

ASPERGİLLOZ

MİKROBİYOLOJİK TANI

Dr. Asuman İnan
HNH İnfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Kliniği



SIK RASTLANAN İNSAN MİKOZLARI VE ETYOLOJİK AJANLARININ SINIFLANDIRILMASI

Derin mikozlar Oppurtunistik Mikozlar Subkutanöz Mikozlar Yüzeyel Mikozlar

Blastomycosis <i>Blastomyces dermatitis</i>	Aspergillosis Aspergillus fumigatus A. flavus A. niger A. terreus	Maduromycosis <i>Acremonium sp.</i> <i>Exophiala jeanselmei</i> <i>Pseudallescheria boydii</i> <i>Nocardia sp</i>	Black piedra <i>Piedraia hortae</i>
Coccidioidomycosis <i>Coccidiotes immitis</i>			Tinea nigra <i>Phaeoannelomyces wernickii</i>
Histoplasmosis <i>Histoplasma capsilatum</i>	Candidosis <i>Candida albicans</i> <i>Candida sp.</i>	Chromoblastomycosis <i>Cladosporium carionii</i> <i>Fonsecaea sp.</i> <i>Phialophora sp.</i>	Tinea versicolor <i>Malassezia furfur</i>
Paracoccidioidomycosis <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Geotrichosis <i>Geotrichum candidum</i>	Phaeohyphomycosis (cutaneous) <i>Alternia sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Xylohypha emmonsii</i> <i>Exophiala sp.</i> <i>Phialophora sp.</i> <i>Wangiella dermatitis</i>	Dermatomycosis <i>Microsporum sp.</i> <i>Trichophyton sp.</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>
Sporotrichosis <i>Sporothrix schenckii</i>	Phaeohyphomycosis <i>Alternia sp.</i> <i>Curvularia sp.</i> <i>Drechslera sp.</i> <i>Exophiala sp.</i> <i>Wangiella sp.</i>	Sporotrichosis <i>Sporothrix schenckii</i>	Mycotic keratitis <i>Fusarium sp.</i> Aspergillus sp. <i>Candida sp.</i>
	Hyalohyphomycosis <i>Acremonium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Paecilomyces sp.</i> <i>Scedosporium sp.</i> <i>(Pseudallesheria sp.)</i>		Onychomycosis <i>Candida sp.</i> Aspergillus sp. <i>Trichosporon bigelii</i> <i>Geotrichum candidum</i>
	Zigomycosis <i>Rhizopus sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Cunninghamella sp.</i>		Tinea unguium <i>Trichophyton sp.</i> <i>Epidermophyton floccosum</i>

TIBBİ OLARAK ÖNEM TAŞIYAN MANTARLARIN BASİT TAKSONOMİK ŞEMASI

Class: *Zygomycetes*

Order: *Mucorales*

Genera:

Rhizopus, Mucor, Rhizomucor, Absidia, Cunninghamella, Saksenea

Order: *Endomophthorales*

Genera:

Basidiobolus, Conidiobolus

Class: *Ascomycetes*

Order: *Endomycetales*

Genera:

Saccaromyces, Pichia

Bazı *Candida* türlerinin teleomorfları

Order: *Onygenales*

Genera:

Arthroderma (*Trichophyton* ve *Microsporum* türlerinin teleomorfları)

Ajellomyces (*Histoplasma* ve *Blastomyces* türlerinin teleomorfları)

***Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin teleomorfları**

Class: *Deuteromycetes*

Order: *Cryptococcales*

Genera:

Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Pityrosporum

Order: *Moniliales*

Family : *Moniliaceae*

Genera:

Epidermophyton, Coccidioides, Paracoccidioides, Sporothrix, Aspergillus

Family: *Dematiaceae*

Genera:

Phialophora, Fonsecaea, Exophiala, Wangiella, Xylomyces, bipolaris, Alternaria

Order: *Sphaeropsidales*

Genera:

Phoma

Class: *Oomycetes*

Genera:

Pythium



- Raper ve Fennel'in sınıflamasında 700 *Aspergillus* türü tanımlanmış, Rinaldi bunlardan 19'unun insan infeksiyonlarında etken olduğunu saptamıştır.

- *Aspergillus* infeksiyonlarında sıklıkla 4 tür izole edilmektedir:

A.fumigatus (~%90)

A.flavus (~%10)

A.niger (~%2)

A.terreus (~%2), oranında invaziv infeksiyonlara neden olurlar.

- İnsanda İnfeksiyon Etkeni olan Diğer *Aspergillus* Türleri

A.nidulans, *A.amstelodami*, *A.avenaceus*,

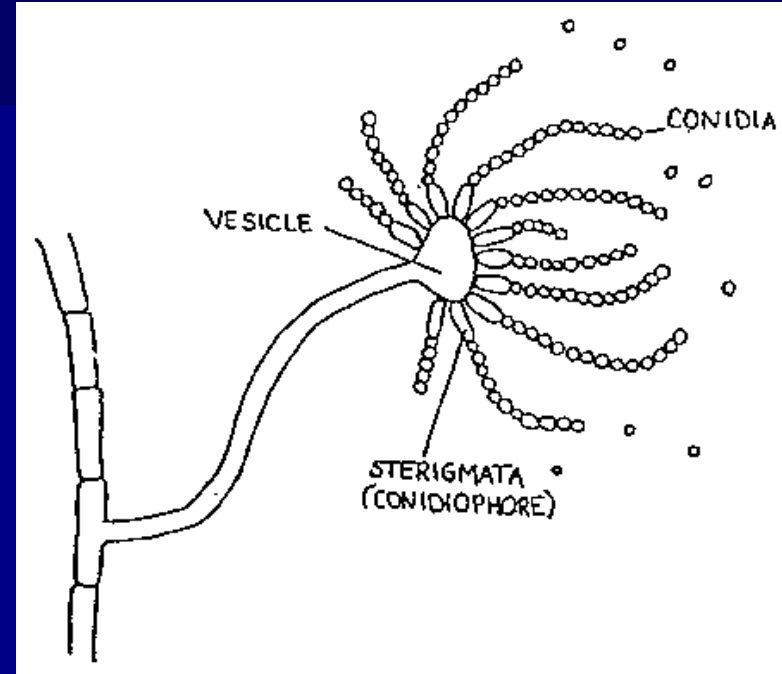
A. caesiellius, *A. candidus*, *A. carneus*,

