

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

AZƏRBAYCANDA AZOL REZİSTENT ASPERGİLLUS FUMİGATUS ŞTAMLARININ GENETİK ASPEKTLƏRİ

İxtisas: 2414.01 – Mikrobiologiya

Elm sahəsi: Tibb

İddiaçı: **Ravil Mülkədar oğlu Hüseynov**

Fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi almaq üçün
təqdim edilmiş dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2024

Dissertasiya işi Azərbaycan Tibb Universitetinin Tibbi Mikrobiologiya və immunologiya kafedrasında yerinə yetirilmişdir.


Elmi rəhbər: tıbb üzrə fəlsəfə doktoru, dosent
Samir Sabir oğlu Cavadlı

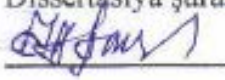
Rəsmi opponəntlər: tıbb elmləri doktoru, professor
Murad Qiyas oğlu Məmmədov

tıbb üzrə fəlsəfə doktoru
Fəridə Hafiz qızı Heydərova

tıbb üzrə fəlsəfə doktoru
Rauf Fizuli oğlu Əzizov

Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının Azərbaycan Tibb Universitetinin nəzdində fəaliyyət göstərən BED 4.19 Birdəfəlik Dissertasiya Şurası

Dissertasiya şurasının sədri: tıbb elmləri doktoru, professor

Məhərrəm Zülfüqar oğlu Niftullayev

Dissertasiya şurasının elmi katibi: tıbb üzrə fəlsəfə doktoru, dosent

Sevinc Fətulla qızı Fətullayeva

Elmi seminarın sədri: tıbb elmləri doktoru, professor

Mehman Həbib oğlu Əliyev



İMZANI TƏSDİQ EDİRƏM
Azərbaycan Tibb Universitetinin
ELMİ KATİBİ
Tıbb elmləri doktoru, professor
Nazim Adil oğlu Pənahov
 25.01.2024

İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi. *Aspergillus fumigatus* insanlarda kolonizasiya, allergik bronx-ağciyər aspergillozu (ABAA), ağır göbələk sensibilizasiyalı astma (AGSA), xroniki ağciyər aspergillozu (XAA) və invaziv aspergilloz (İA) daxil olmaqla, müxtəlif patoloji hallara səbəb olan və ətraf mühitdə geniş yayılmış göbələkdir. Sporların kiçik diametri onların aşağı tənəffüs yollarına nüfuz etməsini asanlaşdırır, bu da *A.fumigatus*-u aspergillozun əsas etioloji agentinə çevirir¹. İmmunsupressiya və ağciyər xəstəlikləri olan insanlar (ağciyərlərin xroniki obstruktiv xəstəliyi - ACXOX, ağciyər vərəmi - AV və s.) aspergillozun inkişaf üçün risk qrupundadırlar².

Aspergillus cinsli göbələklərin törətdiyi xəstəliklərin müalicəsində birinci sıra dərmanlar *cyp51A* geninin məhsulu olan 14 α -demetilazaya təsir edən və bununla da hüceyrə divarının əsas komponenti olan erqosterolun sintezinə mane olan azol preparatlarıdır (itrakonazol-İTR, vorikonazol-VOR, posakonazol-POS, isavukonazol-İSK və s.). Nəticə olaraq metilləşmiş toksiki sterolların toplanması göbələk hüceyrəsinin zədələnməsinə səbəb olur.

