri ≤ 0.5 µg/ml saptanırken, sadece bir *A.niger* suşunda itrakonazol için 2 µg/ml değeri elde edilmiştir. Diğer türlerin sayısının az olması nedeniyle, MİK₅₀ değerleri sadece *A.fumigatus* için hesaplanmış ve *A.fumigatus* için en yüksek MİK₅₀ değeri amfoterisin B (2 µg/ml) için saptanırken, en düşük MİK₅₀ değerleri sırasıyla; posakonazol (0.064 µg/ml), kaspofungin (0.064 µg/ml), itrakonazol (0.25 µg/ml) ve vorikonazol (0.25 µg/ml) için belirlenmiştir. Sonuç olarak, suş sayımızın az olmasına rağmen, kaspofungin ve posakonazol için en düşük MİK değerlerinin tespit edilmiş olması, bu yeni antifungallerin hastanemizde aspergillozlu olguların tedavisinde akılda tutulması gereken seçenekler olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: *Aspergilloz*, *Aspergillus* spp., antifungal duyarlılık, mikrodilüsyon.

ABSTRACT

Aspergillus species found abundantly in the outer environment and hospital setting may lead to serious morbidity and mortality particularly in patients with suppressed immunity. This retrospective study was aimed to investigate the antifungal susceptibilities of *Aspergillus* spp. isolated from aspergillosis cases being hospitalized. *Aspergillus* spp. isolated from samples of the patients with suspected fungal infections between January of 2002 and October of 2007, were investigated. A total of 678 samples (420 lower respiratory tract, 202 sterile body fluids, and 56 biopsy/tissue specimens) from 569 patients were included in the study. The samples were incubated in 25°C and 35°C on brain-heart-infusion agar supplemented with blood and on Sabouraud dextrose agar. Gram and Giemsa stained samples were also examined by microscopy. Mold type of fungi were identified by conventional techniques. "Invasive aspergillosis" was described according to criteria of Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *A.fumigatus* (n= 8), *A.flavus* (n= 2) and *A.niger* (n= 2) were isolated from 12 patients' samples (2.1%), 9 of them were lower respiratory tract and one of each was ascid, brain biopsy and pleural fluid specimens. All of those patients have had an underlying diseases such as malignancy. The susceptibility of the isolates to caspofungin, voriconazole, itraconazole and amphotericin B was tested by broth microdilution susceptibility testing and to posaconazole by E-test (AB Biodisk, Sweden). The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) (≤ 0.125 µg/ml) values were detected for caspofungin and posaconazole for *Aspergillus* spp., however, the highest MIC values were detected for amphotericin B (> 1 µg/ml). MIC values of the all strains except one, were detected as ≤ 0.5 µg/ml for voriconazole and itraconazole. In one *A.niger* strain itraconazole MIC value was 2 µg/ml. Since the number of other species was low, MIC₅₀ value was determined only for *A.fumigatus* strains and it was found that the highest MIC₅₀ value was for amphotericin B (2 µg/ml) and the lowest MIC₅₀ values were for posaconazole (0.064 µg/ml), caspofungin (0.064 µg/ml), itraconazole (0.25 µg/ml) and voriconazole (0.25 µg/ml). Since caspofungin and posaconazole revealed the lowest MIC values, they should be taken into consideration in choice of therapy of aspergillosis cases in our hospital.

Key words: Aspergillosis, *Aspergillus* spp., antifungal susceptibility, microdilution.

GİRİŞ

Çevrede ve hastane ortamlarında yaygın bir şekilde bulunan *Aspergillus* cinsi küflerin özellikle solunum yolu ile teması kaçınılmazdır^{1,2}. Solunumla alınan sporlar, bağışıklık sistemi yetersiz ya da baskılanmış bireylerde ciddi enfeksiyonlara yol açar^{3,4}. Bu hastalarda tedaviye başlamakta gecikilirse ölüm kaçınılmaz olabildiği gibi bazen zamanında başlanan antifungal tedavilerle bile hastalar kurtarılamayabilir^{4,5}.