A. chevalieri, *A. clavatus*, *A.glaucus*,

A. granulosis, *A. oryzae*, *A. quadirilineatus*,

A.restrictus, *A. sydowi*, *A.ustus*,

A. versicolor, *A.wentii*, *A.(neosartorya) fisheri*



- Ajello tarafından hifamiçetler genel bir adlandırma ile Hyalohyphomycetes Phaeohyphomycetes , adı altında toplanmışlardır.

- Aspergilluslar, hyalohyphomycetes grubunda yer alırlar. Hifleri septalı olup invivo pigmentsizdir. Phaeohyphomycetes hifleri dokuda koyu renkte pigment (melanin) oluştururlar.
- Aspergillus cinsinin adlandırılması konidiyal özellik ve cinsel yapıların (klaystotesiyum ve askosporlar) varlığına dayanır.
- Aspergilluslar genellikle eşeysiz, bazen de eşeyli çoğalırlar.
Sabouroud dekstrozu agarda eşeysiz şekillerini, Czapek-dox besiyerlerinde teleomorfları (eşeyli şekillerini) geliştirir ve bu şekilde sınıflandırılırlar.

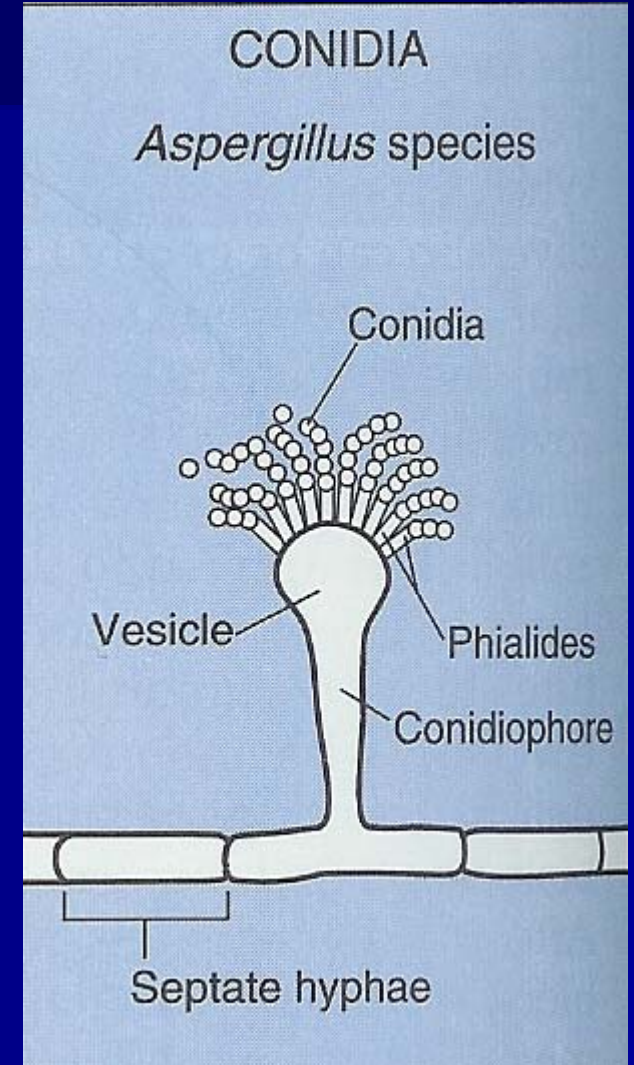
Makroskopik görünüm:

- Aspergilluslar 3-5 gün içinde genellikle sarı, yeşil, kahverengi,siyah renklerde, keskin kenarlı, çevresi beyaz renkte bordürlü, yüzeyi granüler koloniler yaparlar.
- Koloni morfolojisi besiyerinin yapısına bağlı olarak değişebilir. Klasik morfoloji Raper ve Fennell'in tanımladığı şekilde Czapek agarda belirir

