



VIA University College

7.semester Bacheloreksamen juni 2021

Prædefineret information

Startdato:	24-05-2021 09:00	Bedømmelsesform:	Dansk 7-trinsskala
Slutdato:	02-06-2021 12:00	ECTS:	20
SIS-kode:	MT02643847		
Intern bedømmer:	Henning Ilsø		
Intern bedømmer:	Dorte Paulmann		

Deltager

Navn:	Marck Sebastian Vilstrup Nielsen
Kandidatnr.:	743b997a-0971-eb11-a2d6-005056b2d348
VIA-id:	274648@viauc.dk

Information fra deltager

Anslag - besvarelse *:	63840
Dansk titel *:	Arts- og resistensbestemmelse af Aspergillus
Engelsk titel *:	Species Identification and Susceptibility Testing of Aspergillus

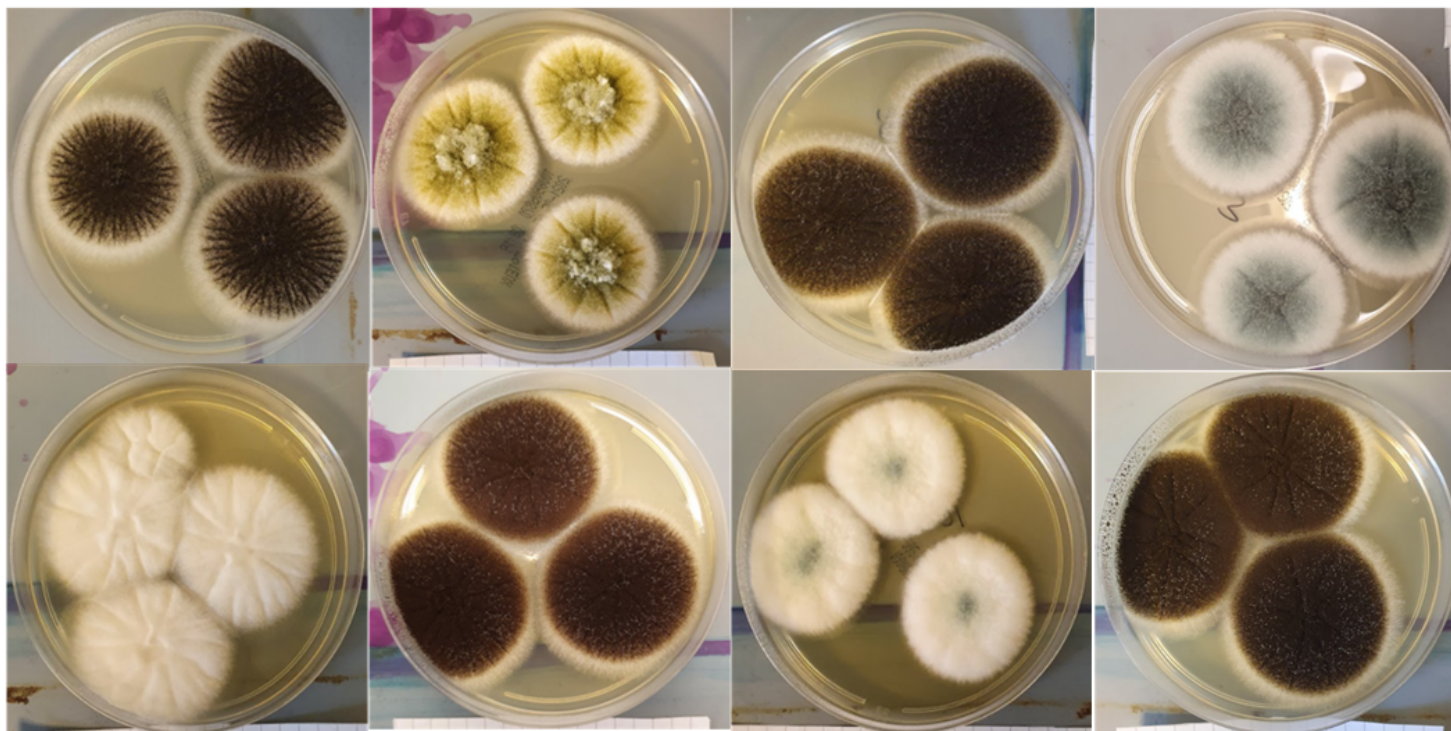
Tro og love erklæring *: Ja

Jeg bekræfter, at jeg har uploadet min opgave i UC Viden. *

Ja

Arts- og resistensbestemmelse af *Aspergillus*

Professionsbachelorprojekt - Bioanalytikeruddannelsen - VIA University College



Udarbejdet af: Marck Sebastian Vilstrup Nielsen, 274648
Jennifer Dan Thu Lam, 271946
Marlene Eduard Rasmussen, 290733
Louise Luther, 268317

Kliniskvejleder: Bioanalytikerunderviser
Dorte Paulmann

Institutionsvejleder: Lektor, Cand. Science, Ph.d.
Henning Ilsø

Antal tegn: 63.840

Antal bilag: 6

Dato for aflevering: 2. juni 2021

Forord

Dette bachelorprojekt er udarbejdet i foråret 2021 af bioanalytikerstuderende Marlene Eduard Rasmussen, Marck Sebastian Vilstrup Nielsen, Jennifer Dan Thu Lam og Louise Luther på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Aarhus Universitetshospital.

Vi vil gerne takke afdelingens overlæger Jan Berg Gertsen og Lise Kristensen for deres store interesse og hjælp under vores projekt.

Herudover vil vi gerne takke Statens Serum Institut, for at være behjælpelige i forhold til spørgsmål og for at give os indblik i kommende breakpoints, som endnu ikke ligger tilgængelige på deres hjemmeside.

Vi vil også gerne takke vores vejledere; Bioanalytikerunderviser Dorte Paulmann og Lektor, cand.scient., Ph.d. Henning Ilsø for vejledning og hjælp i laboratoriet. Derudover vil vi gerne sige tak til personalet på afdelingen, for at være behjælpelig, når vi stødte på problemer under den praktiske udførelse af projektet.

Resumé

Baggrund

Der findes 250.000 forskellige svampearter, hvoraf de 500 er patogene for mennesker, som kan forårsage mykoser, allergi og forgiftninger. Der ses en stigning i incidensen af mykoser og det anslås at 1 ud af 6 danskere hvert år rammes af en mykose. Disse borgere har ofte det til fælles, at de har et svækket immunforsvar, hvilket gør dem mere modtagelige for infektioner generelt. En af de svampe som kan give mykose er *Aspergillus*. En udfordring ved den stigende incidens af Aspergillose, er en øget risiko for resistensudvikling.

I 2018 blev der startet en national overvågning af infektioner med *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), hvor der var registreret 500 patienter med Aspergillose uden effektiv behandling med azoler. I Danmark er der påvist azolresistens hos 6,1% af positive fund af *A. fumigatus*.

Metode

Vi fik udleveret 50 isolater. De var blevet valgt så der var en ligelig fordeling mellem *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* og *Aspergillus niger*. Vi udsåede alle isolater på to selektive Sabouraud plader med gentamicin og chloramphenicol, en til artsbestemmelse og en til resistensbestemmelse. Herefter inkuberede de i henholdsvis 3 og 5 døgn. For at artsbestemme, havde vi benyttet Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS).

Resistensbestemmelsen blev udført ved, at vi lavede en konidiesuspension, der blev udsået i en mikrotiterplade, indeholdende fire typer af antimykotika i faldende koncentration: Itraconazol 8-0,016 mg/L, Clotrimazol 16-0,032 mg/L, Miconazol 16-0,032 mg/L og Terbinafin 16-0,032 mg/L. Mikrotiterpladen blev aflæst ved hjælp af ELISA og OD-værdierne plottet ind i et excel-ark med breakpoints lavet ud fra EUCAST og SSI. Alle mikrotiterplader blev også aflæst ved brug af Sensititre Manuel Viewer.

Resultater

Ud af vores 50 isolater, var det muligt at identificere 48. Af de identificerede var der syv forskellige arter, som vi kunne gå videre med til resistensbestemmelse. Ved resistensbestemmelse har vi klassificeret isolaterne sensitiv(S), intermediær (I) eller resistent (R) over for de fire antimykotika. Generelt var isolaterne I eller R efter de officielle breakpoints, som er tilgængelig på SSI's hjemmeside og er en indikation på, hvornår *Aspergillus* er resistent for det pågældende antimykotika. Der er efterfølgende oplyst uofficielle breakpoints, som på nuværende tidspunkt ikke er tilgængelig. Efter udgangspunkt af de uofficielle breakpoints dannede der sig et mønster med mindre resistente isolater i vores resultater.

Konklusion

Ud fra vores resultater, kan det konkluderes, at det ved hjælp af Brukers MALDI Biotyper og MSI-databasen var muligt, at identificere syv forskellige *Aspergillus* arter, fra isolater fundet i øreopdninger inden for de tre complexer. De fundne arter er *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* *A. cf. costaricensis* inde for *A. niger* complex. *A. fumigatus* sensu stricto, *A. thermomutatus* inden for *A. fumigatus* complex. *A. flavus* sensu stricto og *A. tamarii* inde for *A. flavus* complex.

Herudover kan det konkluderes at arternes resistensmønstre inden for complexerne, er forholdsvis ens, med kun enkelte afvigelser inden for *A. fumigatus* complexet, hvor *A. thermomutatus* afveg en smule ved at have højere MIC-værdi end resten af complexet.

Ifølge de uofficielle breakpoints givet fra SSI kan *A. niger* og *A. flavus* complexet behandles med både Miconazol og Clotrimazol, og med *A. fumigatus* ville der med fordele kunne behandles med Clotrimazol, fordi samtlige arter er følsomme herfor.

Hvis man tager udgangspunkt i de officielle breakpoints, er der langt flere isolater under alle complexer, som er resistente.

Indholdsfortegnelse

Forord	1
Resumé	2
Baggrund.....	2
Metode.....	2
Resultater.....	2
Konklusion.....	3
Introduktion	6
Problemformulering	7
Målformulering.....	7
Teori.....	8
<i>Aspergillus</i>	8
Antimykotika.....	8
Resistens.....	9
Mutationer i <i>Aspergillus</i>	9
EUCAST-modellen.....	9
Breakpoints	10
ATCC	10
Dyrkning	10
MALDI-TOF-MS	11
Databaser.....	12
Brukers MALDI Biotyper Library	12
MSI	13
Materiale og metode.....	14
Materiale.....	14
Materialeliste til artsbestemmelse	14
Materialeliste til resistensbestemmelse	14
Metode.....	15
Artsbestemmelse	15
Resistensbestemmelse	18
Litteratursøgning	22
Resultater.....	23
Artsbestemmelse	23

Kvalitetskontrol	24
Isolat 34 og 45	26
Resistensbestemmelse	27
Kvalitetskontrol	27
MIC-værdier fordelt på complexer	27
S/I/R klassifikation af isolater	31
Diskussion.....	34
Artsbestemmelse	34
Kvalitetssikring af artsbestemmelsen.....	34
Fundne arter	34
MSI versus Bruker Biotyper Library.....	35
Isolat 34 og 45.....	35
Resistensbestemmelse	36
Kvalitetssikring af resistensbestemmelse.....	36
MIC Distribution.....	37
Itraconazol og Miljøresistens	38
SSI.....	38
Miconazol og Clotrimazol - standardbehandling	39
Terbinafin	40
Andre behandlingsmuligheder	40
Konklusion.....	42
Perspektivering.....	42
Arbejdsgangen for personalet.....	42
Hvad er næste skridt?	42
Overordnet	42
Sekventering	43
Referencer	44
Bilag	47

Introduktion

Svampe er en bred gruppe af eukaryote organismer, der inkluderer blandt andet gær-, hat-, og skimmelsvampe, hvoraf der findes 250.000 forskellige arter. De forekommer naturligt i miljøet og anvendes til dagligt i blandt andet fødevarerindustrien til produktion af øl, vin, oste og brød. Af de beskrevne svampe er cirka 500 patogener for dyr og mennesker. De kan hos mennesker forårsage mykoser, allergi og forgiftninger (1).

Verden over ses en stigning i incidensen af sygdomme forårsaget af svampe. Det anslås, at 1 ud af 6 danskere hvert år rammes af mykose. Dette skyldes blandt andet en stigende ældrepopulation, overlevelse af tidligere dødelige sygdomme og brug af immunsupprimerende medikamenter. Disse borgere har ofte det til fælles, at de har et svækket immunforsvar, hvilket gør dem mere modtagelige overfor infektioner generelt (2). En af de svampe som kan give anledning til mykoser hos mennesker er *Aspergillus*. I de fleste tilfælde giver den milde forløb. Dog kan der i visse tilfælde opstå livstruende mykoser, som tit medfører en høj morbiditet og en mortalitet på 30-50%, som stiger til 80-100% ved en azolresistent *Aspergillus* (3).

En udfordring i forbindelse med den stigende incidens af Aspergillose er den øgede risiko for udvikling af resistens. Desto mere antimykotika som gives generelt, desto større er risikoen for udvikling af resistens.

Holland er det land i verden med den største eksport af blomster. Generelt er landet kendt for dets mange planter, og der bruges azol-fungicider til at bekæmpe svampeinfektioner der kan vokse og sprede sig mellem planterne. Dette har resulteret i et stigende antal af patienter med svampe der er resistente overfor azoler. Forskere i Holland fandt forbindelser mellem azolresistens og Aspergillose ved mutationerne TR34/L98H og TR46/Y121F/T289A (4). Det anslås i dag at op mod 19% af *Aspergillus* infektioner i Holland, er forårsaget af azolresistente isolater (5). I Danmark er der påvist azolresistens hos 6,1% af positive fund af *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Hurtig og korrekt behandling af Aspergillose er med til at mindske risikoen for resistensudvikling (3). Antimykotikaresistens kan enten opstå hos patienter ved længerevarende antimykotika behandling, eller det kan opstå i miljøet, da der anvendes azolfungicider i landbruget for at undgå spredning af skimmelsvampe. Det blev i 2018 besluttet at starte en national overvågning af infektioner med *A. fumigatus*, da der i løbet af året var registreret 500 patienter diagnosen Aspergillose uden effektiv udkom med behandling af azoler.

På Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Aarhus Universitetshospital (KMA, AUH) blev der fra 2015 til 2021 fundet 834 øreprodninger positive for *Aspergillus* (Bilag 1). Disse prodninger stammer typisk fra patienter mistænkt for Otomykose. Positive fund identificeres i dag ud fra fænotypiske karakteristika og ved hjælp af Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) (6). På KMA besvares de positive fund på complex-niveau, da det er svært at få identificeret kryptiske arter af *Aspergillus* ved hjælp af Brukers MALDI Biotyper library, da dens referencedatabase er begrænset i forhold til svampe. De seneste par år er afdelingen begyndt at anvende en anden database MSI (Mass Spectrometry Identification Platform) til identifikation af svampe, da dens referencedatabase er væsentlig større. Normalvis svares der ud uden resistensbestemmelse, men afdelingen har ønsket at få arts- og MIC-bestemt øreprodninger fundet positive for *Aspergillus*, da dette ikke tidligere er gjort.

Formål

Formålet med at artsbestemme *Aspergillus* isolater fundet i ørepodninger ved hjælp af MALDI-TOF-MS og MSI-databasen er at undersøge, hvilke kryptiske arter der findes i ørerne. Formålet med resistensbestemmelse af disse isolater er at undersøge, hvorledes deres resistensmønster ser ud, da der, indtil i dag ikke er blevet lavet ret mange studier omkring dette. I dag behandles Otomykose normalt lokalt med Clotrimazol eller Miconazol. Det vides ikke, hvorvidt denne behandling er den optimale, da man ikke kender til de kryptiske arters resistensmønster. Dette kan være problematisk, da arterne under hvert complex kan have varierende følsomhed overfor antimykotika, hvilket også kan være en årsag til, at de praktiserende læger oplever recidiverende infektioner hos disse patienter (7).