Klinik Mikrobiologiya və Yoluxucu Xəstəliklər üzrə Avropa Birliyinin, Avropa Tibbi Mikologiya Konfederasiyası və Avropa Tənəffüs Birliyinin (*ESCMID-ECMM-ERS - European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, the European Confederation of Medical Micology and the European Respiratory Society*) ümumi təlimatlarına əsasən VOR və İSA İA-nın müalicəsində birinci sıra dərmanlar hesab edilir. Kəskin miyeloid leykemiya (KML) və miyelodisplastik sindromu olan xəstələrdə aspergillozun inkişafının qarşısının alınması üçün POS tövsiyə edilir. Amerika Yoluxucu Xəstəliklər Cəmiyyəti (*IDSA - Infectious Diseases Society of America*) birinci sıra (güclü tövsiyə) VOR-u və alternativ müalicə

¹ Dagenais, T. R., Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis // *Clin Microbiol Rev*, - 2009, 22 (3), p. 447-465

² Kosmidis, C., Denning, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis / *Thorax*, - 2015, 70 (3), p. 270-277.

kimi ISA/liposomal Amfoterisin B (orta tövsiyə) kombinasiyasını tövsiyə edir. XAA üçün oral ITR və VOR tövsiyə edilir³.

Lakin, azolların təbabətdə və kənd təsərrüfatında qeyri-rasional istifadəsi azol rezistent şamların seleksiyasına səbəb olmuşdur. İlk rezistent izolyat 1997-ci ildə aşkar edilmiş və *cyp51A* genində nöqtəvi mutasiya (M220R) səbəbindən ortaya çıxmışdır⁴. Azol rezistentliyinə səbəb olan bir neçə mexanizm məlumdur: 1) 14 α -demetilazanın modifikasiyası; 2) 14 α -demetilazanın ekspressiyasının artması; 3) ef-fluks mexanizmləri - Cdr1B effluks daşıyıcısının ekspressiyasının artması; 4) sterol sintezinin alternativ yolları; 5) dərmanların ekstra-və hüceyrədaxili parçalanması.

Nöqtəvi mutasiyalar daha çox uzunmüddətli azol müalicəsi ilə əlaqələndirilir⁵. Başqa bir mutasiya növü *cyp51A* genindəki nöqtəvi mutasiyalar ilə birlikdə promotor bölgədə tandem təkrarlarının (ing. “tandem repeats” - TR) əmələ gəlməsidir. Bu tip mutasiya kənd təsərrüfatında triazol funqisidlərinin (TR₃₄/L98H, TR₅₃ və TR₄₆/Y121F/T289A) qeyri-rasional istifadəsi ilə əlaqələndirilir^{6,7}. Yuxarıda qeyd edilən təşkilatların hər ikisi (*ESCMID-ECMM-ERS* və *IDSA*) azollara rezistentliyin monitorinqini tövsiyə edir. Rezistent şamlara yoluxan xəstələr arasında ölüm faizi 50-100% arasında dəyişir və azollara həssas şamlarla müqayisədə 23-31% yüksəkdir. Rezistentliyin inkişafını proqnozlaşdırmaq üçün heç bir xüsusi risk

³ Ullmann, A. J. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline/ Aguado, J. M., Arıkan-Akdagli, S., Denning, D. W. [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* - 2018, 24 Suppl 1, p. e1-e38.

⁴ Denning, D. W. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* - 1997, 41 (6), p. 1364-1368.

⁵ Camps, S. M. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature / van der Linden, J. W., Li, Y., Kuijper, E. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2012, 56 (1), p. 10-16.

⁶ Snelders, E. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* / Camps, S. M., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G. [et al.] // *PLoS One.* - 2012, 7 (3):e31801, p. 1-11.

⁷ Berger, S. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? / El Chazli, Y., Babu, A. F., Coste, A. T. [et al.] // *Frontiers in Microbiology.* - 2017, 8:1024, p. 1-6.

faktoru olmadığından xəstələrin monitorinqi tövsiyə edilir. Müalicənin təsiri olmadıqda, antimikotik preparatın minimum inhibisiya konsentrasiyasını (MİK) təyin etmək üçün həssaslıq testinin aparılması və azol rezistentliyi aşkar edilərsə, müalicənin korreksiya edilməsi tövsiyə edilir. Bununla belə, bir çox laboratoriyalarda izolyatlar üçün MİK testləri aparılmır. Buna görə də ətraf mühitdə azol rezistentliyinin 10%-dən yüksək olduğu bölgələrdə empirik müalicə tövsiyə edilir^{3,8}. Avropa ölkələrində klinik və ətraf mühit nümunələrində rezistentlik səviyyələrini müəyyən etmək üçün genişmiqyaslı tədqiqatlar aparılmışdır. Azollara rezistentlik probleminin aktuallığını nəzərə alaraq Azərbaycanda analogi tədqiqatın aparılması zəruri idi.