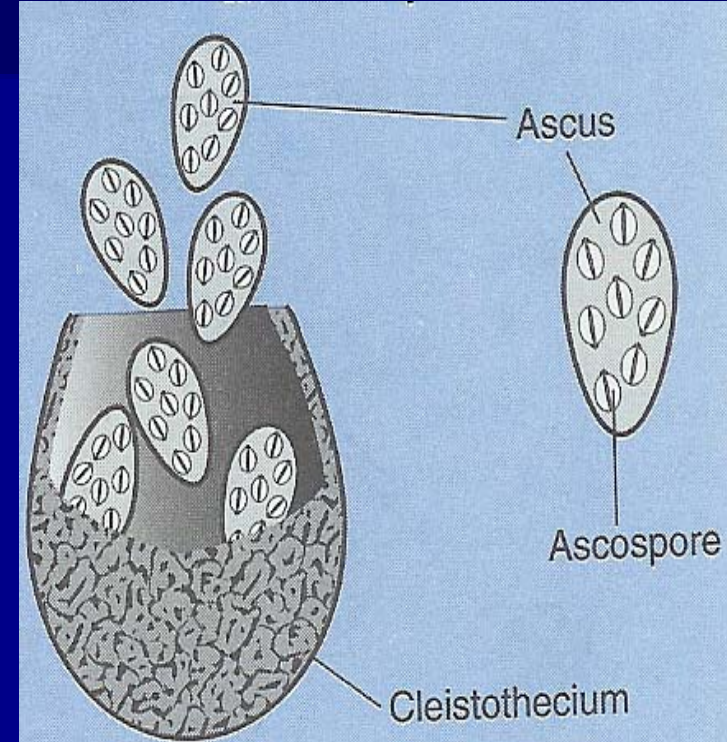


Mikroskopik Görünüm:

- Aspergillus türleri mikroskopik olarak 4-6 μm 'lik hyalin, paralel duvarlı **septalı hifalar** oluştururlar. Düzenli dallanmaları **45°C'lik bir aç**ı ile çıkar. Bu özellik diğer hifalı mantarlardan ayırımında önemlidir.
- Hif bölümlerinin bazıları **konidiyofor** şeklinde farklılaşır.
- Konidiyoforlar ya vejetatif hif ya da **ayak hücresi** denilen hifal hücrelerden köken alır. Buradan çıkan konidiyaların ucu yuvarlaklaşarak sonlanır. Bu uç oluşuma **vezikül** denir.
- Konidiyoforların renk, uzunluk, genişlik, duvarlarının donanımı türlere göre değişir. veziküller küre, yarımküre görünümünde ya da sivriimsi uçludur.
- Yüzeylerindeki **fiyalit** denen lobut şeklindeki oluşumlar ile fiyalovezikül adını alırlar.
- Fiyalitler tek sıralı (**uniseriate**) çift sıralı (**biseriate**) ya da A.flavusta olduğu gibi iki durumun kombinasyonu şeklinde olur.



- **Konidiyumlar:** Konidiyumlar cinsel olmayan sporlardır. Konidiyumlar fiyalitlerin ucundan itibaren zincir şeklinde dizilirler. Bu şekilleri ile güneş ışınlarına benzetilirler. Bazı türlerde konidiyumlar vezikül üzerine yığılır. Elipsoit, küresel şekillidirler.
- Cinsel çoğalma: **askosporlarla** olur. **Klaystotesiyum** (cleistothecium) denilen keseye benzer oluşumlar, küresel yapılardır. (**Hülle hücreleri**) İçlerinde askus ve askosporlar bulunur. (A.nidulans, A.glaucus). Renk, duvar yapısı, büyüklükleri türlere göre değişir. İzolatlarda telemorf oluşumu ancak üç hafta gibi uzun bir sürede tamamlanır.



- Hastalığa sebep olan mantarın başarılı bir şekilde tanımlanabilmesi için örnek alınımından kültür sonuçlarının değerlendirilmesine kadar tüm işlemlerin standartlara uygun şekilde yapılması gerekir.
- Mantarların cins ve türleri ancak kültür yöntemi ile belirlenebilir. Tür düzeyinde tanımlama ekoloji ve epidemiyolojinin belirlenmesinin yanında uygun ve etkin tedaviye de yol gösterecektir.

- **ÖRNEKLERİN ALINMASI, SAKLANMASI VE İŞLENMESİ**
- Mikozların başarılı olarak tanısının yapılması laboratuvar çalışanlarının deneyimine laboratuvara getirilen örneklerin kalitesine bağlıdır.
- Klinisyen ile laboratuvar arası diyalog kaçınılmazdır.
- Mantar örneklerinin farklı infeksiyonlar nedeni ile değişik bölgelerden alınması gerekir. Bunlar transtrakeal aspirat, balgam, biyopsi, BOS, vb. materyalleri olabilir

■ Balgam:

- Balgam taze olmalı ve sabah erken alınmalıdır.
- Balgam dışındaki solunum örnekleri trakeal aspirasyon, bronşiyal lavaj, akciğer biyopsi materyali, klinisyen tarafından alınır ve hızlıca laboratuvara ulaştırılır.

■ Kan :

- Kan aseptik şartlarda alınmalıdır.
- Kan tüplerine veya direkt kan kültürü şişelerine alınır, antikoagülan olarak sodyum polianetol sülfonat (SPS) kullanılır.
- Mantar kültürü için lizis santrifügasyon sistemi idealdir. Bu sistemde 10 ml kan alınmalıdır.

■ Püy, eksüda:

- Steril bir iğne veya enjektör ile abseden aspirat alınarak steril bir kaba konulur.

- BOS: Alınabilecek kadar BOS örneği toplanır üç steril tüpe ayrılır.
- Göz örnekleri: Keratomikoz olgularında korneal kazıntı, mantar endoftalmiti tanısında vitrektomi örnekleri alınmalıdır.
- Kulak sürüntü kültürleri alınabilir.
- İdrar: Kateterle alınan idrar örneği en uygundur. Sabah erken orta akım idrarı kullanılır ve santrifüj edilerek sedimentten ekim yapılır.
- Çift örnekle çalışmak izolasyonu daha fazla arttırır.