Problemformulering

Hvilke *Aspergillus* arter fra ørepodninger, kan identificeres inden for *A. niger*, *A. fumigatus* og *A. flavus* complex ved hjælp af Brukers MALDI Biotyper og MSI-databasen, hvordan adskiller arternes resistensmønster sig fra hinanden og hvilken påvirkning har det på standardbehandlingen?

Målformulering

- Vi vil artsbestemme 50 isolater fra ørepodninger af slægten *Aspergillus* ved brug af Brukers MALDI Biotyper og anvendelse af databasen MSI.
- Vi vil udføre resistensbestemmelse på *Aspergillus* isolaterne ved brug af EUCASTs bouillonfortyndingsmetode med følgende antimykotika: Itraconazol, Clotrimazol, Miconazol og Terbinafin.
- Vi vil sammenligne resistensmønstre hos de fundne arter inden for hvert complex og sammenholde det med de givne breakpoints for de anvendte antimykotika.
- Vi vil, på baggrund af de opnåede resultater, vurdere hvorvidt den aktuelle standardbehandling for Otomykose er effektiv overfor de identificerede isolater.
- Vi vil undersøge, ved hjælp af andre studier, om der findes andre midler, der med fordel kan anvendes til behandling af Otomykose.
- Vi vil reflektere over, hvorvidt det vil gavne patienterne og KMA på AUH, at arts- og resistensbestemme samtlige positive fund af *Aspergillus* i ørerne.

Teori

Aspergillus

Under den franske revolution (1789) oplevede den 22-årige soldat, Jacques Thibault, smerte i ansigtet med hævede kindben og et udspring ved højre øje. Der blev fundet svampe puds, som fyldte store dele af hans ansigt. Dette er første gang en infektion, forårsaget af *Aspergillus*, blev registreret (8).

Aspergillus er en skimmelsvamp med en stor slægt bestående af omkring 250 arter inddelt i underslægter, som yderligere er delt ind i complexer bestående af tæt beslægtede arter (kryptiske arter) (9). Den forekommer naturligt i jord, planter, kompost, fugtigt hø og korn. Derudover kan svampen findes i husstande blandt husstøv, krydderier og enkelte fødevarer.

Aspergillus er en del af ascomycota rækken og er meget almindelige saprofytter, som kan finde voksesteder næsten overalt, så længe der er vand til stede.

Den har et veludviklet luftmycelium opbygget af hyfer, der forgrener sig dikotomt, samt konidioforer med vesikler, hvorpå ukønnede konidier dannes fra phialider (1). Den formerer sig, i de fleste tilfælde, ukønnet ved hjælp af konidier, hvilket er med til at gøre den overlevelsesdygtig, da sporerne er mange og små, hvilket gør, at de forbliver i luften. Det anslås, at alle mennesker inhalerer 10-100 sporer pr. kubikmeter luft hver dag (10).

Normalvis giver den ikke anledning til sygdom hos mennesker. De, som alligevel rammes af mykoser, er typisk personer med i forvejen svækket immunforsvar (11). De arter, som hyppigst forårsager mykoser hos mennesker, er *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus* og *Aspergillus niger* (*A. flavus* og *A. niger*) og forekommer oftest i nedre- og øvre luftveje (12).

Antimykotika

Antimykotika er midler, der bruges til at behandle både systematiske og superficielle mykoser.

Antimykotika kan inddeles i flere grupper, hvoraf der i dette projekt anvendes Itraconazol, Miconazol og Clotrimazol som er azoler og Terbinafin, som er et allylaminderivat.

Azoler er en gruppe af kemiske stoffer, der bruges til bekæmpelsen af mykoser; både hos mennesker, planter og dyr. Da *Aspergillus* forekommer naturligt i vores miljø, bruges der ofte azol-fungicider til bekæmpelsen. Azolers virkemekanisme gør, at de hæmmer syntesen af ergosterol, som udgør en stor del af svampens cellemembran. Dette er problematisk for svampen, da ergosterol spiller en vigtig rolle for "bulk" funktioner i cellemembranen, næringstransport og chitinsyntesen. Allylaminderivat er en anden gruppe af antimykotika, som oftest anvendes til behandling af dermatofytter. Det virker ved at hæmme en specifik squalenepoxydase som katalyserer et tidligt trin i svampenes ergosterol-biosyntese (1).

Resistens

Resistens betyder modstandskraft, når ordet anvendes i forbindelse med mikroorganismer, betyder det, at en given mikroorganisme har udviklet en modstandskraft mod en behandlingsform.

Resistens forbindes oftest med bakterier, men kan også opstå i svampe såsom *Aspergillus*.

Der findes to former for resistens: miljøresistens og erhvervet-resistens, hvor sidstnævnte er den form, som kan opstå spontant. Der er forskellige faktorer, som kan være skyld i erhvervet resistens. Oftest handler det om, at svampen har været udsat for et bestemt antimykotika over en længere periode, enten i form af længerevarende medicinsk behandling, eller i form af fungicide sprøjtemidler i landbruget. Ved at udsætte *Aspergillus* for antimykotika over en længere periode, er der risiko for, at der står spontane mutationer i svampen, som gør den resistent. Azolresistens er især problematisk, da azolholdige antimykotika er førstevalget ved behandling af mykoser, da det har en biologisk effekt (13).

Resistensudviklingen kan foregå på følgende måder:

- Ændringer af det enzym som er antimykotikumets target, således det ikke vil kunne binde sig til svampen, og dermed ikke vil kunne virke.
- Opregulering af enzymproduktionen i svampen, således der vil være flere enzymer til stede i cellen end det givne azolholdige antimykotika.
- Azolerne bliver fjernet fra cellen via en efflux-mekanisme fra plasmamembranen (3).

Mutationer i *Aspergillus*

Hvad angår miljø resistens i *Aspergillus* er der fundet frem til, at der i isolaternes gener er tandem repeats (TR), som giver en opregulering af target for azolerne (14). TR er derudover ofte kombineret med en eller flere punktmutationer, som på samme tid nedsætter affiniteten af azol til target. De mest udbredte kombinationer er TR34/L98H og TR46/Y121F/T289A (15).

Når man screener *Aspergillus* isolater for mutationer, anvender man normalvis VIPCHECK (16). I vores projekt har vi i stedet tilsat Itraconazol i en af rækkerne i mikrotiterpladen. Itraconazol kan påvise mutationstypen TR34/L98H, som er den mest almindelige miljøresistens og - ifølge overlægerne på Klinisk Mikrobiologisk afdeling - den hyppigst forekommende i Danmark.

EUCAST-modellen

Til at undersøge resistensmekanismer anvendes der på afdelingen en metode udviklet af European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST er en videnskabelig komite, der blev oprettet i 1997 af European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) og andre europæiske laboratorier (17). Formålet med komiteen er at standardisere og udvikle in vitro resistensbestemmelse af mikroorganismer; såsom bakterier og svampe. De er med til at ensarte procedurer og resultater fra laboratorier i Europa, hvilket er en fordel i forbindelse med forskning og studier.

Breakpoints

Breakpoints, der er anvendt i projektet, er blevet bestemt ud fra breakpoints fra EUCAST og SSI. Et breakpoint er en grænseværdi, hvorved der skilles om en mikroorganisme er sensitiv, intermediær eller resistent for et givent behandlingsmiddel.

EUCASTs breakpoints er valgt på baggrund af forskellige vildtypers "Minimal Inhibitory Concentration" (MIC), som de har vurderet egnet i forhold til de forskellige *Aspergillus* complexer. MIC-værdier fra EUCAST bestemmes ud fra svampe, som er indsamlet fra mennesker og dyr ved forskellige geografiske områder, over de seneste 70 år. Der er inkluderet svampe med både kendte og ukendte fænotypiske resistensmekanismer.

EUCASTs MIC distribution er på complex-niveau, hvilket gør at det inkluderer både svampe med og uden kendte fænotypiske resistensmekanismer (18).

Indtil nu er det kun Itraconazols breakpoints, som ligger tilgængelige på EUCASTs hjemmeside (19). Breakpoints for Miconazol og Clotrimazol er hentet fra SSI, som har fastsat dem ud fra deres egne kliniske erfaringer (20).

Der er ikke fastlagt breakpoints for Terbinafin fra hverken SSI eller EUCAST, men de vil oftest have en MIC-værdi under 1 mg/L, og anses derfor som værende sensitiv i langt de fleste tilfælde (20). Herudover er breakpoints for *A. niger* i forhold til Itraconazol heller ikke fastlagte, og MIC-værdien vil ofte være højere i forhold til de andre kryptiske arter.

MIC-værdierne fastlægges ved brug af en fortyndingsmetode med en faldende koncentration af antimykotika. Værdien fastsættes ud fra den koncentration, hvor svampen ikke har formoreret sig. MIC-værdien er den laveste koncentration som kan gives ved behandling. Bestemmelsen af MIC-værdien udføres ved brug af mikrotiterplader, hvori der skal medtages en ATCC stamme.

ATCC

Hver gang der udføres enten arts-, eller resistensbestemmelse, skal der medtages en kontrol. En ATCC (American Type Culture Collection) stamme er en referencestamme, som indsamles, opbevares og distribueres af en nonprofitorganisation med hovedkvarter i USA. Organisationen står for at indsamle ATCC stammer inden for en bred vifte af mikroorganismer, heriblandt *Aspergillus*. Stammen fungerer som en kontrol af de udførte procedurer og det anvendte udstyr, og er dermed med til at kvalificere svarene (21). Dette kan man gøre, da man har al viden omkring ATCC-stammens art, resistensmønstre og MIC-værdier. Hvis resultaterne for ATCC-stammen stemmer overens med de givne værdier, kan man gå ud fra, at ens resultater er valide. Det er EUCAST, som står for udvælgelsen og fastsættelsen af MIC-værdierne for disse kontrolstammer.

Dyrkning

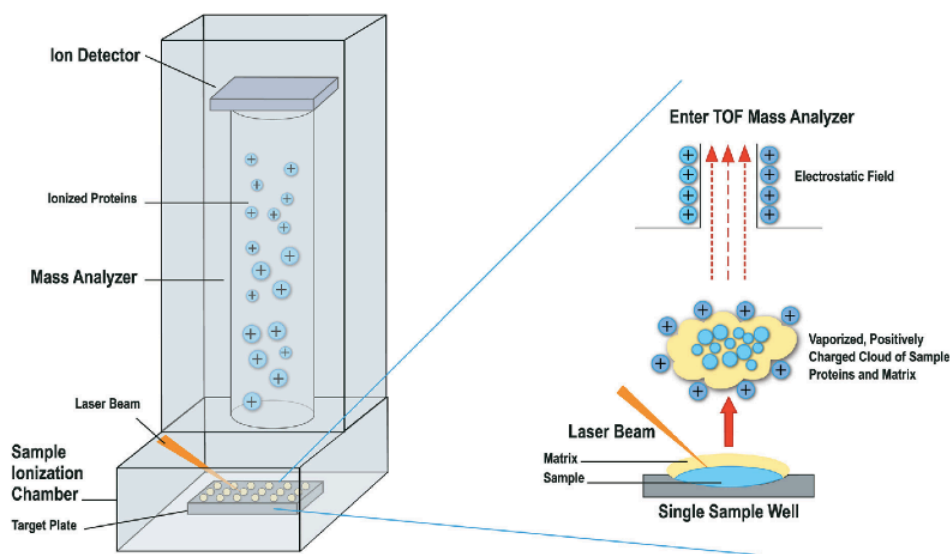
Podninger der skal undersøges for *Aspergillus* ankommer i et eSwab-glas. Podningen udsås på et selektiv Sabouraud medium (Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar fra Biomériux), som indeholder vækstmedie der passer bedst til svampe. Sabouraud-agar indeholder glukose, pepton og vand og er tilsat antibiotikaene Gentamicin og Chloramphenicol for at undgå vækst af bakterier. De tilsåede plader inkuberes ved 30 grader, da *Aspergillus* vokser bedst ved temperaturer mellem 10-40 grader og en pH-værdi mellem 4-8. Svampene vokser bedst aerobt, men mange kan også vokse anaerobt (22).

Artsbestemmelsen skal ske inden for 2-3 døgn, da der på dette tidspunkt er en god fordeling mellem sporer og hyfer, hvis proteiner MALDI-TOF-MS anvender til at danne et spektrogram. Det er sværere at identificere skimmelsvampe ved brug af MALDI-TOF, i forhold til bakterier og gærsvampe. Gærsvampe og bakterier er enkeltcellede organismer, mens *Aspergillus* derimod er en flercellet, eukaryotisk organisme med en tyk cellevæg. Væggen er hovedsageligt opbygget af et polysakkarid (kitin), hvilket gør, at svampen er mere modstandsdygtig end andre organismer med cellevægge, så som planter der har cellevægge opbygget af cellulose (23). De opdyrkede isolater bliver derfor forbehandlet med 70% ethanol for at fjerne agar og vand og dernæst 70% myresyre og acetonitril, inden de kommer på en analyseplade for at få nedbrudt cellevæggen og dermed få blotlagt proteinerne.

Hvad angår resistensbestemmelsen, så skal isolaterne dyrkes i min. 5 døgn, inden den foretages, da det primært er sporerne, som skal anvendes. Grunden til man primært anvender sporer, er at det er nemmere at standardisere sporer end hyfer og at sporer vokser hurtigere, end hyferne gør.

MALDI-TOF-MS

Til artsbestemmelse anvendes Matrix Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Det er en analysemetode, hvorpå man kan identificere mikroorganismer, primært bakterier og svampe, ved hjælp af massespektrometri. Svampen påsættes en ledende analyseplade med 96 spots. Spotsene påsættes en matrix, som får dem til at krystallisere. I apparatet rammes spotsene med en laserstråle, som får de intracellulære proteiner til at ionisere og komme på gasform. Inde i apparaturet er et elektrisk spændingsfelt og et vakuum rør, hvor de ioniserede proteinmolekyler flyver igennem og detekteres af en detektor i enden som ses på billede 1. De små og lette molekyler flyver hurtigst og registreres først, og de tungere og større molekyler flyver langsommere og registreres efter. I takt med at proteinmolekylerne registreres dannes et spektrum som er unikt for hver mikroorganisme, et slags fingeraftryk (22).



Billede 1: MALDI-TOF mass spectrometer (24).

Databaser

Det spektrum der dannes ved hjælp af MALDI-TOF-MS overføres til en database, hvor det sammenlignes med andre referencespektre. Herefter gives en score, som er en indikation for, hvor stor sammenlignelighed der er mellem det dannede spektrum og referencen. Ved højere score vil der være større sandsynlighed for, at den foreslåede slægt/art er korrekt. Disse referencespektre er dannet på baggrund af, at producenten har sekventeret, evalueret og udvalgt således forskellige populationer inden for arterne er repræsenteret.

Brukers MALDI Biotyper Library

Brukers MALDI Biotyper Library består af 3329 arter, fordelt på 593 mikroorganisme slægter, hvoraf 180 er Ascomyceter, Basidiomyceter og Zygomyceter (filamentøse svampe) (25). Databasen giver en score fra 0,000-3,000, hvor sidstnævnte er den bedste score, som kan tildeles. Grænserne for inddelingen kan ses i tabel 1a, hvorefter arterne inddeles i kategorier, som ses i tabel 1b. På KMA accepteres resultater for skimmelsvampe der er $\geq 1,7$, hvilket svarer til complex-niveau. Dette projekt er udført på Brukers apparatur, da MSI-databasen er baseret på data fra Bruker.

Meaning of Score Values

Range	Description	symbols	color
2.300...3.000	Highly probable species identification	(+++)	green
2.000...2.299	Secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700...1.900	Probable genus identification	(+)	yellow
0.000...1.699	Not reliable identification	(-)	red

Tabel 1a: Brukers definition på hvad de forskellige scorer betyder.

Meaning of Consistency Categories (A-C)

Category	bety Description
A	Species Consistency: the best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the genus as the first one
B	Genus Consistency: the best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (please check for synonyms of names or microbial mixture)

Tabel 1b: Brukers definition for hvad A, B og C står for.