Tədqiqatın obyektı və predmeti. Dissertasiya işi zamanı 2018-ci il üçün Azərbaycan Respublikası əhalisində göbələk xəstəliklərinin epidemioloji yükünün retrospektiv qiymətləndirilməsi aparılmışdır.

Azərbaycan Respublikasının ətraf mühitində rezistent *A.fumigatus* ştamlarının yayılmasının prospektiv qiymətləndirilməsi məqsədilə 218 torpaq və 11 hava nümunəsi (ümumilikdə 229 nümunə) müayinə edilmişdir.

Bundan əlavə, prospektiv tədqiqat 2 qrup xəstələrdə aparılmışdır: əsas xəstəliklərin bütün növləri (ağciyər xəstəlikləri, otomikoz və onikomikoz) olan qrupda (nümunə sayı n=163) və yalnız ağciyər xəstəlikləri olan qrupda (nümunə sayı n=1170).

Tədqiqatın məqsədi aspergilloz və azollara rezistentliyin epidemiologiyasının qiymətləndirilməsi, ətraf mühitdən və müxtəlif klinik nümunələrdən izolə edilmiş azol rezistent *A.fumigatus* ştamlarının genetik müayinəsi olmuşdur.

Tədqiqatın vəzifələri:

1. Azərbaycanda göbələk patologiyalarının, o cümlədən aspergillozların yükünün retrospektiv qiymətləndirilməsi;

2. *A.fumigatus* ştamlarının ətraf mühitdən və müxtəlif kliniki nümunələrdən izolə edilməsi və ardıcıl durulaşdırma üsulu ilə rezistent ştamların aşkar edilməsi;

⁸ Verweij, P. E. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* / Ananda-Rajah, M., Andes, D., Arendrup, M. C. [et al] // *Drug Resist Updat*, - 2015, 21-22, p. 30-40

3. Azollara qarşı rezistentliyə səbəb olan mutasiya növlərini müəyyən etmək məqsədi ilə rezistent *A.fumigatus* ştamlarının molekulyar-genetik analizi;

4. Ətraf mühitdən və klinik nümunələrdən izolə edilən ştamlar arasında genetik əlaqəni müəyyən etmək məqsədi ilə *A.fumigatus* ştamlarının filogenetik analizi.

Tədqiqatın metodları. Tədqiqatın metodlarını **mikroskopik, kultural (mikoloji), molekulyar-genetik** və **statistik** üsullar təşkil etmişdir.

Müdafiəyə çıxarılan əsas müddəalar:

— apardığımız hesablamaların nəticələrinə əsasən, Azərbaycanda göbələk patologiylarının epidemioloji yükü, xüsusilə *Aspergillus* cinsli göbələklərin aşkar edildiyi ağciyər patologiyları olan xəstələrdə, kifayət qədər yüksəkdir;

— Azərbaycanda kliniki ştamlar arasında rezistent ştamların aşkarlanma tezliyi kifayət qədər yüksəkdir, Azərbaycanın ətraf mühitində isə rezistent ştamların yayılması aşağı səviyyədədir;

— Azərbaycanda *A.fumigatus* ştamlarında azollara rezistentliyin səbəbi kənd təsərrüfatı sənayesində istifadə edilən azol funqisidlərinin təsiri ilə seleksiya edilən TR₃₄/L98H mutasiyasıdır.