Aspergillus türlerinin insanda en sık enfeksiyon oluşturduğu bölge akciğerlerdir⁶. Hastaneye kabul edilen hastalara oranlandığında, invazif pulmoner aspergilloz insidansı 0.17-0.40 arasında bildirilmiştir⁷. Solunum yolu aspergillozları sadece akciğer tutulumu şeklinde değil, allerjik bronkopulmoner aspergilloz veya sinüzit tablosu şeklinde de görülebilir⁶. Bunların dışında invazif enfeksiyonlar, mantarın perikardium, merkezi sinir sistemi ve diğer bölgelere yayılması veya karaciğer nakli gibi girişimler sırasında doğrudan peritona yerleşmesiyle de ortaya çıkabilir⁸.

Aspergilloz olgularında kültürün duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür; ancak yine de antifungal duyarlılık çalışmalarına imkan vermesi açısından yapılması yararlıdır. Rutin uygulamada küf mantarları için antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önerilmemektedir⁹.

Bu çalışmada, son altı yıl içinde hastanemizde yatmakta olan hastalara ait klinik örneklerden etken olarak izole edilen *Aspergillus* spp. suşlarının antifungallere karşı duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu retrospektif çalışmaya, Ocak 2002-Ekim 2007 döneminde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatmakta olan 569 hastadan alınan ve mantar yönünden araştırılması amacıyla Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarına gönderilen toplam 678 örnek (420 solunum yolu örneği, 202 steril vücut sıvısı örneği, 56 biyopsi/doku örneği) dahil edildi. Örnekler, beyin kalp infüzyonlu kanlı agar ve Sabouraud dekstroza ekilerek 25°C ve 35°C'de inkübe edildi⁵. Ayrıca tüm örneklerden direkt preparat hazırlanarak Gram ve Giemsa ile boyandı ve lökositler, epitel ve mantar elemanlarının varlığı yönünden araştırıldı.

Klinik bulgularla birlikte radyolojik olarak akciğerde infiltrasyon veya mantar topu görünümü olan, aspergilloz için risk faktörlerinden en az birine sahip olan ve alt solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* spp. üreyen hastalarda, mantar dışı herhangi bir enfeksiyon kanıtı olmadığında ya da normalde steril olan vücut bölgelerinde klinik ve radyolojik olarak enfeksiyon bulgusu ve steril işlemlerle alınan örneklerde *Aspergillus* spp. üremesi olduğunda, olgu aspergilloz olarak tanımlandı^{5,10}.

Küf mantarı üreyen örneklerde mantarın tanımlanması; koloni görünümü, laktofenollü pamuk mavisi ile hazırlanan preparatlardaki hif ve spor yapılarının mikroskopik görünümü ve 25°C, 35°C ve 44°C'de üreme hızlarına göre yapıldı⁴.

Aspergillus spp. olarak tanımlanan izolatların antifungal duyarlılık testleri buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirildi¹¹. Mikroplaklar 35°C'de inkübe edilerek 48 saat sonra duyarlılık test sonuçları değerlendirildi. Suşların posakonazole karşı duyarlılıkları ise, E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Kalite kontrol suşu olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, tümü malignansili ve 7'si erkek olan 12 hastanın (%2.1), çoğu solunum yollarına ait (9/12) örneklerinden *Aspergillus* spp. izole edilmiş ve bu suşların 8'i *A.fumigatus*, 2'si *A.flavus*, 2'si *A.niger* olarak tanımlanmıştır (Tablo I).

Aspergillus spp. suşlarının antifungal duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde; en düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri kaspofungin ve posakonazol için; en yüksek MİK değerleri ise amfoterisin B için tespit edilmiştir (Tablo I). Vorikonazol ve itrakonazol için, biri hariç tüm suşlarda MİK değerleri ≤ 0.5 µg/ml saptanırken, sadece bir *A.niger* suşunda itrakonazol için 2 µg/ml değeri elde edilmiştir (Tablo I).

Diğer türlerin sayısının az olması nedeniyle, MİK₅₀ değerleri sadece *A.fumigatus* için hesaplanmış ve *A.fumigatus* için en yüksek MİK₅₀ değeri amfoterisin B (2 µg/ml) için saptanırken, en düşük MİK₅₀ değerleri sırasıyla; posakonazol (0.064 µg/ml), kaspofungin (0.064 µg/ml), itrakonazol (0.25 µg/ml) ve vorikonazol (0.25 µg/ml) için belirlenmiştir.