MSI

MSI er et software, der bygger på den belgiske svampedatabase, BCCM/IHEM, der er en samling af 1200 forskellige arter af filamentøse svampe.

Som bruger kan man uploade et spektrum af en svamp, målt via Brukers MALDI Biotyper, hvor spektrene efterfølgende sammenlignes med de spektre, der ligger i databasen (26).

Så snart data er uploadet, giver softwaren 3 bud (first identified species, second identified species og third identified species). Det uploadede spektrum tildeles en score alt afhængig af dens lighed i forhold til referencerne. Scorens størrelse samt afstanden til "second identified species" afgør, hvorvidt den fundne art er identificeret på arts-, complex-niveau eller ikke identificeret, som det ses i tabel 2, og vil man se de arter, der har fået næsthøjeste score, kan man tilgå et detaljeret view.

Legend of indice		
Indice	Identification	Test made
A	Up to species	(1st score > 22 and 2nd score >20 and 1st-2nd>8) or (1st>20 but<=22 and and 1st-2nd>2)
B	Up to complex	(1st score > 22 and 2nd score >20 and 1st-2nd <8) or (1st>20 but<=22 and and 1st-2nd<2)
C	Unrelevant	(1st and 2nd score <20)

Tabel 2: På billedet ses hvorledes en score, fra et spektrum uploadet til MSI, tolkes i forhold til arts- eller complex-niveau og indeles i indices (kategorier).

Materiale og metode

Materiale

Materialeliste til artsbestemmelse

Til udførelsen af artsbestemmelse har vi anvendt materialer som beskrevet i afdelingens vejledning "5.2 Skimmelsvampe - identifikation vha. Bruker MALDI-TOF/ MSI-database" (27) samt 50 isolater fra ørepodninger. I tabel 3 er der noteret LOT- og serienumre på de anvendte reagenser og apparatur.

	Serie/LOT-nr
Sabouraud plade med Gentamicin og Chlorampenicol (SGC2, biomériux)	3228554 3255062
Ethanol 70%	PR4020261
Myresyre 70%	K48532664707
Acetonitril	J3445
Vortex (Thermo Scientific Heraeus Pico 21 Centrifuge)	99499 og 12613
Centrifuge (Heidolph REAX 2000) Centrifuge (Desaga SARSTEDT-GRUPPE MM1)	41721369
Bruker MALDI-TOF-MS	26995601359

Tabel 3: Liste over serie- og LOT numre på reagenser og anvendt apparatur.

Materialeliste til resistensbestemmelse

Til udførelsen af resistensbestemmelse har vi anvendt materialer som beskrevet i afdelingens vejledning "5.3 Skimmelsvamp - MIC bestemmelse" samt 50 isolater fra ørepodninger (28). I tabel 4 ses serienumre på anvendt apparatur til resistensbestemmelsen.

	Serie nr
Platform Røcker (vippebræt)	R000104330
ELISA Reader Thermo Scientific Multiskan FC	357-904997

Tabel 4: liste over serienumre og apparaturer anvendt til resistensbestemmelse.

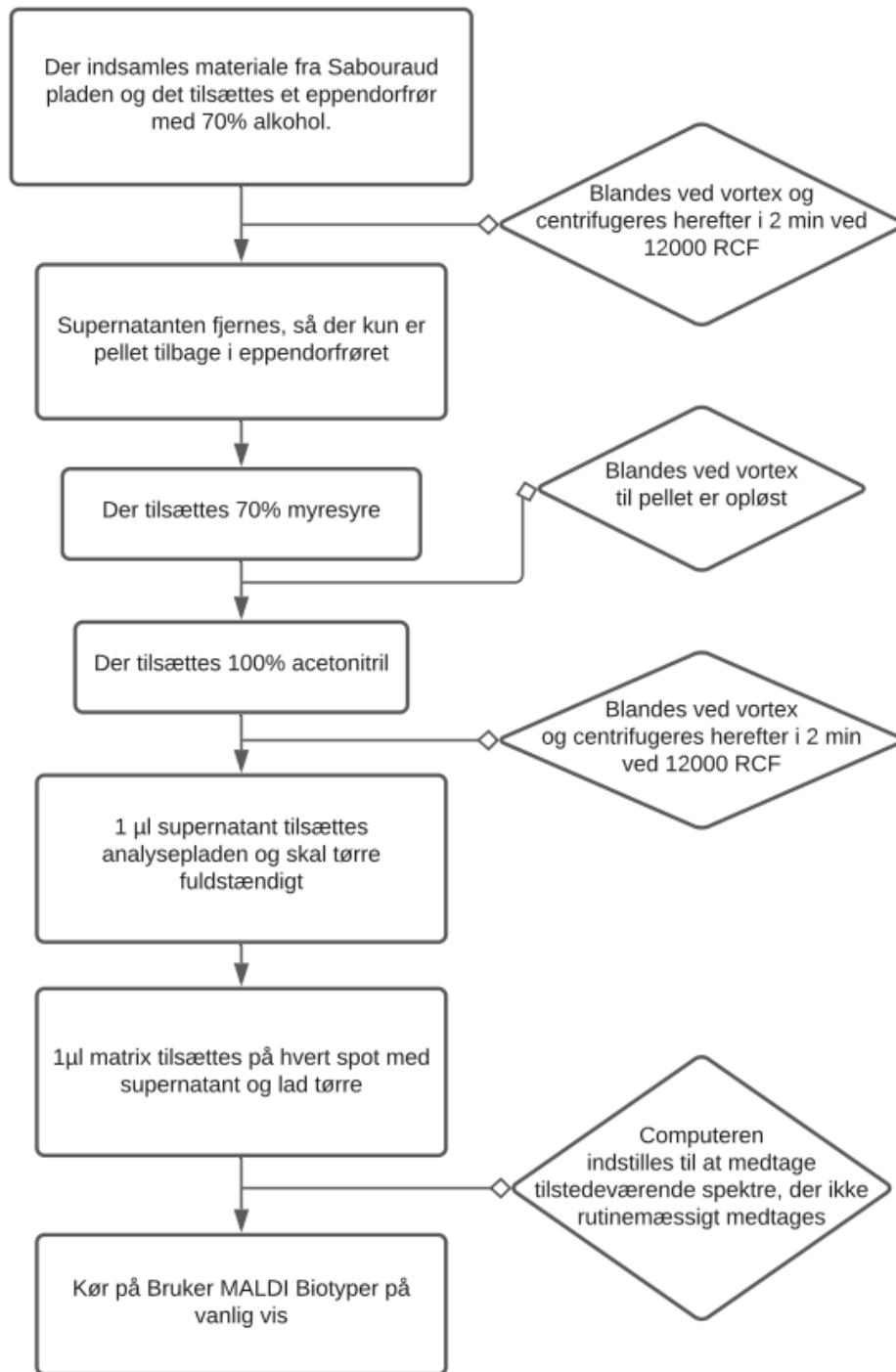
Metode

Vi har undersøgt 50 isolater fra nedfrosne ørepodninger. Isolaterne blev udvalgt med henblik på at skabe en variation, således resultaterne af undersøgelsen blev repræsentative. De 50 isolater blev valgt, således tre complexer var repræsenteret: *A. fumigatus*, *A. niger* og *A. flavus*, således der var ca. $\frac{1}{3}$ af hvert complex. Ud over navne på complexerne har vi ikke på forhånd haft kendskab til hvilket nummer de forskellige isolater blev tildelt. Derfor har det været nødvendigt at registrere alt, hvad der blev foretaget i forbindelse med undersøgelsen. Dette kan ses i bilag 5.

Afdelingen havde gjort opmærksom på, at der skulle tages forholdsregler ved arbejde med *Aspergillus*. Alt håndtering af isolaterne har været med engangshandsker i et stinkskab. Der blev anvendt et lettere fugtigt underlag, som Sabouraud pladen blev placeret på, i tilfælde af sporer i låget. Der blev skiftet underlag og handsker, hver gang et nyt isolat blev håndteret, for at undgå kontaminering.

Artsbestemmelse

Artsbestemmelsen blev udført i henhold til afdelingens vejledning "5.2 Skimmelsvampe - identifikation vha. Bruker MALDI-TOF/ MSI-database" (27). For at få et bedre overblik, havde vi også lavet et flowdiagram, som kan ses i figur 1.

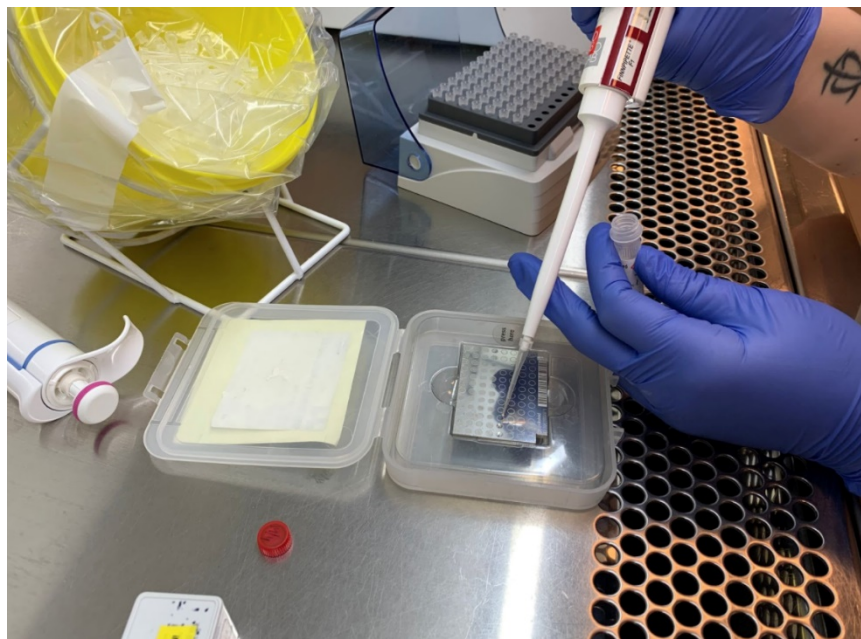


Figur 1: Flowdiagram over udførelsen af artsbestemmelse. De firkantede kasser viser når der i eppendorfrøret bliver tilsat reagens eller fjernet supernatant, og de rødeformede kasser viser trinene imellem.

50 Isolater blev udsået på selektive Sabouraud plader med gentamicin og chloramphenicol, hvorefter de inkuberede i 3 døgn i et varmeskab ved 30 grader. Udsåningen skete på to forskellige dage, for at opnå rette forhold mellem hyfer og sporer. Materiale, fra fremvoksede Isolater, opløstes i 70% ethanol, blandes ved vortex og blev centrifugeret ved 2 min 12000 Relative

Centrifugal Force (RCF), hvorefter supernatanten blev fjernet. I den forbindelse var det vigtigt at have styr på hvor pellet blev dannet, da nogle *Aspergillus* isolaterne var svagt pigmenteret. Det var vigtigt at pellet ikke blev afpipetteret, da den bestod af proteinerne.

Herefter blev 40 μ L 70% myresyre tilsat og sammen med suspensionen vortexes så pellet blev opløst. Efterfølgende tilføjedes 40 μ L acetonitril. Suspensionen blev centrifugeret i yderligere 2 minutter ved 12000 RCF. Efterfølgende blev 1 μ L supernatant afpipetteret over på analysepladen på de fire først ledige spots. Da de var tørre, blev der påsat matrix, som ses på billede 2. For hver analyseplade blev der påsat en ATCC-stamme (*A. fumigatus* ATCC 404305). Pladen blev efterfølgende analyseret på Bruker MALDI Biotyper og data blev gemt på en USB-nøgle. Data blev uploadet til MSI databasen og ATCC-stammen blev kontrolleret

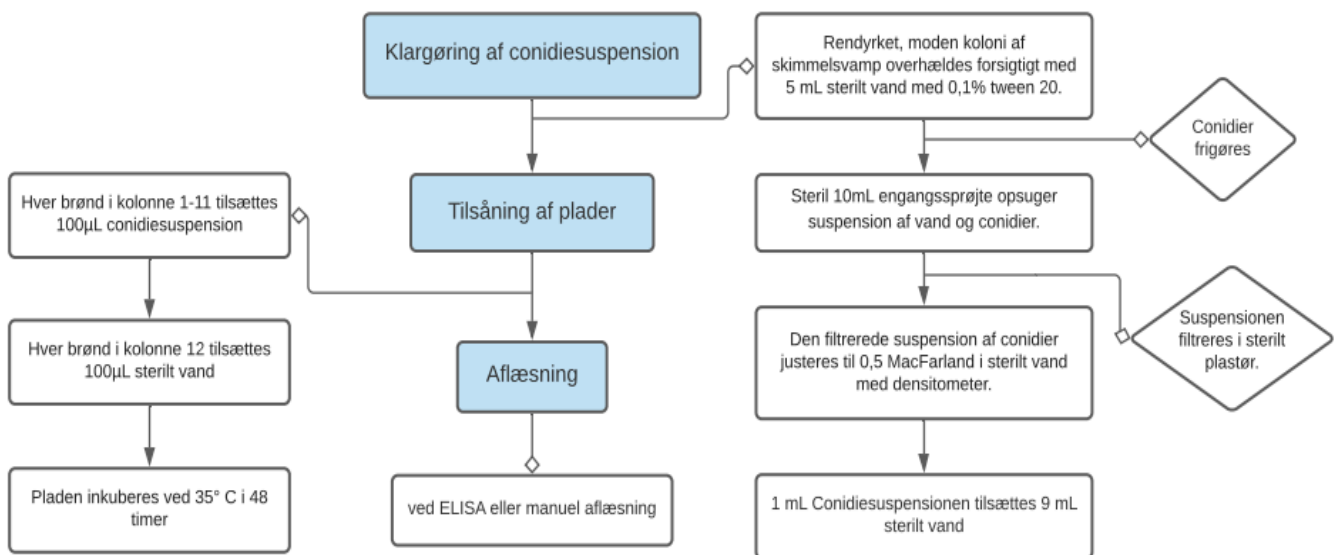


Billede 2: Påsætning af Matrix på analysepladen

Resistensbestemmelse

Til resistensbestemmelsen blev Miconazol og Clotrimazol inddraget, da de udgør standardbehandlingen i dag. Itraconazol blev medtaget for at screene for mutationerne TR34/L98H og TR46/Y121F/T289A. Terbinafin benyttes på nuværende tidspunkt til behandlingen af dermatofytter, derfor blev det inddraget, fordi det kunne tiltænkes at være et andet behandlingsmiddel for Otomykose.

Resistensbestemmelsen blev udført i henhold til afdelingens vejledning "5.3 - Skimmelsvamp - MIC bestemmelse som tager udgangspunkt i EUCASTs vejledning" (21). På figur 2 ses et flowdiagram over processen.



Figur 2: Et flowdiagram over proceduren for resistensbestemmelsen, hvor de blå områder viser de forskellige trin, man skal igennem og de hvide uddyber måden hvorpå det gøres

Ved resistensbestemmelsen blev alle isolater udsået på en selektiv Sabouraud plade med Gentamicin og Chlorampenicol. Pladerne blev inkuberet i varmeskab ved 30 grader i 5 døgn, for at opnå et tilstrækkeligt antal konidier, da det er konidierne som blev anvendt.

Før udførelsen af resistensbestemmelsen blev der klargjort konidiesuspensionen for alle isolater. 5 mL steril vand blev tilsat to dråber 0,1% tween 20, derefter overhældt på den dyrkede koloni af *Aspergillus* og gnubbet med en steril vatpind, således konidierne blev frigjort i blandingen.

Suspensionen blev suget op ved hjælp af en steril sprøjte og filtreret gennem et sterilt filter med en porediameter på 11 µm ned i et sterilt rør, for at fjerne hyferne og give en suspension af konidier. Der blev efterfølgende brugt et densitometer for at opnå en MacFarland 0,5 (referenceintervallet strækker sig over 0,45-0,55 MacFarland).

Mikrotiterpladerne blev fremstillet i samarbejde med bioanalytikerne og lægerne på afdelingen ud fra EUCASTs metode, og lagt i en -80°C fryser. En time før anvendelse blev de lagt på vippebræt til optøning.