Tədqiqatın elmi yeniliyi:

— Azərbaycanda ilk dəfə olaraq göbələk xəstəliklərinin, xüsusən də aspergillozun epidemioloji yükünün qiymətləndirilməsi aparılmışdır;

— Azərbaycanda ilk dəfə olaraq klinik nümunələrdə və ətraf mühitdə rezistent *A.fumigatus* ştamlarının yayılma tezlikləri müəyyən edilmişdir;

— Azərbaycanda ilk dəfə olaraq *A.fumigatus* ştamlarında azollara rezistentliyə səbəb olan genetik mutasiya aşkar edilmişdir;

— Azərbaycanda ilk dəfə olaraq ətraf mühitdə və klinik nümunələrdə aşkar edilmiş *A.fumigatus* ştamları arasında epidemioloji əlaqə öyrənilmişdir.

Tədqiqatın nəzəri və praktiki əhəmiyyəti:

— rezistentlik profilinin öyrənilməsi profilaktika və müalicə proqramlarının təkmilləşdirilməsinə kömək edəcəkdir. Əldə edilən nəticələr *Aspergillus* ştamlarının səbəb olduğu infeksiyalarda ölüm

hallarının nisbətinin azalmasına, bu isə öz növbəsində, xəstələrin müalicəsi ilə bağlı xərclərin azalmasına səbəb olacaqdır;

– ətraf mühitdə və klinik nümunələrdə aşkar olunmuş ştamların mutasiyalarının müqayisəli təhlili yoluxma yollarını və rezistent ştamların yaranma səbəblərini müəyyən etməyə imkan verəcəkdir;

– funqisid maddələrin istifadəsi ilə bağlı tədbirlər kompleksinin hazırlanması rezistent ştamların yayılmasının azalmasına xidmət edəcəkdir.

İşin aprobasiyası və tətbiqi:

Tədqiqatın nəticələri məruzə və müzakirə edilmişdir:

Azərbaycan Xalq Cümhuriyyətinin 100 illiyinə həsr olunmuş “Təbabətin Aktual Problemləri” elmi-praktik konfransında (Bakı, 2018), Azərbaycan Xalq Cümhuriyyətinin 100 illiyinə həsr olunmuş Tibbi Profilaktika Elmi-Tədqiqat İnstitutunun elmi əsərlər toplusunda, (Bakı, 2018), Rafiq Əsrəf oğlu Əsgərovun 85 illiyinə həsr olunmuş Beynəlxalq Elmi Konfransın materialları toplusunda (Bakı, 2018), “9th Trends in Medical Mycology” elmi konfransda (Nitsa, 2019), Azərbaycan Tibb Universitetinin 90 illik yubileyinə həsr olunmuş beynəlxalq elmi-praktik konqresin materiallarında (Bakı, 2020), “ASM Microbe Online” konfransında (2020), “9th Advances Against Aspergillosis” elmi konfransda (Luqano, 2020), “Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates” - International Electronic Scientific and Practical Journal “WayScience” elmi konfransda (2020), «10th Trends in Medical Mycology» (Aberdin, 2021) elmi konfransda, «1st international Azerbaijan Laboratory medicine congress & LAB EXPO» (Bakı, 2023) elmi konfransda.

Dissertasiya işinin ilkin müzakirəsi Azərbaycan Tibb Universitetinin Tibbi mikrobiologiya və immunologiya kafedrası, Bioloji kimya, Yoluxucu xəstəliklər, Epidemiologiya və Uşaq-yeniyyət mələrin sağlamlığı və əmək sağlamlığı kafedralarının kafedralarası iclasında (06.12.2021-ci il; Protokol №04) keçirilmişdir. Azərbaycan Tibb Universitetinin nəzdində fəaliyyət göstərən BED 4.19 Birdəfəlik Dissertasiya Şurasının Birdəfəlik Elmi Seminarında (15.12.2023-cü il; Protokol №02) məruzə və müzakirə edilmişdir.