Tablo 1. *Aspergillus* Türlerinin Dağılımı, İzole Edildikleri Örnekler ve Antifungalere Karşı Duyarlılıkları

Olgu no	Örnek tipi	<i>Aspergillus</i> türü	Antifungal MIK değeri (µg/ml)				
			İtrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Kaspofungin	Amfoterisin B
1	Asit	<i>A.fumigatus</i>	0.25	0.25	0.064	0.125	2
2	Beyin dokusu	<i>A.fumigatus</i>	0.5	0.5	0.064	0.064	2
3	Plevral sıvı	<i>A.fumigatus</i>	0.5	0.125	0.064	0.064	2
4	BAL	<i>A.fumigatus</i>	0.25	0.25	0.064	0.064	2
5	BAL	<i>A.fumigatus</i>	0.25	0.5	0.064	0.064	1
6	BAL	<i>A.fumigatus</i>	0.25	0.25	0.064	0.064	1
7	BAL	<i>A.fumigatus</i>	0.5	0.25	0.064	0.064	2
8	TTA	<i>A.fumigatus</i>	0.25	0.5	0.032	0.064	1
9	Balgam	<i>A.flavus</i>	0.25	0.5	0.125	0.064	4
10	Balgam	<i>A.flavus</i>	0.25	0.25	0.064	0.064	2
11	BAL	<i>A.niger</i>	2	0.5	0.125	0.064	1
12	AAB	<i>A.niger</i>	0.5	0.5	0.25	0.064	1

BAL: Bronkoalveoler lavaj, TTA: Transtrakeal aspirat, AAB: Akciğer ince iğne aspirasyon biyopsisi, MIK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

TARTIŞMA

Aspergillus türleri, bağışıklık sistemi zayıf/baskılanmış hastalarda çoğunlukla akciğer enfeksiyonlarına neden olmasının yanı sıra, doğrudan inokülasyonlar yoluyla endokardit, paranazal sinüs enfeksiyonu, keratit, endoftalmite, otomikoz, menenjit, osteomyelit ve onikomikoz gibi çok çeşitli enfeksiyonlara da neden olabilirler^{4,12,13}. Hastanemizde yatan hastalarda enfeksiyon etkeni olan *Aspergillus* spp. suşlarının çoğunun da solunum yolu örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Tablo I). Daha önce yayınlanan çalışmamızda, solunum yolu örneklerinden etken olarak *Aspergillus* spp. izolasyonu yapılan olgulardan yedisinin klinik ve epidemiyolojik özellikleri ile ilgili verilerimiz tartışılmıştır⁵. Ancak o dönemde izolatların antifungal duyarlılıkları çalışılmamış ve duyarlılık verilerinin sunumu, daha sonraki yıllarda izole edilen *Aspergillus* suşlarının da çalışmaya eklenmesiyle bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca, yaşları 15-60 arasında değişen ve hematoloji ve onkoloji servislerinde yatmakta olan hastalarda, akut lösemi ve akciğer kanseri gibi altta yatan hastalıklar mevcut olup, tedavilerinde klasik amfoterisin B, kaspofungin ve itrakonazol gibi antifungaller kullanılmıştır⁵.

İnvazif aspergillozda, *A.fumigatus* başta olmak üzere *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus* ve *A.nidulans* türleri etken olarak izole edilir¹⁴. Bizim olgularımızdan etken olarak izole edilen *Aspergillus* spp. suşlarının da çoğunu (8/12; %66.7) *A.fumigatus* oluşturmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin dağılımı; *A.flavus* %33, *A.niger* %25, *A.fumigatus* %17, *A.versicolor* %8 olarak belirlenmiştir⁴.