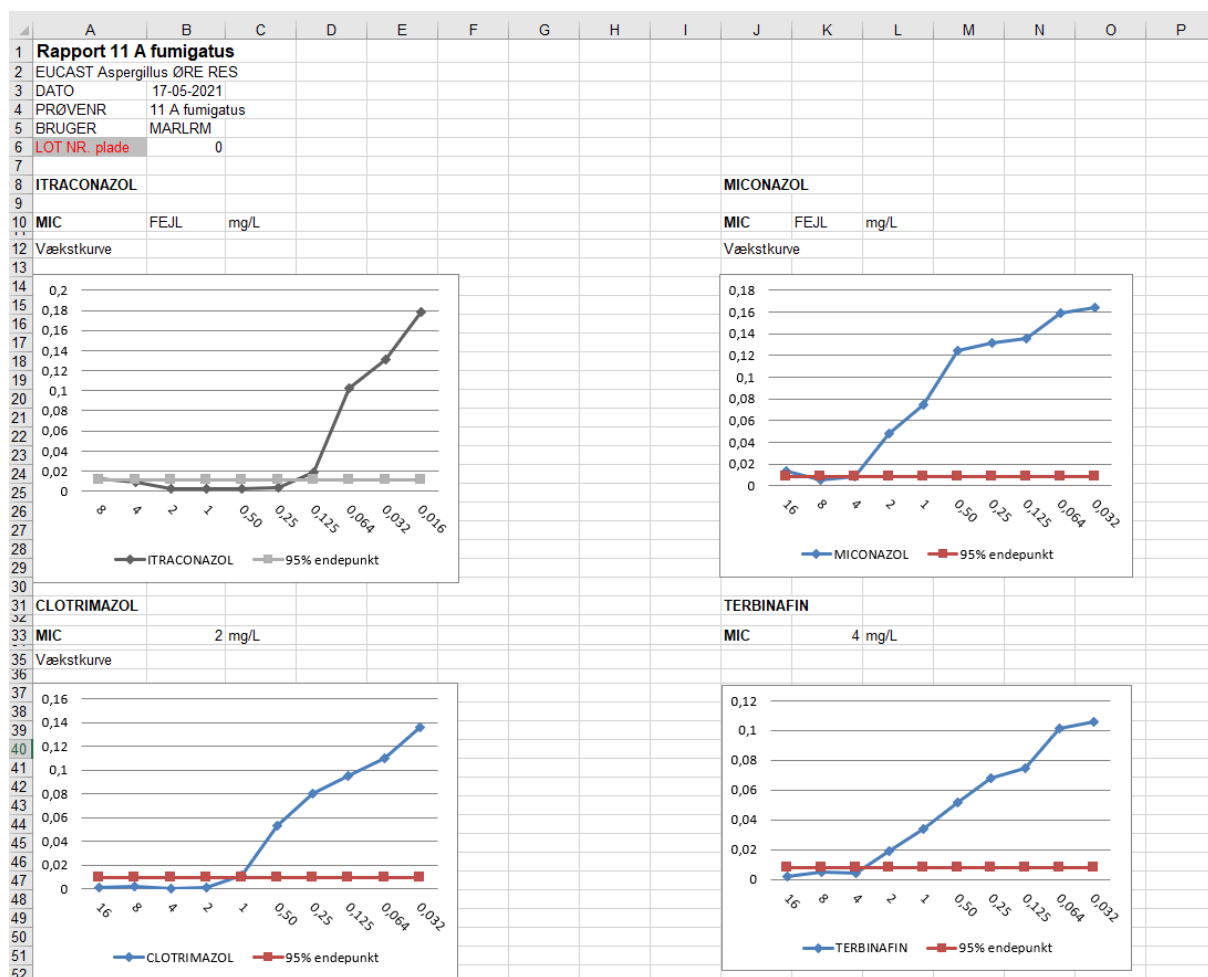
Konidiesuspensionen blev udsået inden for 30 minutter, for at undgå yderligere vækst og forhøjet MacFarland. Mikrotiterpladerne bestod af 96 (8x12) brønde med faldende koncentrationer af 4 forskellige antimykotikum: Itraconazol, Clotrimazol, Miconazol og Terbinafin.

Brønd nr. 11 var en vækstkontrol, da den ikke indeholdte antimykotika og nr. 12 var en negativ kontrol, da den indeholdt sterilt vand (bilag 2).

Der afpipetteredes 100 µL af suspensionen i hver brønd fra 1-11 og sterilt vand i brønd 12. Der blev anvendt en ATCC-stamme (ATCC 204304 *A. flavus*) pr dag.

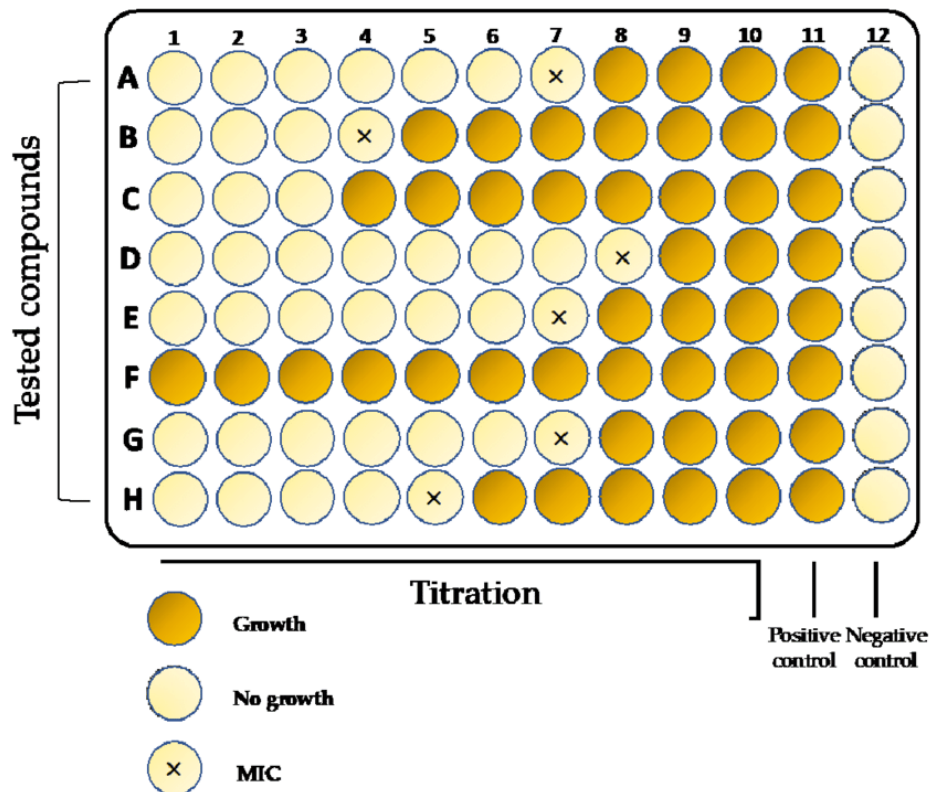
Pladen inkuberedes ved 35°C og blev aflæst i 47-49 timer efter udsåning.

Overlæge Jan Gertsen har fremstillet et excel-program kaldet "EUCAST *Aspergillus* Calculator Lokalmidler ØRE", hvor de givne OD-værdier blev plottet ind og efterfølgende gav en grafisk aflæsning med isolaternes MIC-værdier. På billede 3 ses et eksempel på hvordan graferne, fremstillet ved hjælp af ELISA og excel så ud. Graferne viser antimykotika koncentrationen ud af x-aksen og vækstkurven op af y-aksen. Kurven illustrerer, hvordan væksten af svampen stiger i takt med, at koncentrationen af antimykotikummet falder. Koncentrationen til venstre for, hvor kurven krydser 95% endepunktlinjen blev bestemt som isolatens MIC-værdi.



Billede 3: Et flowdiagram over proceduren for resistensbestemmelsen, hvor de blå områder viser de forskellige trin, man skal igennem og de hvide uddyber måden hvorpå det gøres.

Som udgangspunkt blev den grafiske aflæsning brugt, men ved fejlmelding i dokumentet, benyttes visuel aflæsning af resistensbestemmelse. En fejlmelding skyldtes, at kurven krydsede 95% endepunktet to gange, hvilket gjorde, at programmet ikke kunne fastlægge en MIC-værdi. Den visuelle aflæsning foregik ved brug af Sensititre Manual Viewer. Det blev gjort ved at notere, for hvert antimykotikum, hvornår der begyndte at være vækst i brøndene. Brønden, inden den første brønd med vækst, blev noteret og koncentrationen deri blev MIC-værdien, som ses på billede 4. Der blev foretaget en triplel-bestemmelse ved den visuelle aflæsning (bilag 2).



Billede 4: En mikrotiterplade, hvor alle 96 brønde ses. Ved manuel aflæsning, vurderes der efter hvornår første klare brønd er i hhv. til tal og bogstaverne (29).

Efter aflæsning af MIC-værdier blev ATCCernes MIC-værdier noteret. De anvendte ATCC grænseværdier for Terbinafin blev fastsat af EUCAST (30), mens værdierne for Itraconazol, Miconazol og Clotrimazol var fastsat af afdelings overlæger (bilag 2). De fastsatte værdier kan ses i tabel 5.

	ATCC 204304 <i>A. flavus</i>
Itraconazol	0.064-0,5 mg/L
Clotrimazol	1-2 mg/L
Miconazol	2-4 mg/L
Terbinafin	0,25-1 mg/L

Tabel 5: MIC-værdierne som den anvendte ATCC stamme skal ligge inden for.

Det blev undersøgt, hvorvidt isolaterne var azolresistente ved aflæsning af Itraconazols MIC-værdier. Grænseværdierne blev givet af overlæge Lise Kristensen og overlæge Jan Berg Gertsen. De er baseret på lægernes egne erfaringer i henhold med videnskabelige artikler, som kan ses i tabel 6. Hvis MIC-værdierne overstiger grænseværdierne, kan der være tale om en mutation.

	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol
TR34 L98H	>16 mg/L	2-4 mg/L	0,5 mg/L
TR46 Y121F T289A	0,5 mg/L	>8 mg/L	0,25-0,5 mg/L

Tabel 6: Oversigt over hvilke værdier, der skal være gældende inden for de forskellige antimykotika ved mutationen.

Breakpoints

Grundet de registrerede MIC-værdier blev der skrevet en mail til SSI med en forespørgsel omkring opdaterede breakpoints. Dette resulterede i, at der blev fremsendt nogle endnu uofficielle breakpoints, hvor også Terbinafin var inkluderet (Bilag 3). Videre i rapporten vil de breakpoints vi havde fra start, blive skrevet som officielle og de vi har fået tilsendt af SSI skrevet som uofficielle. MIC-værdierne blev sammenholdt med både de uofficielle og officielle breakpoints fra SSI, som ses i hhv. tabel 7 og 8, samt breakpoints fra EUCAST, hvorefter det blev vurderet, hvorvidt isolaterne var sensitive (S), intermedieære (I) eller resistente (R) over for det givne antimykotika.

Uofficielle breakpoints

	S	I	R
Itraconazol*	≤ 1	-	>1
Clotrimazol	≤1	2-8	>8
Miconazol	≤2	4-16	>16
Terbinafin**	≤1	2-8	>8

Tabel 7: Oversigt over grænseværdier givet fra SSI, hvor terbinafin er inkluderet.

*Breakpoint eksisterer ikke for *A. niger complex*

** Terbinafin findes både som tablet og topikal behandling. i kategorien (Susceptible, increased exposure) gælder udelukkende for topikale behandlinger, hvorved koncentrationen på infektionsstedet bliver langt højere end ved tabletbehandling (10.000 mg/g creme, men serumkoncentrationer sjældent overstiger 1 mg/L ved systematisk behandling) henvises til bilag 3.

Officielle breakpoints

	S	I	R
Itraconazol*	≤ 1	-	>1
Clotrimazol	≤ 1	2	>2
Miconazol	≤ 1	2	>2
Terbinafin	-	-	-

Tabel 8: Oversigt over breakpoints på de anvendte antimykotika i projektet.

*Breakpoint eksisterer ikke for *A. niger complex*

Litteratursøgning

Til at søge litteratur til opgaven er der indledningsvis anvendt bevidst tilfældig søgning, som blev brugt til at søge baggrundsviden og til at finde nøgleord, som efterfølgende blev brugt til systematisk søgning. Den systematiske søgning foregik primært på Pubmed, da vi vurderede, at den søgemaskine henvender sig bedst biomedicinske og biovidenskabelige rapporter. Den systematiske søgning var afgrænset til nyere artikler inden for de seneste 10 år med enkelte undtagelser. Vi har brugt kombinatorik ved brug af "AND" og vi har også filteret nogle af vores søgninger, så artikler fra før 2015 er sorteret fra, samt filteret "full text" så vi kun fik artikler frem, hvor vi havde hele artiklen tilgængelig.

Udover Pubmed brugte vi også e-dok (e-dok.rm.dk) og google (google.dk), samt bøger fra tidligere pensum og andre bøger, vi har haft hjemme. I bilag 4 kan tabeller med fremsøgt litteratur ses.

Resultater

Dette afsnit vil tage udgangspunkt i vores rådata. Der vil inddrages tabeller og billeder som giver et visuelt billede af resultaterne.

Artsbestemmelse

I dette afsnit vil vi fremføre de resultater, vi er kommet frem til i forhold til artsbestemmelsen. Som det første vil nedenstående afsnit indeholde resultaterne af kvalitetskontrollerne. Herudover vil vi, ved hjælp af tabeller og figurer, illustrere hvilke arter, vi har identificeret under hvert complex. Herudover vil vi, ved hjælp af makroskopiske billeder, vise morfologien på arterne tilhørende *A. niger* complexet, som vi senere vil anvende nede i diskussionen.

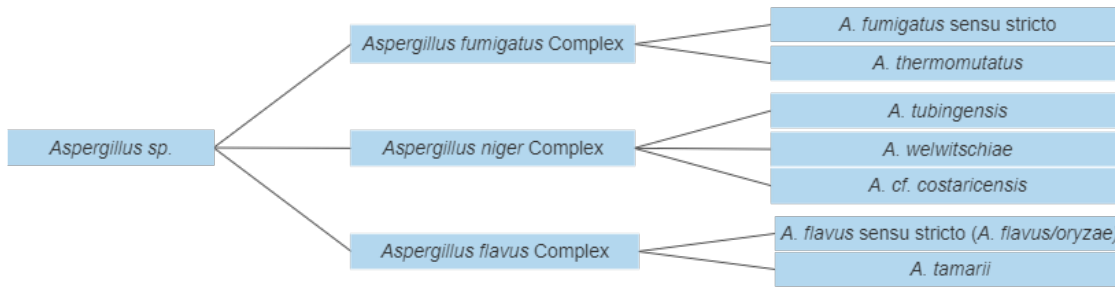
Kvalitetskontrol

I nedenstående, tabel 9, ses resultaterne af de ATCC stammer, vi har artsbestemt ved hjælp af samme procedure som projektets andre isolater.