Aparılmış tədqiqatın nəticələri Azərbaycan Tibb Universitetinin Tibbi mikrobiologiya və immunologiya kafedrasında tədris prosesində istifadə edilir.

Dissertasiya işinin yerinə yetirildiyi təşkilat: Azərbaycan Tibb Universitetinin Tibbi Mikrobiologiya və immunologiya kafedrasının nəzdində Elmi-Tədqiqat Tədris-Klinik Mikrobiologiya Laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Dərc edilmiş elmi işlər: Dissertasiyanın materiallarına əsasən 19 iş nəşr olunmuşdur. Bunlardan dördü ölkə xaricindəki jurnallarda olmaqla 9 məqalə və beşi ölkə xaricində olmaqla 10 tezisdir.

Dissertasiyanın həcmi və quruluşu:

Dissertasiya işi A4 formatında, “*Times New Roman*” 14 şrifti və 1,5 sətirarası intervalla rus dilində yazılmışdır. Dissertasiya işi mündəricat (2595), giriş (14939), ədəbiyyat xülasəsi (49408), tədqiqatın material və metodları (47480), tədqiqatın nəticələri (32535), alınan nəticələrin müzakirəsini (41077) əhatə edən 4 fəsildən, nəticələr (1364), praktik tövsiyələr (1311), istifadə olunmuş ədəbiyyat və ixtisarların siyahısından (3086) ibarət olmaqla 177 səhifədə (işarə ilə ümumi həcmi 193795) verilmişdir. Dissertasiya 26 cədvəl, 29 şəkil və 3 diaqramla təsvir edilmişdir. İstifadə olunmuş ədəbiyyat 207 mənbədən ibarətdir ki, onların da əksəriyyəti ingilis dilindədir.

TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODLARI

Göbələk xəstəliklərinin yükünün qiymətləndirilməsi. Göbələk xəstəliklərinin ümumi yükünün və onların arasında *Aspergillus* ilə əlaqəli xəstəliklərin nisbətinin qiymətləndirilməsi məqsədilə beynəlxalq məlumat bazalarında (*Pubmed*, *Google Scholar* və *elibrary.ru*) dərc edilmiş epidemioloji araşdırmalar tədqiq edilmişdir. Axtarış şərtlərinə “göbələk infeksiyaları və Azərbaycan”, ümumi xəstəliklər (məsələn, “bronxial astma” (BA), “xroniki obstruktiv ağciyər xəstəliyi” və s.) və spesifik göbələk infeksiyaları (məsələn, “invaziv aspergilloz”) daxil edilmişdir. Qeyd edilən bazalarda Azərbaycana aid kifayət qədər məlumat olmadığından *LIFE (Leading International Fungal Education)* modelindən istifadə edilmişdir. İstifadə edilən bu modelləşdirmə prinsipi göbələk infeksiyalarının inkişaf riski yüksək

olan xəstə qrupları arasında göbələk patologiyalarının yükünün hesablanmasına əsaslanır. Tədqiqat zamanı müxtəlif xəstə qruplarında bu və ya digər göbələk infeksiyalarının yayılmasını əks etdirən ədəbiyyat məlumatlarına istinad edilmişdir⁹.