KLİNİK ÖRNEKLERİN DİREKT İNCELENMESİ

- Klinik örneklerden KOH veya Kalkoflor beyazı, dokuda Gomori-metanamin gümüş boyası, PAS gibi özel mantar boyası ile hif morfolojisi incelenir.
- Lezyondaki nekrotik, irinli, kanlı ya da kazeöz alanlar ve buralardan alınan örnekler, mantarın mikroskopik olarak saptandığı ve üreme olasılığının en yüksek olduğu yerlerdir. Örnek alımı ve direkt inceleme için bu alanlar seçilmelidir.

Potasyum hidroksit (KOH) :

- KOH ile incelemenin avantajı, her türlü klinik örnekten doku ve hücresel artıkların mantar hücrelerine zarar vermeden temizlenmesi; dezavantajı ise hif ya da tomurcuklanma formlarını yüzeysel olarak andıran artık faktörler oluşturabilmesidir.
- Klinik örnek %10-25'lik KOH çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra lamel kapatılır, hafifçe bastırılır. 5-10 dakika oda ısısında, 5-10 dakika hafifçe alttan ısıtılarak , nemli ortamda bekletilir.
- Normal ışık mikroskobunda önce küçük, daha sonra büyük büyütmeli objektifte incelenir.
- Bazı türler oksalik asit üretir ve kalsiyum oksalatın lokal olarak depolanmasına neden olarak, infekte ettikleri dokularda **mektup zarfı** görünümüne yol açarlar.
- Balgamin direkt incelenmesinde 45 °C' lik tipik hifal dallanmalara eşlik eden eozinofiller ve **Charcot-Leyden kristalleri** ön tanı için yeterlidir.



Kalkoflor beyazı-KOH :

- Kalkoflor boyası, **polisakkaridlere (sellüloz ve kitin gibi) bağlandığından** klinik örneklerde mantar hücrelerinin gösterilmesinde kullanılmaktadır.
- %10'luk KOH (bir damla), %0.1'lik kalkoflor beyazı (bir damla) örnekle karıştırıldıktan sonra lamelle kapatılır , hafifçe bastırılır ve floresan mikroskopta küçük büyütme ile incelenir.
- Kullanılan filtreye bağlı olarak maya hücreleri, psöдохifler ve hif yapıları tebeşir beyazı veya sarı renkli floresan verirler.

KÜLTÜR VASATLARININ SEÇİMİ VE EKİM

- Mantar ekimi için ilk vasat nonselektif olup, hemen tüm fungal cinsleri üretir. Sabouraud'nun dekstroza agarı bu amaçla kullanılabilir. Bu agar aynı zamanda, mantarların subkültürlerinin zenginleştirilmiş ortamda elde edilmesi, sporulasyonun arttırılması ve daha karakteristik koloni morfolojisi oluşturulması için kullanılabilir.
- Aspergillus türleri,
Sabouraud'nun dekstroza agarı (aktidiyonsuz)
patates dekstroza agar,
koyun kanlı Brain-Heart infüzyon agar,
Brain-Heart infüzyon agar'da üreyebilir.
- Subkültürler için ise Czepak agar kullanılır.

Czepak agar içeriği: Sodyum nitrat 3.0 gr, Potasyum fosfat 1.0 gm, Mg sülfat 0.5 gr, KCL 0.5 gr, Demir sülfat 0.01 gr, Glukoz 30.0 gr, Agar 15.0 gr, Distile su 1 litre)

- Laboratuvarda ayrılan alana göre ekim için uygun kaplar kullanılabilir. Özellikle geniş tüpler (150-25 mm) ve vidalı kapaklı olanlar tercih edilir.
- Petriler geniş yüzeyleriyle büyüme ve kültür incelemeleri ve subkültürler için daha uygundur. Petrilerde, karışık kültürlerin ayrımı daha kolaydır. 6-8 mm kalınlığında agar içeren petrilere konularak kenarları parafinle kapatılır.
- Tüm fungal kültürler, negatif olarak değerlendirilmeden önce, kontaminasyon olsa bile 30 gün inkübe edilmelidir.
- En az % 50 nemli ortamda (hem tüpler hem petriler) inkübasyon boyunca tutulur. Bunun için etüvün dibine su dolu bir kap konarak nemlilik arttırılmalıdır.

Üreme olduğunda:

- Koloninin görünüşü,
- Üreme zamanı
- Koloni pigmentasyonu ve şekli
- Antifungal içeren besiyerinde üreme,
- Dimorfik üreme, değerlendirilmelidir

- Klinik örneklerden izole edilen bir Aspergillus'un patojen olduğunu söylemek güçtür.Çünkü Aspergillus her zaman solunum örneklerinden, deri kazıntısı ve diğer örneklerden izole edilebilir.
- Direkt mikroskopi ve kültür kombinasyonu, yalnız kültürle karşılaştırıldığında izolasyon oranının %15-20 arttığı gösterilmiştir.

■ Etken kabul edilme kriterleri şunlardır:

Direkt incelemede hifal elementlerin
görülmesi,

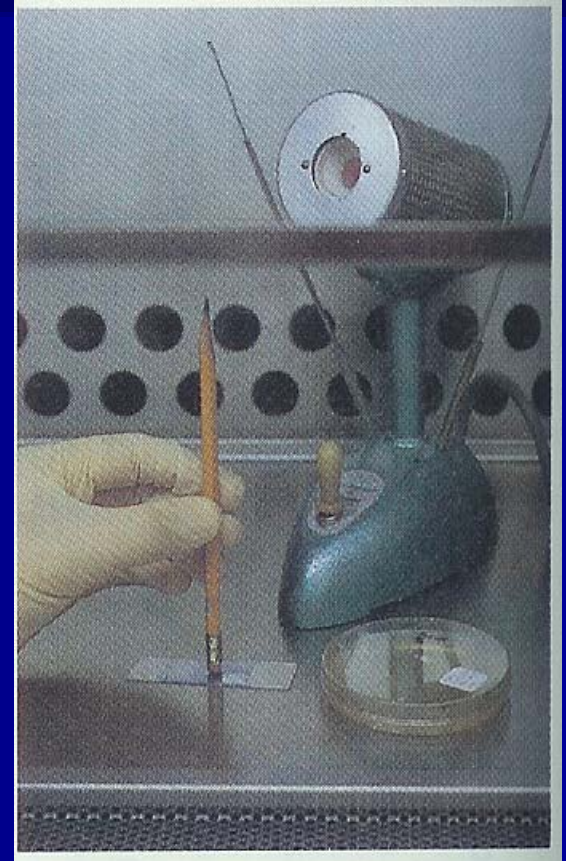
İzole edilen küfle direkt incelemenin
uyumu,

Birden fazla sayıda aynı mantar
kolonisinin bulunuşu

Değişik örneklerden aynı küfün
izolasyonu

İzole edilen küfün 37°C'de üreyebilmesi
gereklidir.

- Üreme olduğunda, Flamentöz Hifler için 3 şekilde ön inceleme yapılabilir:
- **1- Islak Preparat**
- İğne veya aplikatör çubukla kazarak, besiyerinin küçük bir parçası kaldırılır.
- Daha önce lam üzerine damlatılan laktofenol anilin mavisinin üzerine koloni parçalanarak konulur.
- Üzeri lamelle kapatılıp, sivri bir cisimle bastırılarak 10X, 40X ve 100X (immersiyon yağı ile) büyütmede incelenir.
- Parçalanmış kolonilerde özellikle flamentöz yapıları görmek kolay, ancak sporları görmek zordur.



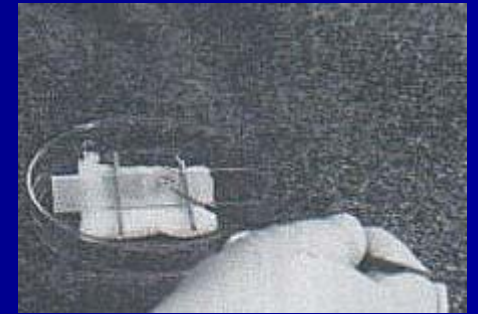
■ **2- Şeffaf Bant Yöntemi**

- Uygun uzunlukta selofan bant, iki ucundan tutularak koloni üzerine hafifçe bastırılır.
- Daha sonra bu bant, üzerine laktofenol anilin mavisi damlatılmış lam üzerine hava kabarcığı oluşturmadan yapıştırılır.
- Bu işlemler sırasında mutlaka eldiven giyilmeli ve işlem biyolojik kabinde yapılmalıdır. Selofan bantın eldivene yapışmamasına dikkat edilmelidir.
- Ucuz, hızlı, basit ve çoğu zaman doğru identifikasyon yapılabilen bir yöntemdir