Kvalitetskontrol af artsbestemmelse				
<i>A. fumigatus</i> (ATCC 204305)				
Dato	Kørsel	ID	Score	Indice
09-04-2021	1.	<i>Exophiala spinifera</i>	20,14	A
09-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	25,14	A
09-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	31,35	A
09-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	35,12	A
09-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	22,13	A
09-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	27,88	A
09-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	20,08	A
09-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	32,56	A
12-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	14,47	C
12-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	35,1	A
12-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	39,21	A
12-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	42,46	A
12-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	37,8	A
12-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	36,22	A
12-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	36,83	A
12-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	40,62	A
15-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	59,9	A
15-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	53,43	A
15-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	45,83	A
15-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	36,86	A
23-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	32,76	A
23-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	23,66	A
23-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	20,33	A
23-04-2021	1.	<i>A. fumigatus</i>	35,84	A
23-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	19,78	C
23-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	26	A
23-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	24,94	A
23-04-2021	2.	<i>A. fumigatus</i>	32,88	A

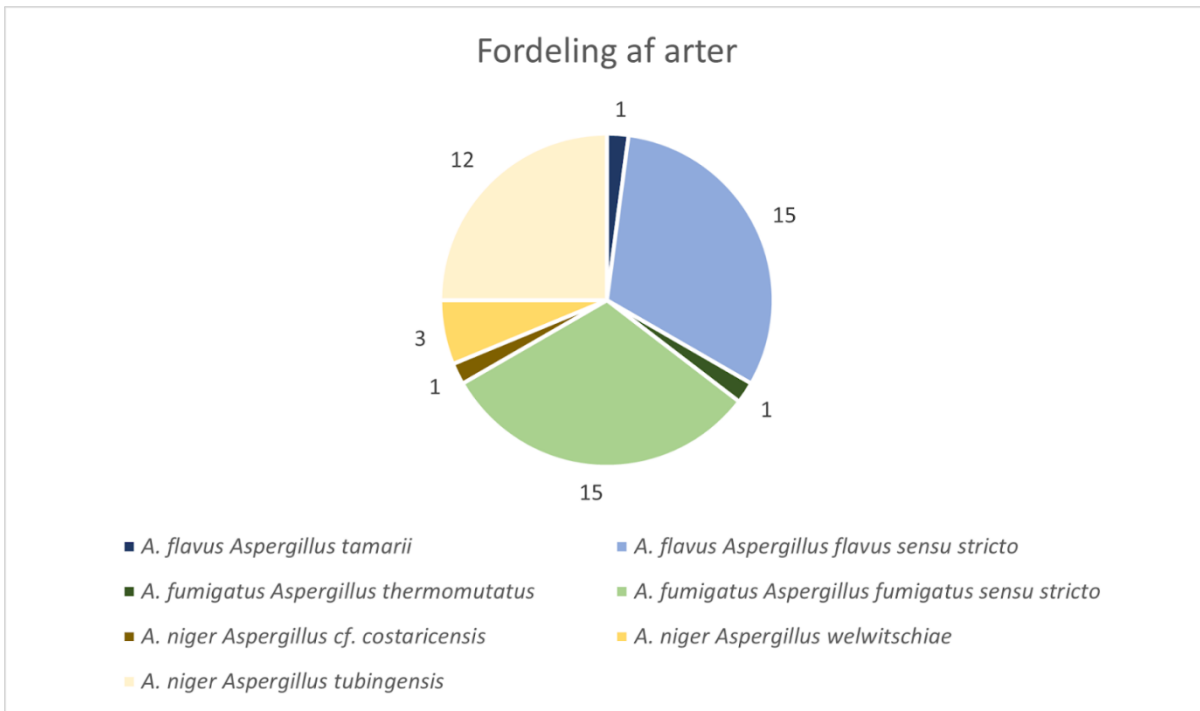
Tabel 9: A. Resultatet af ATCC 204305 *A. fumigatus* analyseret på Bruker MALDI Biotyper

Vi kunne ved hjælp af MALDI-TOF-MS og MSI-databasen identificere syv forskellige arter under vores tre complexer. Ud af 50 isolater var det muligt at identificere 48 på artsniveau og to på complex-niveau. På figur 3 ses et fylogenetisk træ, som illustrerer hvilke arter, der blev fundet. Nedenstående tabel og figur er udarbejdet med udgangspunkt i data fra bilag 5.



Figur 3: Oversigt over hvilke Aspergillus arter der blev identificeret ved hjælp af MALDI-TOF-MS og MSI-databasen.

Fordelingen af de 48 isolater, som blev artsbestemt ses i figur 4.



Figur 4: Et cirkeldiagram af isolater som, blev artsbestemt, angivet i antal af fundne arter og inddelt i farvekoder.

Hvert isolat fik en score på henholdsvis Brukers MALDI Biotyper og MSI og blev fordelt i kategorierne artsniveau, complex-niveau eller irrelevant. I tabel 10 ses distributionen af kategorier (A, B og C) over de tre *Aspergillus* complexer.

	Isolatdistribution over kategorier						Farvekoder (kategorier)	
	Bruker			MSI				
<i>A. fumigatus</i> complex	1	7	8	16	0	0	Artsniveau	A
<i>A. flavus</i> complex	0	7	9	16	0	0	Complexniveau	B
<i>A. niger</i> complex	0	6	12	16	2	0	Irrelevant	C
Isolat 34	0	0	1	0	1	0		
Isolat 45	0	0	1	0	1	0		
Samlet	1	20	29	48	2	0		

Tabel 10: Oversigt over antallet af isolater der er fundet i henholdsvis arts-, og complex samt ikke fundet slægt på Bruker MALDI biotyper Library og MSI database.

Isolat 34 og 45

Vi havde udfordringer med artsbestemmelse af isolat 34 og 45, og derfor er der inkluderet et detaljeret view fra MSI samt billeder, som viser isolater fra *A. niger* complexet makroskopisk I figur 5 og 6 ses et detaljeret view af isolat 34 og 45.

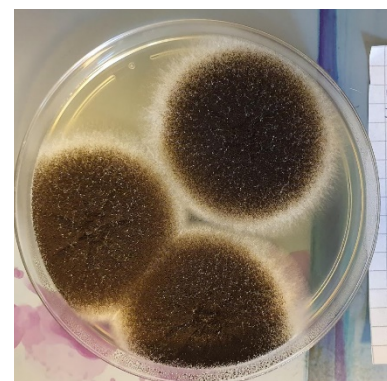
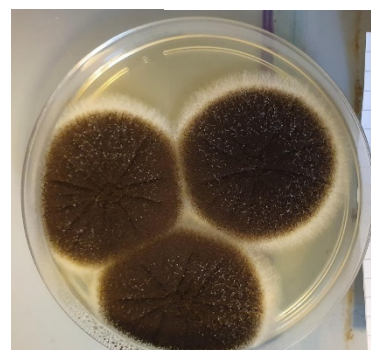
S%	Species
33.55	<i>Aspergillus niger</i>
30.0	<i>Aspergillus niger</i>
28.03	<i>Aspergillus welwitschiae</i>
25.41	<i>Aspergillus welwitschiae</i>
25.35	<i>Aspergillus niger</i>

Figur 5: MSI detaljeret view af isolat 34.

S%	Species
37.71	<i>Aspergillus niger</i>
33.67	<i>Aspergillus welwitschiae</i>
30.63	<i>Aspergillus niger</i>
29.54	<i>Aspergillus welwitschiae</i>
28.52	<i>Aspergillus niger</i>

Figur 6: MSI detaljeret view af isolat 45.

På billede 5.a-e ses fem af vores isolater fra *A. niger* complex makroskopisk, hvoraf billede 5.d og 5.e er de to isolater, der ikke kunne artsbestemmes.

Billede 5a: Isolat 39
A. niger complex
A. cf. castaricensisBillede 5b: Isolat 36
A. niger complex
A. tubingensisBillede 5c: Isolat 47
A. niger complex
A. welwitschiaeBillede 5d: Isolat 45
A. niger complexBillede 5e: Isolat 34
A. niger complex

Resistensbestemmelse

I dette afsnit vil vi fremføre de resultater, vi er kommet frem til i forhold til resistensbestemmelsen. Dette inkluderer, udover kvalitetskontrol, diagrammer af de bestemte MIC-værdier fordelt på complexer, samt detaljerede tabeller af S/I/R-klassifikation af vores isolater fordelt på complexer.

Kvalitetskontrol

I nedenstående tabel 11 ses resultaterne for de ATCC stammer, som vi har bestemt MIC-værdier for ved hjælp af samme procedure som projektets øvrige isolater.

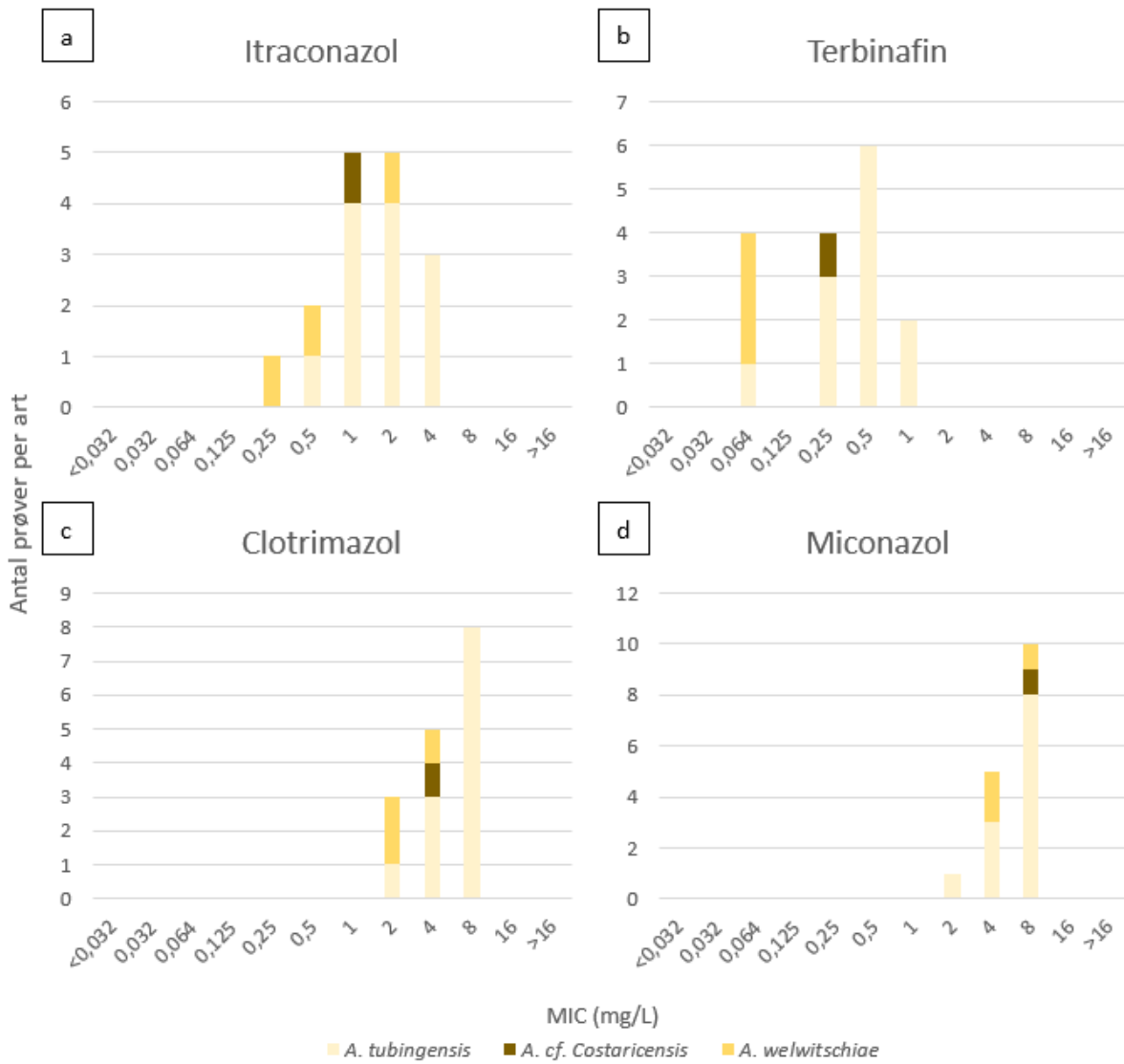
Kvalitetskontrol af resistensbestemmelse			
<i>A. flavus</i> (ATCC 204304)			
Kvalitetskontrol	Batch 1 (23-03-21)		Batch 2 (16-04-21)
	14-04-2021	15-04-2021	21-04-2021
Itraconazol (0,064-0,5 mg/L)	0,064 mg/L	0,25 mg/L	0,25 mg/L
Clotrimazol (1-2 mg/L)	1 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
Miconazol (2-4 mg/L)	2 mg/L	4 mg/L	4 mg/L
Terbinafin (0,25-1 mg/L)	0,25 mg/L	0,25 mg/L	0,25 mg/L
Isolatnumre taget	17,18,33	3,4,5,6,7,16, 19,20,36,37, 38,39,41,42, 45	1,2,8,9,10,11,12,1 3,14,15,21,22,23,2 4,25,26,27,28,29,3 0,31,32,34,35,40,4 3,44,46,47,48,49,5 0
Manglende positiv kontrolfelt	2,8,10,13,14,23,24,25,26,27,28, 29,30,31,34,35,44,46,47		
Vækst i negativ kontrolfelt	40		

Tabel 11: Kontrol over proceduren med ATCC 204304. Der brugt 2 forskellige batches af mikrotiterpladerne: batch 1 fremstillet d. 23-03-21 og batch 2 fremstillet d. 16-04-21. Isolatnumrene indikerer hvilke isolater der er udsået i hvilket batch.

MIC-værdier fordelt på complexer

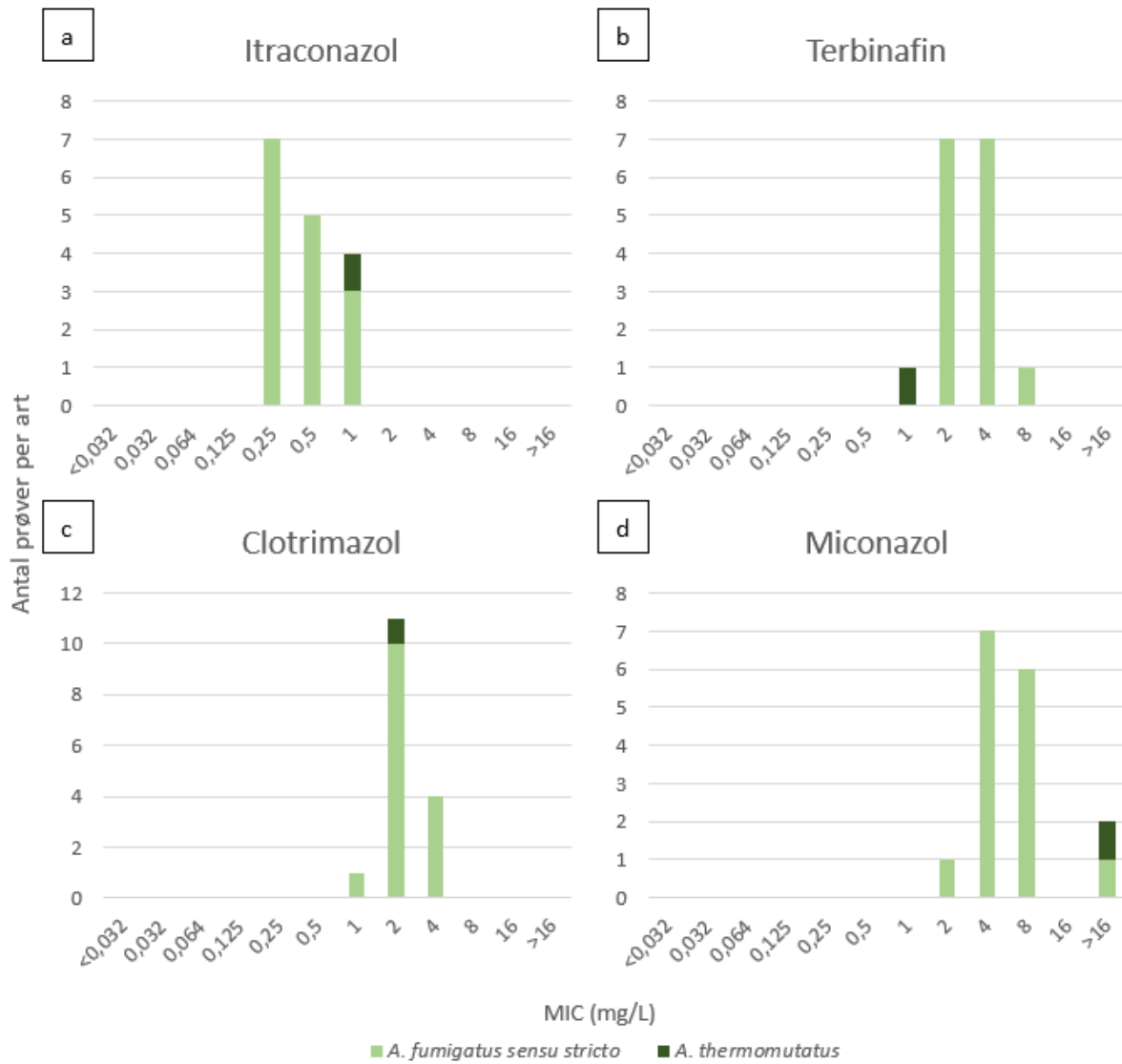
I nedenstående figurer 7a-d, 8a-d og 9a-d ses, ved hjælp af søjlediagrammer, hvorledes de enkelte isolaters MIC-værdierne fordeler sig i forhold til hvert antimykotikum inden for complexerne. Op ad x-aksen ses antal isolater, og hen af y-aksen ses MIC-værdierne. Hvert søjlediagram viser et complex, hvor hver kryptisk art er blevet tildelt sin egen farve.