Prospektiv analiz. Prospektiv analizin məqsədi *Aspergillus spp.* ştamlarının həm bütün xəstə qruplarında, həm də müxtəlif ağciyər xəstəlikləri olan xəstə qruplarında izolyasiya tezliyini qiymətləndirmək idi. Birinci halda, ağciyər və ağciyərdənkənar patologiyası olan xəstə qruplarında ştamların aşkaredilmə tezliklərini müqayisə etmək mümkün olmuşdur. İkinci halda, spesifik ağciyər patologiyaları olan qruplarda ştamların aşkaredilmə tezlikləri müqayisə edilmişdir. Prospektiv analiz üçün Xi-kvadrat (χ^2) testi/dəqiq Fisher testi və binar logistik reqressiyadan istifadə edilmişdir. Xi-kvadrat (χ^2) testindən istifadə etməklə (və ya az sayda nümunələrin təhlilində istifadə olunan dəqiq Fisher testi) müxtəlif patologiyalar zamanı *Aspergillus spp.* ştamlarının izolyasiyasının statistik əhəmiyyəti hesablanmışdır. Müstəqil dəyişənlər (tədqiqatımızda xəstənin cinsi, yaşı və xəstəliyi) ilə asılı dəyişən (tədqiqatımızda *A.fumigatus* ştamlarının inkişafının olması və ya olmaması) arasındakı əlaqəni müəyyən etmək üçün binar logistik reqressiyadan istifadə edilmişdir. Başqa sözlə, reqressiya təhlili xəstələrin diaqnozu, cinsi və yaşını nəzərə alaraq *A.fumigatus* inkişafının olması şansının *A.fumigatus* inkişafının olmaması şansına nisbətini hesablamışdır (*OR-odd ratio* - “şanslar nisbəti”). Bu üsul xəstələrin cinsindən, yaşından və xəstəliklərindən asılı olaraq *A.fumigatus* ştamlarının izoləedilmə ehtimalını modelləşdirməyə imkan vermişdir.

Aspergillus ştamlarının izolə edilməsi. 2017-2019-cu illər ərzində Azərbaycan Tibb Universitetinin Elmi-Tədqiqat Tədris-Klinik Mikrobiologiya Laboratoriyasına, Tədris Terapevtik və Tədris Cərrahiyyə Klinikalarına və Azərbaycan Respublikası Elmi-Tədqiqat Ağciyər Xəstəlikləri İnstitutuna müraciət etmiş xəstələrin mmüayinə materialları toplanmışdır.

Alınan nümunələr içərisində xloramfenikol (0,5 q/l) əlavə edilmiş *Sabouraud Dextrose* aqarı (SDA) olan 2 ədəd Petri kasasına

⁹ Osmanov, A., Denning, D. W. Burden of serious fungal infections in Ukraine // *Mycoses*, - 2015, 58 Suppl 5, p. 94-100.

inokulyasiya edilmiş və 37°C-də 7 gün inkubasiya edilmişdir. *Aspergillus spp.* növlərinə xas olan koloniyalardan laktofenol pambıq mavisi ilə boyadılmış nativ preparatlar hazırlanmışdır¹⁰. Morfoloji identifikasiya taksonomik açarlar və təlimatlardan istifadə etməklə həyata keçirilmişdir^{10,11}. Fenotipik olaraq *A.fumigatus kompleksi* kimi müəyyən edilmiş bütün izolyatlar kriptik növləri istisna etmək üçün 48°C-də inkubasiya edilmiş¹² və daha sonra daxili transkripsiya edilən 1 (ITS-*Internal Transcribed Spacers*-1) və 4 (ITS4) “spacer” bölgələrinin sekvenləşdirilməsi ilə identifikasiya edilmişdir¹³.

2017-2019-cu illər ərzində Azərbaycan Respublikasının 8 regionundan (Bakı-Abşeron, Dağlıq Şirvan, Gəncə-Qazax, Şəki-Zaqatala, Lənkəran, Quba-Xaçmaz, Aran və Naxçıvan) torpaq və hava nümunələri toplanmışdır. Ümumilikdə 229 nümunə toplanmışdır: ictimai parklardan (79), xəstəxana parklarından (39), tərəvəz tarlalarından (38), şəxsi bağlardan (25), taxıl tarlalarından (13), xəstəxana havasından (11), meyvə bağlarından (10), günəbaxan tarlalarından (2), üzüm bağlarından (2) zeytunluqlardan (1), zəfəran sahəsindən (1), fıstıq tarlasından (1) və digər sahələrdən (7). Hər torpaq nümunəsindən 2 qram 1% *Tween* 20 və xloramfenikol (0,5 q/l) olan 8 ml distillə suda suspenziyalaşdırılmışdır. 1 saat çökdürüldükdən sonra alınmış supernatantdan (çöküntü üstü məhluldan) 100 µl xloramfenikollu SDA aqarına inokulyasiya edilmişdir. Termostatda 37°C-də 72 saat inkubasiyadan sonra kif göbələyinin inkişafına görə nəticələr dəyərləndirilmişdir. Morfoloji və genetik identifikasiya yuxarıda təsvir edilmiş kliniki izolyatlar üçün təlimatlara uyğun aparılmışdır.