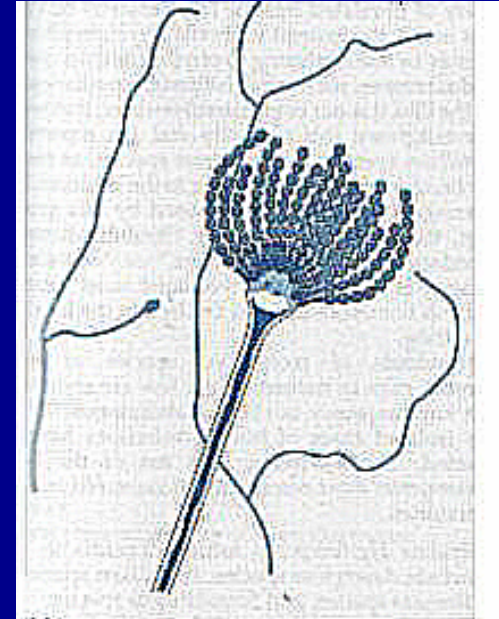
3- Mikroslayt Kültür Tekniđi

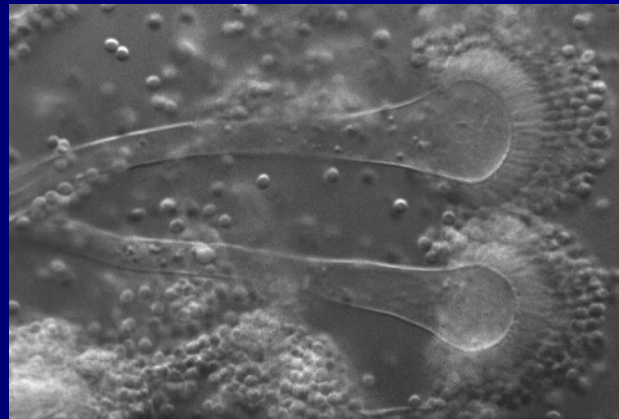
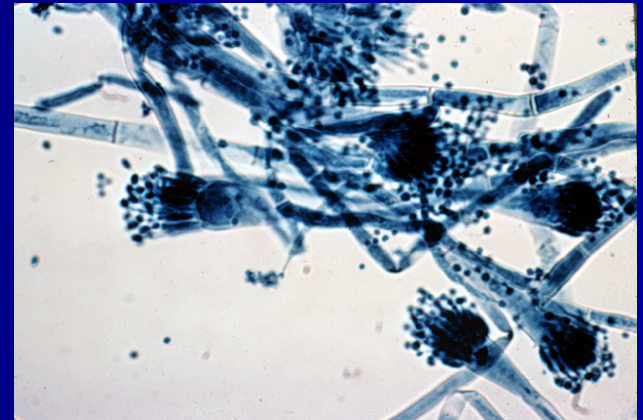
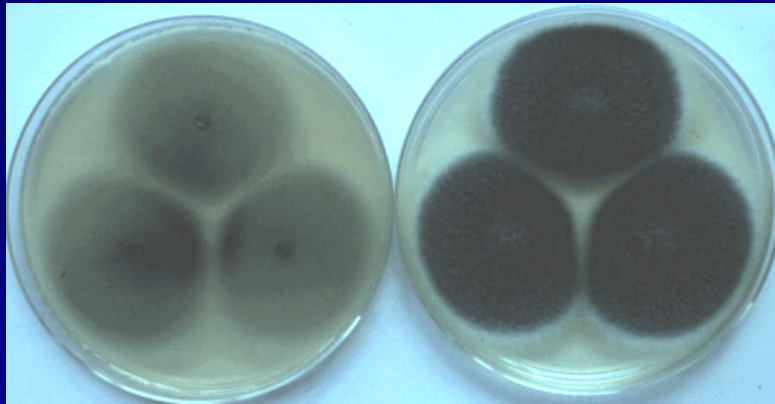
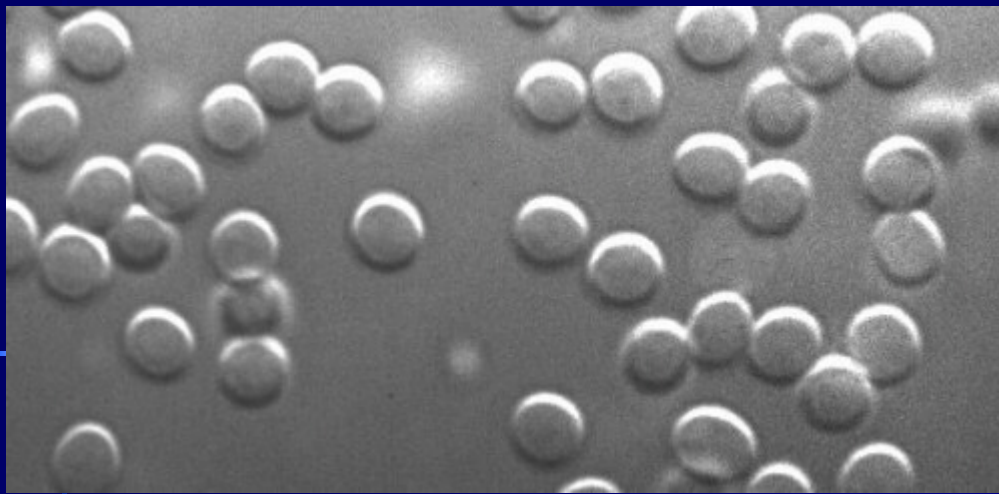
- Bunun için içine ıslak gazlı bez veya kurutma kağıdı yerleştirilmiş petri kutusuna, üzerine lam koymak için iki cam veya tahta çubuk yerleştirilir.
- Mısırlı veya patatesli dekstroza agarda bir tüp yardımıyla dairesel besiyerleri kesilir ve lam üzerine konur.
- Üreyen kolonilerden alınarak lam üzerindeki agarın içine 2-3 yere inokülasyon yapılır.
- üzerine hafifçe ısıtılmış lamel kapatılır. Petri kutusunun kapağı kapatılıp, oda ısısı veya etüvde 3-5 gün bekletilir.
- Büyüme gözle görülür olunca lamel bir forseps yardımıyla alınarak, laktofenollü lamın üzerine konulur ve incelenir.
- Daha sonra agar plağı lamın üzerinden kaldırılarak (dekontamine edilip) atılır. İlk lamın üzerine anilin mavisi damlatılarak, lamelle kapatılıp, incelenir.



A.fumigatus

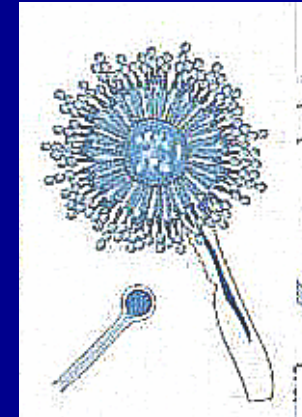
- Makroskopik olarak
- Kolonileri: Granüler, pamuksu yapıda olup, genellikle yeşil, yeşil-gri, yeşil-kahverengi pigmentasyon gösterirler. Etraflarında beyaz bir halka vardır, sınırları belirgindir.
- Mikroskopik olarak:
- Konidiyoforları uzun olup (300-500 μ m), vezikülleri (30-50 μ m) $\mathcal{C}$ apında, sopa $\mathcal{C}$ eklinde, tepesi yuvarlaktır.
- Tek sıra dizilmiş fyalidler ve oradan $\mathcal{C}$ ıkan sferik, ovoid santral eksene doğru yönelmiş, konidya zincirlerinden oluşmuştur