A. niger complex



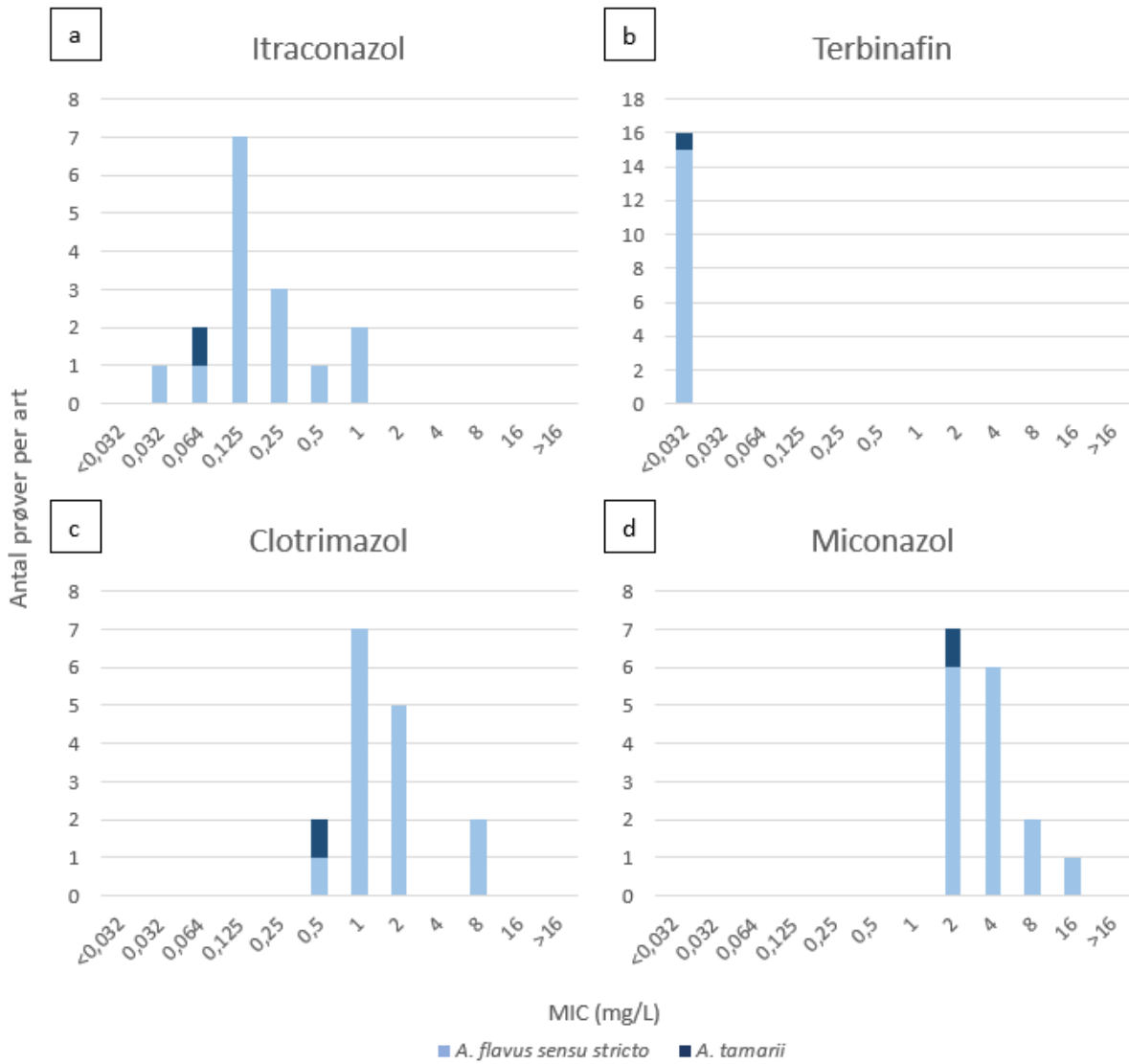
Figur 7a-d: *A. niger* complex MIC distribution.

A. fumigatus complex



Figur 8a-d: *A. fumigatus* complex MIC distribution.

A. flavus complex



Figur 9a-d: *A. flavus* complex MIC distribution

S/I/R klassifikation af isolater

I tabel 12a, 12b og 12c ses en oversigt over antimykotika og de identificerede *Aspergillus* arter. Der er givet en S/I/R klassifikation i forhold til de anvendte antimykotika (19,20).

A. niger complex

Farvekoder		Uofficielle (mg/L)					Officielle (mg/L)			
Sensitiv	S	S	≤1	≤2	≤1		≤1	≤1		
Intermediær	I	I	=2-8	=4-16	=2-8	Itra.	Clo.	Mico.	Ter.	
Resistent	R	R	>8	>16	>8					
Isolat	Art	Kat.	Itra.	Clo.	Mico.	Ter.	Itra.	Clo.	Mico.	Ter.
39	<i>A. cf. Costaricensis</i>	A	1	4	8	0,25	1	4	8	0,25
34	<i>A. niger sensu stricto*</i>	B	0,5	2	4	0,064	0,5	2	4	0,064
45	<i>A. niger sensu stricto*</i>	B	1	4	4	0,125	1	4	4	0,125
35	<i>A. tubingensis</i>	A	1	4	4	0,064	1	4	4	0,064
36	<i>A. tubingensis</i>	A	4	8	8	0,5	4	8	8	0,5
37	<i>A. tubingensis</i>	A	4	8	8	0,5	4	8	8	0,5
38	<i>A. tubingensis</i>	A	2	8	8	0,5	2	8	8	0,5
40	<i>A. tubingensis</i>	A	1	4	8	0,25	1	4	8	0,25
41	<i>A. tubingensis</i>	A	1	4	4	1	1	4	4	1
42	<i>A. tubingensis</i>	A	2	8	8	1	2	8	8	1
43	<i>A. tubingensis</i>	A	4	8	8	0,5	4	8	8	0,5
44	<i>A. tubingensis</i>	A	2	8	8	0,25	2	8	8	0,25
46	<i>A. tubingensis</i>	A	0,5	2	4	0,25	0,5	2	4	0,25
49	<i>A. tubingensis</i>	A	2	8	2	0,5	2	8	2	0,5
50	<i>A. tubingensis</i>	A	1	8	8	0,5	1	8	8	0,5
33	<i>A. welwitschiae</i>	A	0,25	2	4	0,064	0,25	2	4	0,064
47	<i>A. welwitschiae</i>	A	0,5	2	4	0,064	0,5	2	4	0,064
48	<i>A. welwitschiae</i>	A	2	4	8	0,064	2	4	8	0,064

Tabel 12a: MIC-værdier og S/I/R klassifikation for *A. niger* complex med officielle breakpoints og uofficielle breakpoints. Kat. (Kategori), Itra. (Itraconazol), Clo. (Clotrimazol), Mico. (Miconazol), Ter. (Terbinafin).

A. fumigatus complex

Farvekoder	
Sensitiv	S
Intermediær	I
Resistent	R

Isolat	Art	Kat.	Uofficielle (mg/L)				Officielle (mg/L)					
			S	I	R							
			≤1	≤1	≤2	≤1	≤1	≤1				
				=2-8	=4-16	=2-8		=2	=2			
			>1	>8	>16	>8		>1	>2	>2		
			Itra.	Clo.	Mico.	Ter.	Itra.	Clo.	Mico.	Ter.		
2	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	1	4	2	0,25	1	4	2		
3	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,5	2	8	4	0,5	2	8	4		
4	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,5	2	8	4	0,5	2	8	4		
5	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	>16	2	0,25	2	>16	2		
6	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	2	0,25	2	4	2		
7	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	1	4	8	2	1	4	8	2		
8	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,5	2	8	2	0,5	2	8	2		
9	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,5	4	8	4	0,5	4	8	4		
10	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	1	4	4	4	1	4	4	4		
11	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	4	0,25	2	4	4		
12	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	8	0,25	2	4	8		
13	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,5	2	4	2	0,5	2	4	2		
14	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	2	2	0,25	2	2	2		
15	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	4	0,25	2	4	4		
16	<i>A. fumigatus sensu stricto</i>	A	1	4	8	4	1	4	8	4		
1	<i>A. thermomutatus</i>	A	1	2	>16	1	1	2	>16	1		

Tabel 12b: MIC-værdier og S/I/R klassifikation for *A. fumigatus complex* med officielle breakpoints og uofficielle breakpoints. Kat. (Kategori), Itra. (Itraconazol), Clo. (Clotrimazol), Mico. (Miconazol), Ter. (Terbinafin).

A. flavus complex

Farvekoder	
Sensitiv	S
Intermediær	I
Resistent	R

Isolat	Art	Kat.	Uofficielle (mg/L)				Officielle (mg/L)					
			S	I	R							
			≤1	≤1	≤2	≤1	≤1	≤1				
			I	=2-8	=4-16	=2-8		=2	=2			
			R	>1	>8	>16	>8	>1	>2	>2		
			Itra.	Clo.	Mico.	Ter.	Itra.	Clo.	Mico.	Ter.		
17	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,064	1	2	<0,032	0,064	1	2	<0,032		
18	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	1	4	<0,032	0,125	1	4	<0,032		
19	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	2	2	<0,032	0,125	2	2	<0,032		
20	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	2	8	<0,032	0,125	2	8	<0,032		
21	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	<0,032	0,25	2	4	<0,032		
22	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,5	2	4	<0,032	0,5	2	4	<0,032		
24	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,25	1	4	<0,032	0,25	1	4	<0,032		
25	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,032	1	2	<0,032	0,032	1	2	<0,032		
26	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	1	4	<0,032	0,125	1	4	<0,032		
27	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	1	8	8	<0,032	1	8	8	<0,032		
28	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	1	2	<0,032	0,125	1	2	<0,032		
29	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,25	2	4	<0,032	0,25	2	4	<0,032		
30	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	1	2	<0,032	0,125	1	2	<0,032		
31	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	0,125	0,5	2	<0,032	0,125	0,5	2	<0,032		
32	<i>A. flavus sensu stricto</i>	A	1	8	16	<0,032	1	8	16	<0,032		
23	<i>A. tamarii</i>	A	0,064	0,5	2	<0,032	0,064	0,5	2	<0,032		

Tabel 12c: MIC-værdier og S/I/R klassifikation for *A. flavus* complex med officielle breakpoints og uofficielle breakpoints. Kat. (Kategori), Itra. (Itraconazol), Clo. (Clotrimazol), Mico. (Miconazol), Ter. (Terbinafin).

Diskussion

Diskussionsafsnittet vil tage udgangspunkt i vores resultater og de metoder, som vi har brugt til udarbejdelsen af vores projekt. Der inkluderes forskellige studier, som har undersøgt samme problemstilling som rapporten tager udgangspunkt i.

Artsbestemmelse

Under dette afsnit kommenterer vi på kvalitetssikringen. Vi vil diskutere de fundne arter, sammenligner Bruker og MSI, samt forsøge at komme nærmere en artsbestemmelse af isolat 34 og 45.

Kvalitetssikring af artsbestemmelsen

Kvaliteten af vores resultater er baseret på godkendelsen af vores kvalitetskontroller. Det ses i tabel 9, at mindst tre spots blev identificeret korrekt for hver analyse. Dette betyder at vores procedure er udført korrekt, og dermed kan vi regne med at resultaterne er valide.

Fundne arter

Det lykkedes os i løbet af projektet at artsbestemme 48 ud af 50 isolater. De hyppigst forekommende arter, som blev identificeret under vores projekt, var *A. flavus* sensu stricto (n=15), *A. fumigatus* sensu stricto (n=15), *A. tubingensis* (n=12) og *A. welwitschiae* (n=3) som kan ses i figur 4. Præcis hvilke arter, og hvilket complex de tilhører kan ses i figur 3. Alle isolater, der gav resultater under kategori A i MSI-databasen, blev dyrket og identificeret på ny, da vi havde besluttet os for at forsøge at få samtlige isolater på artsniveau. Ved den anden identifikation blev der lavet op mod 10 spots, i stedet for de normalvis fire spots, på analysepladen for at give større chancer for at opnå et resultat i kategori A.

Vi oplevede, at det var svært at artsbestemme isolater tilhørende *A. Niger* complexet i forhold til de resterende arter. Vi måtte omså ni af isolaterne tilhørende complexet, grundet utilfredsstillende artsbestemmelse, se bilag 5.

Det er derfor relevant at vide, hvilket complex der er hyppigst, da det giver en forståelse for, hvor stort et problem det genstridige *A. niger* complex er. Vi har derfor fået et udtræk over positive fund af *Aspergillus* i ørene, fra KMA på AUH. De udtrukne tal (n=834) viser at 41,6% tilhører *A. niger* complex, 37,1% tilhører *A. fumigatus* complex, 15,7% tilhører *A. flavus* complex, 4,2% tilhører *A. terreus* complex og 1,4% tilhører øvrige complexer (bilag 1).

På baggrund af den viden vi sidder med nu, kunne vi godt have tænkt os, at vi havde opnået en større differentiering af arter, da vi derved ville have haft et bedre grundlag for at sammenligne arterne inde for complexerne. Især fordelingen af arterne inde for *A. fumigatus* og *A. flavus* complexerne gør det svært at sige noget repræsentativt herom, i og med 15 ud af 16 af arterne i begge complexer er den samme art.

MSI versus Bruker Biotyper Library

På baggrund af et studie af Jing *et. al.* fra 2021(31), hvori de anvendte Vitek MS til at artsbestemme *Aspergillus* isolater fundet i patienter med Otomykose, har vi fundet det relevant at sammenligne, og diskutere fordelene ved den metode, som vi har anvendt.

Vores resultater fra Brukers MALDI biotyper Library gav 49 ud af 50 isolater en artsbestemmelse på enten kategori B eller C, og kun ét isolat (*A. fumigatus* sensu stricto) i kategori A. Efter overførsel af data fra Brukers database til MSI-database, endte vi med 48 isolater i kategori A, to i kategori B og ingen i kategori C, se tabel 10. Studiet fra Jing R. *et. al.* (31) fik identificeret 10 ud af 69 isolater på artsniveau, hvilket er bedre end Brukers MALDI Biotyper Library. Ulempen ved Vitek MS er, at data ikke kan eksporteres, og dermed ville det ikke være muligt at overføre data til MSI. Man kan derfor argumentere for, at den metode som vi har anvendt til artsbestemmelse, er mere optimal. De resterende isolater fra studiet af Jing *et. al.* blev artsbestemt ved sekventering.

Vi oplevede dog den ulempe ved MSI, at *A. flavus/oryzae* blev angivet i kategori A. Dette svar er tvetydigt, da *A. flavus* og *A. oryzae* er to forskellige arter. Vi var blevet informeret efter kontakt med MSI, at svaret gives sådan, da de to arter er fylogenetisk meget tætte. Den eneste forskel er at *A. flavus* sensu stricto producerer aflatoxin, hvorimod *A. oryzae* ikke gør. Hvis arten endegyldigt skal bestemmes, ville der skulle laves en toksikologisk undersøgelse (bilag 6).