İnvazif pulmoner aspergilloz olgularının tedavisinde 1992 yılına kadar amfoterisin B kullanılırken, sonraki yıllarda seçenekler daha da artmış ve lipozomal amfoterisin B, vorikonazol, kaspofungin ve mikafungin gibi yeni antifungaller de tedavide kullanılmaya başlanmıştır^{6,15-17}. İn vitro testlerde *Aspergillus* türlerinin genellikle amfoterisin B ve itrakonazol için düşük MİK değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir^{6,18}. Ülkemizde 32 *Aspergillus* izolatıyla yapılan bir mikrodilüsyon duyarlılık çalışmasında, MİK değerleri amfoterisin B için 0.125-2 µg/ml (MİK₅₀= 0.25 µg/ml), itrakonazol için 0.125-16 µg/ml (MİK₅₀= 1 µg/ml) ve vorikonazol için 0.03-1 µg/ml (MİK₅₀= 0.5 µg/ml) olarak saptanmıştır¹⁹. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, bizim suşlarımızın MİK₅₀ değerleri vorikonazol için aynı değerlerde iken, amfoterisin B için sekiz kat daha fazla (2 µg/ml), itrakonazol için dört kat daha az (0.25 µg/ml) bulunmuştur. İnvazif aspergilloz tedavisinde kullanılabilecek birden fazla antifungal ilaç seçeneği mevcutsa da, önerilen primer tedavi seçeneği vorikonazoldür. Bununla birlikte, suş sayımızın az olmasına rağmen, kaspofungin ve posakonazol için en düşük MİK değerlerinin tespit edilmiş olması, bu yeni antifungallerin aspergillozlu olguların tedavisinde akılda tutulması gereken seçenekler olması açısından önemlidir. Sonuç olarak, hastanemizde aspergilloz olgularının önceki yıllara göre daha fazla saptanmaya başlaması, ampirik tedavi protokollerinin oluşturulması için bölgemizdeki suşların antifungal duyarlılık sonuçlarının bilinmesinin ve bu amaçla da daha geniş klinik izolatların dahil edildiği çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nicod LP, Pache JC, Howarth N. Fungal infections in transplant recipients. *Eur Respir J* 2001; 17: 133-40.
2. Yenerel MN, Beşışık SK, Sanwara İ, Tabak L, Sargın D. Yoğun kemoterapi ünitesinde eşzamanda ortaya çıkan dört invazif pulmoner aspergilloz olgusu. *Toraks Derg* 2000; 1: 41-4.
3. Yeghen T, Kibbler CC, Prentice HG, et al. Management of invasive pulmonary aspergilloz in hematology patients: a review of 87 consecutive cases at a single institution. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 859-68.
4. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Aspergillus* cinsi mantarlar ve invazif aspergilloz: Mikoloji, patogenezi, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2003; 34: 140-57.
5. Gürcañ Ş, Demir M, Altıay G, Tikveşli M, Kılıç H, Otkun M. Trakya Üniversitesi Hastanesi'nde solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* spp. izolasyonları. *Tuberk Toraks* 2007; 55: 160-6.
6. Kantarcıoğlu S, Yücel A, Keskinel İ, Erk M. Olgu bildirim: Bir akciğer aspergilloz olgusunun mikoloji yönünden izlenmesi. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2003; 34: 194-203.
7. Allam MF, Serrano Del Castillo A, Díaz-Molina C, Fernández-Crehuet Navaja R. Invasive pulmonary aspergilloz: retrospective case record review. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 35-8.
8. Vogeser M, Wanders A, Haas A, Ruckdeschel G. A four-year review of fatal aspergilloz. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 42-5.
9. Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Ruesga M, et al. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One. *Mycoses* 2006; 49: 293-7.
10. Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 7-14.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard. Document M38-A2. 2008, 2nd ed. CLSI, Wayne, PA.
12. Kess I, Mohanty S, Jain N, Banerjee U. Prevalence of *Aspergillus* species in clinical samples isolated in an Indian tertiary care hospital. *Indian J Med Sci* 2004; 58: 513-9.
13. Schwartz S, Thiel E. Clinical presentation of invasive aspergilloz. *Mycoses* 1997; 40: 21-4.
14. Vaideeswar P, Prasad S, Deshpande JR, Pandit SP. Invasive pulmonary aspergilloz: A study of 39 cases at autopsy. *J Postgrad Med* 2004; 50: 21-6.
15. Abuhammour W, Hasan RA. Treatment of invasive aspergilloz in children with hematologic malignancies. *Indian J Pediatr* 2004; 71: 837-43.
16. Uçan ES, Oğuz VA, Güngör Ö ve ark. Vorikonazol ile tedavi edilen dirençli pulmoner ve serebral aspergilloz olgusu. *Tuberk Toraks* 2006; 54: 75-9.
17. Büyüksirin M, Polat G, Usalan A ve ark. Endobronşiyal aspergilloz ile gizli akciğer kanseri ve topikal amfoterisin B ile oral itraconazolün etkinliği. *Toraks Derg* 2005; 6: 267-70.
18. Chryssanthou E. In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 509-12.
19. Ozkutuk A, Metin DY, Ergon C, Yucesoy M, Hilmioglu PS. Comparison of disk diffusion, E-test and broth microdilution test in determination of susceptibility of *Aspergillus* species to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. *J Chemother* 2008; 20: 87-92.