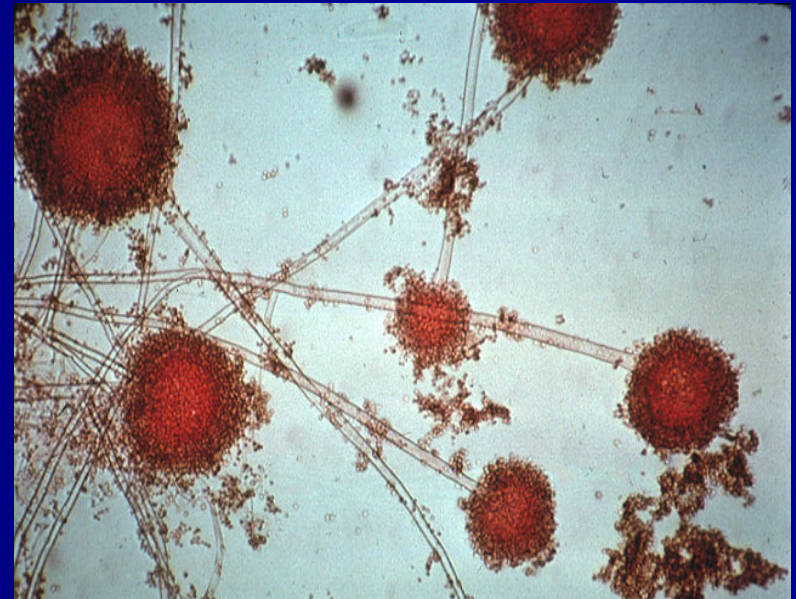
A.flavus

- Makroskopik olarak:
- Koloniler granüler, pamuksu yapıda, sarı veya sarı-kahverengidir.
- Mikroskopik olarak:
- konidiyoforları uzun olup(400-800 μm), veziküller 25-45 μm çapında ve düzensiz kenarlıdır.Vezikül yüzeyinden 1 sıra, daha karakteristik olarak 2 sıra fyalidler çıkar.
- Konidiyalar sferik,düzgün ve nisbeten uzun zincirlidir.





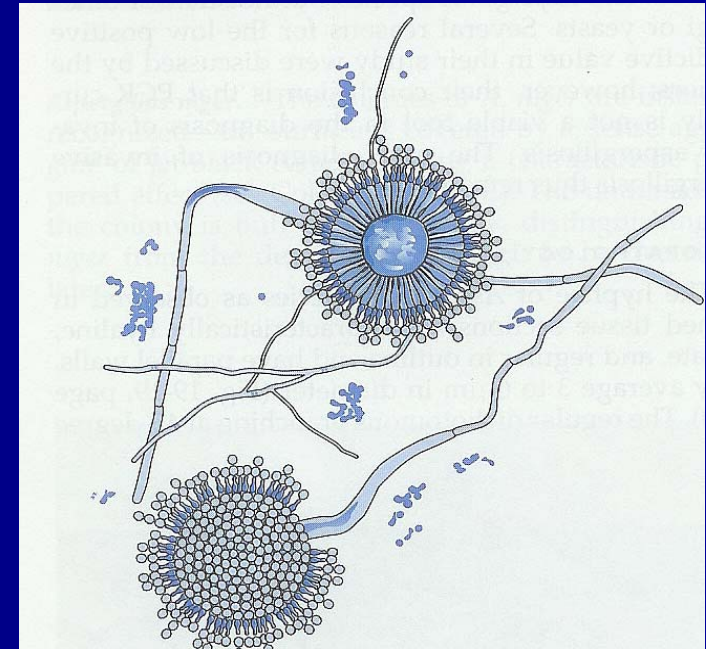
Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis
Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation

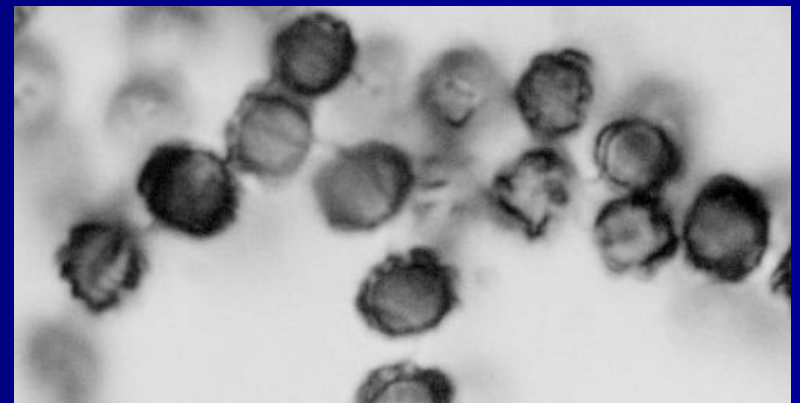
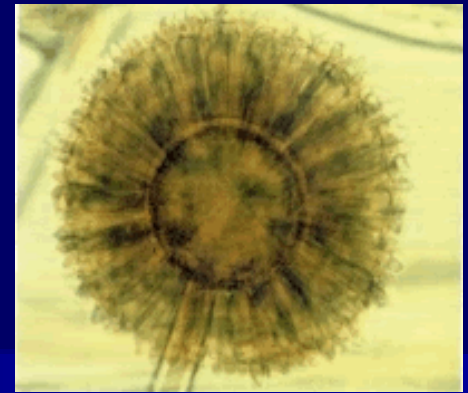


A.niger

- Makroskopik olarak
- Koloniler yüzeyindeki siyah konidyalardan dolayı karabiber dökülmüş görünümleriyle karakteristiktir. Koloninin alt tarafları parıltılı ve sarı- gri olarak görülür.

- Mikroskopik olarak:
- Oldukça yoğun veziküller 3-5 μm $\varnothing$ olup, agreste olmuşlardır. Sferik siyah konidyalarla pürtlü olarak çevrilmişlerdir. Veziküller görülebildiği zaman yuvarlak ve 75 μm $\varnothing$ civarındadır.