Isolat 34 og 45

I nedenstående vil vi forsøge at komme de to isolaters arter nærmere ved at inddrage andre identifikationsmetoder, da Bruker kun kan identificere isolaterne som kategori C, hvilket ikke giver os et bud på arten og gør dermed Brukers svar irrelevant (tabel 1).

MSI detaljeret view

Til trods for at vi forsøgte at artsbestemme isolat 34 og 45 flere gange og selvom begge isolater fik en score over 30 på MSI (se bilag 5), men da de efterfølgende foreslåede arter lå scoremæssigt for tæt, kunne MSI ikke give et svar som kategori A. I tabel 2 kan man se en oversigt over, hvorledes en score tolkes i forhold til complex- eller artsniveau.

MSI har som første og anden art henholdsvis *A. niger* sensu stricto og *A. welwitschiae*, hvoraf et detaljeret view for begge prøver viser, at det skifter mellem de to arter, se figur 5 og 6. En grund til, at MSI ikke kan differentiere disse tilfredsstillende nok, kan muligvis være, fordi spektrummet for *A. niger* sensu stricto og *A. welwitschiae* ligner hinanden meget. I et studie fra 2016 af Massi *et. al.* har de undersøgt, hvorledes *A. niger* og *A. welwitschiae* adskiller sig. I studiet har de genereret et fylogenetisk træ ud fra sekventering af deres 175 isolater, som viser, at *A. welwitschiae* og *A. niger* sensu stricto ligger fylogenetisk tæt, hvilket underbygger vores hypotese (32).

Makroskopisk morfologisk bestemmelse af nummer 34 og 45

Vi har efterfølgende kigget makroskopisk morfologisk på de isolater, der blev artsbestemt via MSI og sammenlignet med nummer 34 og 45.

For både isolat 45 og 34, henholdsvis billede 5.d og 5.e, kan vi sige, at isolaterne ikke er *A. cf. costaricensis*, da der ses et større hvidt område og et mørkt område med revner af lyst pigment, se billede 5.a. Vi kan dog ikke determinere, om det er *A. tubingensis* eller *A. welwitschiae*, henholdsvis billede 5.b og 5.c, da vi makroskopisk ikke kan se forskel på de to. Dette stemmer overens med studiet af Massi *et. al.* (2016) hvor det pointeres at *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* og *A. niger sensu stricto* ikke kan skelnes makroskopisk eller mikroskopisk. Mere specifikt er der, for *A. welwitschiae* og *A. niger sensu stricto*, behov for sekventering for at skelne mellem disse (32).

Til yderligere morfologisk bestemmelse ville det have været relevant at have mikroskopibilleder af isolaterne. Dette har vi desværre ikke og kan dermed ikke undersøge yderligere.

MIC-værdier

For de to isolater ses en tendens til, at MIC-værdierne ligger nærmest *A. welwitschiae*. Dette stemmer overens, med at MSI mener, en af disse kunne være *A. welwitschiae*. Havde vi haft en resistensbestemmelse på *A. niger sensu stricto*, kunne vi måske have konkluderet noget yderligere. I et studie af D'hooge *et. al.* (2018), har man brugt EUCAST-metoden til at finde Itraconazol MIC-værdien af *A. niger sensu stricto* og *A. welwitschiae*, hvor ved deres fundne MIC-værdier heller ikke kan skelne mellem de to arter (33).

Resistensbestemmelse

Under dette afsnit vil vi kommentere på kvalitetssikringen af resistensbestemmelsen. Vi vil forsøge at vurdere hvorvidt vores isolater er repræsentative ved hjælp af SSI's MIC distribution. Herudover vil vi vurdere hvorvidt vores isolater er resistente med udgangspunkt i isolaternes MIC-værdier for Itraconazol. Dernæst vil vi diskutere hvorvidt standardbehandlingen er optimal for isolaterne med udgangspunkt i de fundne MIC-værdier i forhold til både de uofficielle- og officielle breakpoints, samt undersøge andre behandlingsmetoder med inddragelse af studier.

Kvalitetssikring af resistensbestemmelse

Ved proceduren med resistensbestemmelse var det et kvalitetskrav, at der skulle bruges ATCC-kontrol hver dag, proceduren blev udført. Vi brugte en ATCC stamme (*A. flavus* 204304). Før vi tog mikrotiterpladerne i brug, blev der udsået en plade per batch som kontrol. Såfremt der forekom en ændring af ATCC'ens MIC-værdi, kunne der tages højde for dette ved aflæsning af de øvrige MIC-værdier. Vi anvendte i alt tre ATCC'er til kvalitetssikring af den udførte procedure, hvoraf alle tre lå inden for EUCASTs grænseværdier, se tabel 5 og tabel 11, hvilket ville sige, at vores resultater er valide.

Under udsåningen af nogle mikrotiterplader til resistensbestemmelsen, skete der en fejl. Denne fejl betød at, det ikke var muligt for ELISA readeren at give OD-værdier som kunne anvendes i "EUCAST *Aspergillus* Calculator Lokalmidler ØRE". Det gjorde, at det ikke var muligt for os at sammenligne resultaterne, hvilket kan ses på billede 3 ved Itraconazol og Miconazol. Fejlen bestod i, at der i 10 mikrotiterplader ingen positiv kontrol kom i, da vi var kommet til at tilsætte sterilt vand i kolonne 11 og ingenting i kolonne 12. I forhold til forskriften for resistensbestemmelse skal der konidiesuspension i kolonne 11 og vand i kolonne 12, som kan ses på billede 4. Dette gjorde, at det var nødvendigt at foretage visuel aflæsning af pladerne. Vi antog, at så længe der var vækst i mindst en af de andre brønde, svarede det til en positiv vækstkontrol. Derfor blev det besluttet at anvende MIC-værdierne, da resistensmønstret stemte overens med de resterende isolaters følsomhed. Ved et isolat nr. 40 forekom der vækst i den negative kontrol, hvilket gjorde, vi udførte en ny resistensbestemmelse. Dette kunne skyldes kontaminering under fremstilling af konidiesuspension eller ved afpipettering af mikrotiterpladen.

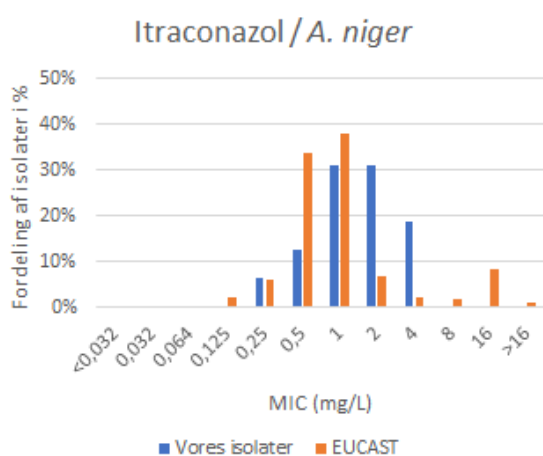
MIC Distribution

For at se hvordan distributionen af MIC-værdierne for isolaterne i dette projekt lå, kunne vi sammenligne med EUCASTs MIC distribution i forhold til Itraconazol.

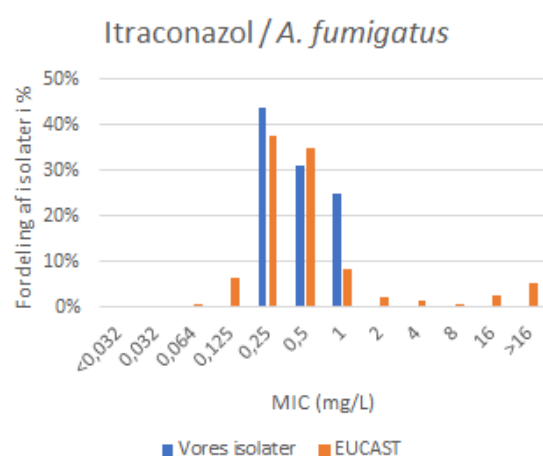
Det var relevant at undersøge dette, da det indikerer, at de inkluderede isolater er repræsentative for deres individuelle complex. Figurerne 10-12 er lavet ud fra resultaterne fra figur 7a, 8a og 9a. Der er efterfølgende lagt MIC-værdierne fra EUCAST ind i samme diagram og vist den procentvise fordeling. Her er det dog vigtigt at pointere, at antallet af vores isolater ikke er en repræsentativ mængde, sammenlignet med antallet fra EUCAST.

For *A. niger* complex ses den samme distribution blandt vores isolater som blandt EUCASTs. Dog ligger størstedelen vores isolater lidt højere ved 1-4 mg/L og mens størstedelen af EUCASTs isolater ligger ved 0,5-2 mg/L.

For *A. fumigatus* complex ses distributionen af vores isolater som værende meget ens med EUCASTs med en top range ved 0,25-1 mg/L.



Figur 11: MIC-værdierne for *A. niger* complex med Itraconazol sammenholdt med breakpoint fra EUCAST. Værdierne fra EUCAST tager udgangspunkt i 307 isolater.

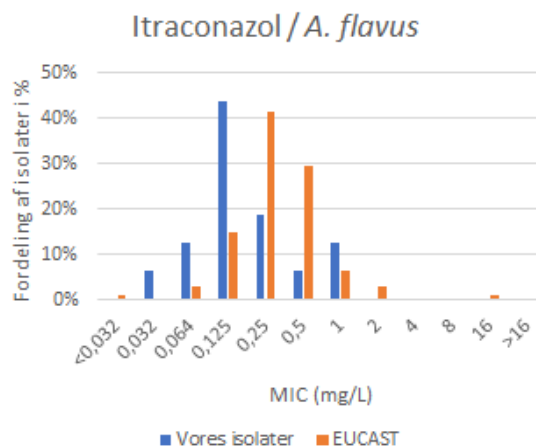


Figur 10: MIC-værdierne for *A. fumigatus* complex med Itraconazol sammenholdt med breakpoint fra EUCAST. Værdierne fra EUCAST tager udgangspunkt i 2389 isolater

For *A. flavus* complex ses samme tendens i distribution som ved *A. fumigatus* complex. Dog ligger størstedelen af vores isolater generelt lidt lavere med MIC-værdier 0,064-0,25, end dem fra EUCAST, hvor størstedelen ligger mellem 0,125-0,5.

Det er vigtigt at notere, at EUCAST har inkluderet væsentlig flere isolater i deres distribution af MIC-værdier, men overordnet set følger vores isolaters MIC-værdier dem, som EUCAST har undersøgt. Dette vil sige, at vores isolater er repræsentative for deres complexer, da vi ikke har nogen, som skiller sig væsentligt ud.

Da EUCAST ikke har bestemt MIC-distributioner for Miconazol, Terbinafin og Clotrimazol for nogle af vores complexer, kan vi desværre ikke sammenligne med vores fundne MIC-værdier for isolaterne. Det tyder på, at der er en normalfordeling blandt vores isolater, som kan ses ved figur 7b-d, 8b-d og 9b-d, da der ikke er nogle isolater, som skiller sig ud.



Figur 12: MIC-værdierne for *A. flavus* complex ved Itraconazol sammenholdt med breakpoint fra EUCAST. Værdierne fra EUCAST tager udgangspunkt i 392 isolater

Itraconazol og Miljøresistens

Efter aflæsning af kvalitetskontrollen var det første, vi undersøgte Itraconazol, som blev inkluderet i mikrotiterpladen for at undersøge, hvorvidt nogle af vores isolater havde azolresistens. I nedenstående afsnit tages der udgangspunkt i tabel 6 og tabel 12 a-c.

TR34/L98H

Mutationen TR34/L98H skal ved resistensbestemmelse med Itraconazol have en MIC-værdi på >16 mg/L, men da vores højeste MIC-værdier er 4 mg/L, kan vi uden tvivl sige, at ingen af de isolater vi har arbejdet med, har denne mutation.

TR46/Y121F/T289A

Mutationen TR46/Y121F/T289A skal ved resistensbestemmelse med Itraconazol have en MIC-værdi på cirka 0,5 mg/L. For dog at kunne konkludere, om denne mutation findes blandt vores isolater, skal der også kendes til isolaternes resistens overfor voriconazol og posaconazol, hvilket kan screenes ved brug af en VIPCHECK, hvor en kontrol, itraconazol (4 mg/L), voriconazol (2 mg/L) og posaconazol (0,5 mg/L) indgår (16).

SSI

MIC-værdier fra projektets 50 isolater lå således, at samtlige isolater enten var I eller R i forhold til Miconazol og en stor del af vores isolater ligeledes var I eller R overfor Clotrimazol. Dette undrede os, da vi havde fået oplyst, at disse to antimykotika var dem, som blev hyppigst anvendt til

behandling. På baggrund af vores undren skrev vi en e-mail til SSI omkring dette, da det var deres breakpoints, vi arbejdede ud fra i forhold til Miconazol og Clotrimazol. Denne e-mailkorrespondance resulterede i, at vi fik tilsendt en opdateret version af de anvendte grænseværdier ud fra EUCAST metoden, hvori der yderligere var tilføjet breakpoints for Terbinafin.

Miconazol og Clotrimazol - standardbehandling

I forhold til Miconazol og Clotrimazol, som i dag er ørelægernes foretrukne behandling af Otomykose, ser vi nogle tendenser i vores resultater i tabel 12a-c.

Den første tendens er at *A. niger* complexet har relativt høje MIC-værdier (2-8 mg/L), som kan ses i tabel 12a. I forhold til de uofficielle breakpoints, som vi fik tilsendt fra SSI, er 17 isolater I og kun én er S, over for både Miconazol og Clotrimazol. De officielle breakpoints fra SSI klassificerer samtlige isolater under *A. niger* complexet som R over for enten den ene eller begge antimykotika, hvilket er en markant forskel.

Dette er en interessant tendens i og med, at *A. niger* er det hyppigste complex, som findes i forbindelse med Otomykose. Ud fra vores resultater tyder det ikke på, at der er forskel på resistensmønstret imellem de kryptiske arter under *A. niger* complexet. Taget i betragtning at behandlingen gives lokalt, vil behandlingen formentlig være effektiv mod samtlige isolater, da ingen er R ifølge de uofficielle breakpoints.

Endnu en tendens, vi har observeret, ses i tabel 12b. Ifølge de officielle breakpoints er 15 ud af 16 *A. fumigatus* isolater R over for Miconazol og 12 ud af 16 er R overfor Clotrimazol.

I forhold til de uofficielle breakpoints er 15 isolater I og én isolat S overfor Clotrimazol, mens 13 isolater er I, to er R og én er S over Miconazol.

Det er, som nævnt tidligere, svært at sige noget generelt arterne imellem, da vi kun har identificeret én *A. thermomutatus*, og resten *A. fumigatus* sensu stricto, men ud fra vores resultater skiller den sig ud med en høj MIC-værdi på >16 mg/L over for Miconazol. Hvorvidt dette er repræsentativt eller blot til et tilfælde kan ikke vides, men hvis det er repræsentativt, vil dette være et argument for at artsbestemme, da man kan risikere at overbehandle patienter med Otomykose forårsaget af *A. thermomutatus*, hvis der anvendes Miconazol.

I forhold til complexet generelt kunne man med fordel gøre behandling med Clotrimazol til en standard, da ingen er R overfor det.

I forhold til *A. flavus* complexet er der en tendens, som ses i tabel 12c, at de fundne isolater har relativ lave MIC-værdier i forhold til de andre complexer. Der er 10 ud af 16 som er S og seks I og ingen af dem er R i forhold til de uofficielle breakpoints. Vi har kun identificeret en *A. Tamraii* og resten er *A. flavus* sensu stricto, hvilket igen gør det svært at sammenligne arterne inde for complexerne. En interessant tendens er, at de identificerede *A. flavus* sensu stricto arter har et mere varierende resistensmønster, i forhold til hinanden end vi observerede ved for eksempel *A. fumigatus* sensu stricto, men eftersom alle er enten I eller S ville man, formentlig, kunne behandle effektivt med begge antimykotika.

Da vi ikke har oplysninger omkring patienterne, som vi har isolaterne fra, kan vi ikke se om de tidligere har været, eller er i behandling med enten Clotrimazol eller Miconazol. Det kunne have været en god information, da det kunne være godt at vide, om resistensen eventuelt kunne være udviklet gennem behandling.

Terbinafin

I starten af projektet var der ikke fastlagt breakpoints for Terbinafin fra hverken EUCAST eller SSI, hvilket har gjort, at det til at starte med ikke var muligt at give en S/I/R klassifikation på baggrund af resistensbestemmelsen. Det følgende afsnit vil tage udgangspunkt i de uofficielle breakpoints fra SSI, som blev givet til os efterfølgende. (Bilag 3).

Ud fra tabel 12a-c kan det ses at *A. flavus* og *A. niger* complexerne er S i henhold til de uofficielle breakpoints.

Under *A. fumigatus* complexet viser, *A. fumigatus* sensu stricto en tendens til at være I, hvorimod *A. thermomutatus* er S. Hvis man kunne sige, at den ene *A. thermomutatus* isolat var repræsentativ, kunne man med fordel behandle den med Terbinafin, da den, som det eneste isolat er S overfor Terbinafin, og er R overfor Miconazol.

Et studie af Zarei Mahmoudabadi *et. al* har ligeledes undersøgt hvorvidt Lamisil, en creme indeholdende Terbinafin, har en effekt over for *Aspergillus* isolater fundet i ørene (34). Som i vores projekt har studiet observeret en stor følsomhed overfor terbinafinholdige antimykotika. I artiklens diskussion bliver der desuden henvist til to yderligere studier, som har fundet samme tendens. På baggrund af egne resultater og studierne vil det være sandsynligt, at Terbinafin vil kunne anvendes til behandling af Otomykose.

Der er dog en udfordring, da Terbinafin indeholder benzylalkohol, hvilket kan diffundere gennem trommehinder og være toksisk (35). Afdelingens læger blev, i løbet af projektet, gjort opmærksom på at ørelægerne herfor er påpasselige med at anvende præparatet.

Andre behandlingsmuligheder

På baggrund af vores resultater har vi søgt efter studier, som undersøger hvorvidt der findes andre antimykotika som kunne vise sig effektive mod Otomykose forårsaget af *Aspergillus*, da vi ved der findes flere typer azoler, som ikke er blevet inkluderet i vores projekt. Vi har fundet et studie af Ahmed *et. al* fra 2018 (36) som har undersøgt 63 patienter med Otomykose forårsaget af svampe, hvoraf 47 af isolaterne var tilhørende *Aspergillus* complexer. Studiet inddrog Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol, Miconazol og Nystatin.

Som i vores projekt har Ahmed *et. al* studiet undersøgt resistensmønstrene, og ved ketoconazol var 45 ud af 47 isolater S. Dette er interessant, fordi ketoconazol som udgangspunkt bliver brugt i forbindelse med dermatofytter men kunne være et muligt behandlingsmiddel mod otomykotisk Aspergillose.

Til forskel fra vores projekt har Ahmed *et. al* studiet brugt disk diffusionsmetoden, der kun giver en S/I/R klassifikation, hvor imod vi har brugt EUCASTs metode til resistensbestemmelse for at se resistensmønstret. Begge metoder ender ud med en S/I/R klassifikation, og derfor mener vi, på trods af forskellen, at vi kan drage nytte af studiet. Det ville dog være optimalt at undersøge antimykotikummet med samme metode, som vi har brugt; for at få en bedre

sammenlignelighed. På baggrund af dette studie kunne det være interessant at undersøge ketoconazol som alternativt behandlingsmiddel. På nuværende tidspunkt mangler der forskning på området, fordi det oftest er mindre populært at forske inden for mindre alvorlige sygdomme i den primære sektor.

Konklusion

Ud fra vores resultater kan det konkluderes, at det var muligt, ved hjælp af Brukers MALDI Biotyper og MSI-databasen, at identificere syv forskellige *Aspergillus* arter, fra isolater fundet i ørepodninger inden for de tre complexer. De fundne arter er *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* *A. cf. costaricensis* inde for *A. niger* complex. *A. fumigatus* sensu stricto, *A. thermomutatus* inden for *A. fumigatus* complex. *A. flavus* sensu stricto og *A. tamarii* inden for *A. flavus* complex.

Herudover kan det konkluderes, at arternes resistensmønstre inde for complexerne, er forholdsvis ens, med kun enkelte afvigelser inde for *A. fumigatus* complexet, hvor *A. thermomutatus* afveg en smule ved at have højere MIC-værdi end resten af complexet.

Ifølge de uofficielle breakpoints givet fra SSI kan *A. niger* og *A. flavus* complexet behandles med både Miconazol og Clotrimazol, og med *A. fumigatus* ville der kunne med fordel behandles med Clotrimazol, fordi samtlige arter er følsomme herfor. Hvis man tager udgangspunkt i de officielle breakpoints, er der langt flere isolater i alle complexerne, som er resistente.

Perspektivering

Arbejdsgangen for personalet

Det diskuteres, i dag, om der er behov for at ørepodninger, tilsendt KMA, skal arts- og resistensbestemmes, eller om det er tilstrækkeligt at sende svar ud til rekvirenterne på complex-niveau, som det er blevet gjort indtil nu.

Vores resultater indikerer, at der overordnet set er samme tendens i resistensmønstrene blandt de kryptiske arter under complexerne, hvoraf kun enkelte afviger en smule. Herudover har vi oplevet, at selve proceduren omkring arts- og resistensbestemmelse er omfattende og tidskrævende. En anden problematik består i, at størstedelen af de positive *Aspergillus* fund, i ørerne, tilhører *A. niger* complexet. Netop dette complex har vi fundet svært at få artsbestemt, hvilket vil besværliggøre arbejdsgangen yderligere for personalet. Vi vurderer, på baggrund af to ovenstående tendenser, at det vil kunne være muligt at spare personalets tid, og udgifterne for afdelingen, hvis der blot gives et svar på complex-niveau, da vores resultater indikerer, at der stadig vil kunne gives en effektiv behandling.

Hvad er næste skridt?

Overordnet

Hvis projektet gentages, ville det være en fordel at inddrage flere og ukendte *Aspergillus* isolater. Vi arbejdede med 50 isolater, hvor der på forhånd var udvalgt lige mange *A. flavus*-, *A. niger*- og *A. fumigatus* complexer. Derfor havde vi ikke en forestilling om, hvilke complexer, der var hyppigst. Det var først, da der blev tilsendt et udtræk af hvilke positiv fund der var blevet gjort på afdelingen, at vi kunne se, hvilke complexer der typisk blev fundet flest af (bilag 1).

Sekventering

Det kunne have været interessant at få sekventeret isolaterne for at få dem bekræftet. Sekventering er en relativ omfattende analyse, og derfor har det ikke været aktuelt for os at inddrage, men de to isolater, nr. 34 og 45, ville vi med fordel have kunne sekventeret. Udfordringen bestod for os ikke i at finde ud af, hvilke complexer isolaterne 34 og 45 hørte under men derimod hvilke kryptiske arter under complexet, der var tale om.

Med udgangspunkt i vores resultater ligner de to isolater, morfologisk og resistensmæssigt, meget de andre kryptiske arter inden for *A. niger* complexet. Det kunne være interessant at udføre sekventering for at finde ud af, hvorvidt en af de to isolater er en *A. niger* sensu stricto; en af de allerede identificerede kryptiske arter eller en ny kryptisk art. Hvis det viste sig, at en af de to, eller begge isolater, er en *A. niger* sensu stricto, vil det give os en viden om deres MIC-værdi. Herudover kunne det være aktuelt at udføre sekventering i tilfælde af en patient med recidiverende Otomykose. Her kunne sekventering bidrage med viden i forhold til, hvilken kryptisk art der er årsag til tilstanden. Det vil, herudfra, være muligt at udføre en mere målrettet resistensbestemmelse, da man på forhånd kender til nogle resistensmekanismer blandt specifikke arter, og derfor vil man kunne fremstille en mikrotiterplade specifikt hertil. Sekventering og fremstilling af specifik mikrotiterplade vil være meget omfattende og dyrt for afdelingen, og derfor er det ikke sikkert, at det vil ske i praksis, men i teorien vil det være en mulighed.

Referencer

1. Arendrup MG. Kapitel 6 Mykologi. I: Høiby N, Skinhøj P, redaktører. Kompendium i mikrobiologi og infektionsmedicin. 1. udgave. Kbh.: FADL; 2015. s. 241–60.
2. L. Mortensen K, W. Denning D, C. Arendrup M. The burden of fungal disease in Denmark. 2015(58):15–21.
3. Statens Serum Institut. Resistens i Aspergillus [Internet]. 2018 [henvist 7. januar 2021]. Tilgængelig hos: <https://antibiotika.ssi.dk/resistens-i-bakterier-og-svampe/aspergillus>
4. Planteværn D. Det ved vi om azol-resistens [Internet]. [henvist 31. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.plantevaern.dk/aktuelt/nyheder/2019/det-ved-vi-om-azol-restistens-og-forholdet-til-landbrugets-brug-af-azol-pesticider/>
5. Lestrade PP, Bentvelsen RG, Schauwvlieghe AFAD, Schalekamp S, van der Velden WJFM, Kuiper EJ, m.fl. Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. Clin Infect Dis. 24. april 2019;68(9):1463–71.
6. Klinisk Mikrobiologisk - Aarhus Universitetshospital. 1.3. Skimmelsvampe - identifikation, dyrkning og resistensbestemmelse [Internet]. E-dok. [henvist 7. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://e-dok.rm.dk/edok/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://e-dok.rm.dk/edok/enduser/portal.nsf/Main.html?open&unid=XE90F9D77E5132DF2C1257E6D0043B128&dbpath=/edok/editor/AAUHMI.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>
7. Saunte DM, Arendrup MC. Svampeinfektioner i hud, hår og negle [Internet]. [henvist 19. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.sst.dk/da/udgivelser/2015/rational-farmakoterapi-3-2015/svampeinfektioner-i-hud-haar-og-negle>
8. Lee J. Aspergillus - Discovery as Human Pathogen History [Internet]. Antimicrobes, Infectious Disease and antimicrobial reagents. [henvist 26. marts 2021]. Tilgængelig hos: <http://www.antimicrobe.org/hisphoto/history/Aspergillus-Human%20Pathogens.asp>
9. Kidd S, Halliday C, Alexiou H, Ellis D. Aspergillus I: Description of medical fungi [Internet]. Third Edition. Bd. 2016. Australia; Tilgængelig hos: <https://mycology.adelaide.edu.au/docs/fungus3-book.pdf>
10. Latgé J-P. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12(2):310–50.
11. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax. 2015;70(3):270–7.

12. Ellekvist P, Jensen AN, Sachs C. Aspergillose [Internet]. Lægehåndbogen på sundhed.dk. 2019 [henvist 7. januar 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/laegehaandbogen/infektioner/tilstande-og-sygdomme/svampeinfektioner/aspergillose/>
13. Statens Serum Institut. Forskning i Aspergillus [Internet]. 2019 [henvist 7. januar 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.ssi.dk/sygdomme-beredskab-og-forskning/forskning/a/aspergillus>
14. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol.* 2011;49(Supplement_1):S90–5.
15. Astvad KMT, Jensen RH, Hassan TM, Mathiasen EG, Thomsen GM, Pedersen UG, m.fl. First Detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H Alterations in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5096–101.
16. Klinisk Mikrobiologisk - Aarhus Universitetshospital. 5.3. Skimmelsvampe - screening for azoleresistens [Internet]. E-dok. [henvist 7. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://e-dok.rm.dk/edok/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://e-dok.rm.dk/edok/enduser/portal.nsf/Main.html?open&unid=X35E3EBB9668627DAC1258129003C6578&dbpath=/edok/editor/AAUHMI.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>
17. European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases. EUCAST: EUCAST [Internet]. [henvist 28. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.eucast.org/>
18. European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases. MIC EUCAST [Internet]. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. [henvist 27. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://mic.eucast.org/>
19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.3 and E.Def 11.0 procedures [Internet]. EUCAST; 2020 [henvist 3. maj 2021]. Tilgængelig hos: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v2.0_20-09-24.pdf
20. Statens Serum Institut. *Candida* og *Aspergillus* (dyrkning og resistensbestemmelse) (svampemidler til vaginitis, otitis og hudinfektioner) (R-nr. 1063) [Internet]. 2021 [henvist 3. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.ssi.dk/produkter-og-ydelser/diagnostik/diagnostiskhaandbog/c/1063>

21. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guniea J. EUCAST antifungal MIC method for moulds [Internet]. 2020 [henvist 27. april 2021]. Tilgængelig hos: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9.3.2_Mould_testing_definitive_revised_2020.pdf
22. Olsen CB. Identifikation af Bakterier. I: Almen, klinisk og praktisk mikrobiologi. Kbh.: Samfundslitteratur; 2016. s. 99–103.
23. Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biology of plants. Eighth edition, International ed. New York: W.H. Freeman and Company Publishers; 2013.
24. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. 2015:100–11.
25. Bruker. MBT Filamentous Fungi Library [Internet]. [henvist 18. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/mbt-filamentous-fungi-library.html>
26. Belgian Coordinated Collections of Microorganisms. BCCM/IHEM Fungi Collection: Human & Animal Health [Internet]. [henvist 27. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://bccm.belspo.be/about-us/bccm-ihem>
27. Klinisk Mikrobiologisk - Aarhus Universitetshospital. 5.2. Skimmelsvampe - identifikation vha. Bruker MALDI-TOF/ MSI database [Internet]. E-dok. [henvist 7. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://e-dok.rm.dk/edok/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://e-dok.rm.dk/edok/enduser/portal.nsf/Main.html?open&unid=XA962F329B7BBEC23C1258205003B5EAF&dbpath=/edok/editor/AAUHMI.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>
28. Klinisk Mikrobiologisk - Aarhus Universitetshospital. 5.3. Skimmelsvampe - MIC bestemmelse [Internet]. E-dok. [henvist 7. april 2021]. Tilgængelig hos: <https://e-dok.rm.dk/edok/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://e-dok.rm.dk/edok/enduser/portal.nsf/Main.html?open&unid=X8F1F78EC82D29B22C125812900281F2B&dbpath=/edok/editor/AAUHMI.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>
29. Jaskiewicz M, Janczura A, Nowicka J, Kamysz W. Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [henvist 19. maj 2021]. Tilgængelig hos: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/4/174>
30. European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases. Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST [Internet]. 2021. Tilgængelig hos: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/QC/EUCAST_AFST_QC_v_5.0_20-09-24.pdf

31. Jing R, Yang W-H, Xiao M, Li Y, Zou G-L, Wang C-Y, m.fl. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* strains isolated from patients with otomycosis in northern China. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2021 [hentet 18. maj 2021]; Tilgængelig hos: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.03.011>
32. Massi FP, Sartori D, Ferranti L de S, Iamanaka BT, Taniwaki MH, Vieira MLC, m.fl. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *Int J Food Microbiol*. 2016;221:19–28.
33. D'hooge E, Becker P, Stubbe D, Normand A-C, Piarroux R, Hendrickx M. Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? *Med Mycol*. 2019;57(6):773–80.
34. Zarei Mahmoudabadi A, Seifi Z, Gharaghani M. Lamisil, a potent alternative antifungal drug for otomycosis. *Curr Med Mycol*. 2015;1(1):18–21.
35. Yang T-H, Young Y-H. Eradicating Otomycosis with Terbinafine Solution: Basic and Clinical Investigation. *Audiol Neurotol*. 2019;24(4):183–90.
36. Ahmed MR, Abou-Halawa AS, Hessam WF, Abdelkader DSA. A search for new otomycotic species and their sensitivity to different antifungals. *Interv Med Appl Sci*. 10(3):145–9.

Bilag

- Bilag 1: Udtræk af positive fund på KMA
- Bilag 2: Antimykotika koncentration i mikrotiterplader
- Bilag 3: Mail SSI
- Bilag 4: Litteratursøgning
- Bilag 5: Registreringsark
- Bilag 6: Mail MSI