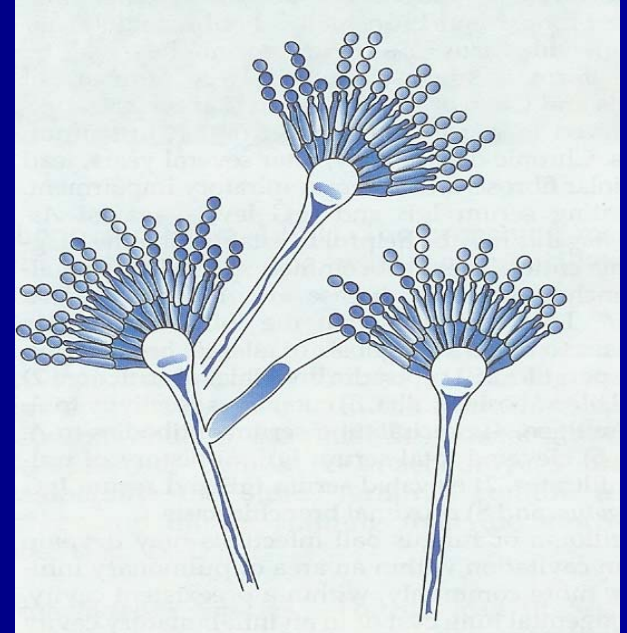


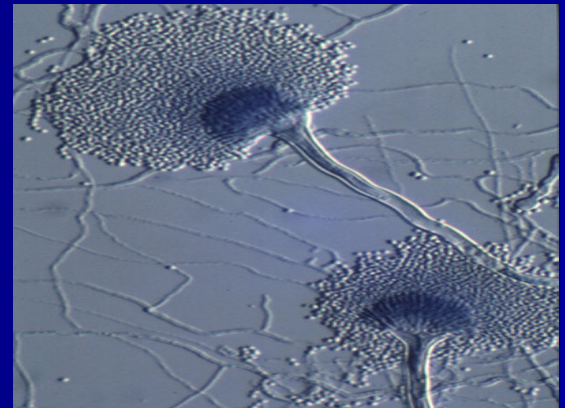
A.terreus

- Makroskopik olarak:
- Kolonileri tarçın, kahverengi ve turuncumsu-kahverengidir. Koloninin merkezinden çıkan kat kat radyal katmanlar görülür.

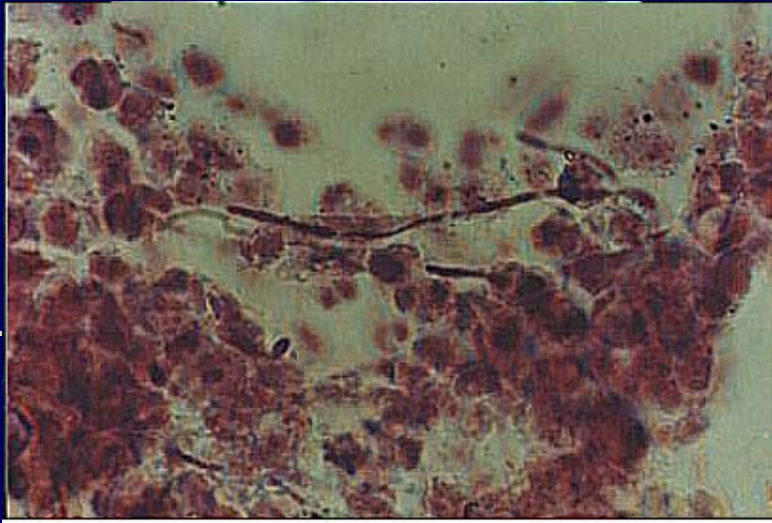


- Mikroskopik olarak:
- veziküller küçük ($10-16\mu\text{m}$) ve kubbe şeklindedir. Fyalidler 2 sıralı olup, uzun zincirler yaparlar. Daha büyük ve tek tek duran konidiaları da vardır.





Türler		Fyalid dizilimi		Koloni özellikleri		Mikroskopik Özellikler	
		Tek sıralı	Çift sıralı		Konidiyofor	Vezikül	Konidiyum
<i>A.Fumigatus</i>		+		Koyu yeşil Grimsi, kahve Beyaz bordürle sınırlı	300-500 µm uzunlukta Renksiz Düzgün duvarlı	20-30 µm çapta Lobut şeklinde Fyalit ucunda zincir şeklinde dizilim	Küresel,2-3.5 µm büyüklükte Eşit çaplı Güneş ışını görünüm
<i>A. flavus</i>		+	+	Sarı Sarımsı- yeşil	400-800 µm uzunlukta Renksiz Düzgün olmayan çeperli	25-45 µm çapta Küresel	Küresel, elipsoit Düzgün yüzeyli Zincir şeklinde dizilim
<i>A. niger</i>			+	Siyah renkte Sarı bordürle sınırlı Siyah granüler yüzey	400-3000 µm uzunlukta Renksiz- açık kahverengi	30-75 µm çapta Küresel Açık kahverengi	Sferik, 3-5 µm çapta Düzgün olmayan yüzeyli Kalın duvarlı Siyah renkte Vezikül üzerine yığın halinde çöker
<i>A.terreus</i>			+	Taba rengi Turuncu- kahve Koloni merkezinden perifere radyal oluklu	100-250 µm uzunlukta Renksiz Düzgün duvarlı	10-16 µm çapta Küçük küresel	Sferik,2-2.5 µm çapta Düzgün yüzeyli Uzun zincirler yapar



Teşekkür Ederim



Aspergillus clavatus, young conidiophore