¹⁰ Leck, A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts // *Community Eye Health*, - 1999, 12 (30), p. 24.

¹¹ McClenny, N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus species* by microscopic observation and culture: the traditional approach // *Med Mycol*, - 2005, 43 Suppl 1, p. S125-S128.

¹² Riat, A. Azole Resistance of Environmental and Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Switzerland / Plojoux, J., Gindro, K., Schrenzel, J. [et al] // *Antimicrob Agents Chemother*, - 2018, 62 (4):e02088-17, p. 1-7

¹³ Schoch, C. L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi / Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*, - 2012, 109 (16), p. 6241-6246.

Ştamların molekulyar-genetik identifikasiyası. Ştamların molekulyar-genetik identifikasiyası Adnan Menderes Universitetinin Rekombinant DNT və Rekombinant Zülal Mərkəzində (REDPROM, Türkiyə Respublikası) aparılmışdır.

DNT izolyasiyası üçün kifayət qədər inkişaf əldə etmək üçün *Aspergillus* izolyatları 5-7 gün inkubasiya edilmişdir. Sonra 1 ml fizioloji məhlulda spor suspenziyası hazırlanmışdır və 12000 rpm-də 5 dəqiqə çökdürülmüşdür. Supernatant atılandan sonra qalan çöküntüyə 100 µl DNT ekstraksiya buferi (1M Tris HCl [pH 7.5], IGEPAL® CA-630, Tween 20, proteinaza K [10 mq/ml]) əlavə edilmişdir. Sporlar və DNT ekstraksiya buferi qarışığı olan mikrosentrifuqa sınaq boruları 30 dəqiqə 56°C-də inkubasiya edilmişdir, sonra 8 dəqiqə ərzində 100°C-yə qədər isidilmişdir. Amplifikasiya üçün iki oliqonukleotid praymerdən ITS 1 və ITS 4 (ITS 1, 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; ITS 4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') (Metabion International, Martinsried, Almaniya) istifadə edilmişdir. 30 µL həcmə çatdırmaqla hər test edilən nümunədən 2 µl Master Mix Məhluluna ((2,5 U Tag polimeraza (Fermentas), 10X Tag bufer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,4 pmol praymerlər, 0,2 mM, dNTP)) əlavə edilmişdir.

Polimeraza zəncirvari reaksiya (PZR) «Applied Biosystems SimpliAmp» termal siklerin köməyi ilə aparılmışdır. Ümumilikdə denaturasiya fazası (95 °C - 30 san), yumşalma (50 °C - 30 san), elonqasiya (72 °C - 1 dəq) və 72 °C-də 8 dəq. yekun elonqasiyadan ibarət 35 sikl aparılmışdır. Əldə edilən amplikonlar aqaroz gel elektroforezi ilə ayrılmışdırlar və ardınca sekvenləşdirilmişdirlər (Macrogen, <http://dna.macrogen.com/eng/>)¹⁴. Əldə edilən nukleotid ardıcılıqları və məlum olan nuklein turşusu ardıcılıqları arasında homolojiyanı müəyyən etmək məqsədilə alınan nəticələr bunun üçün nəzərdə tutulmuş proqramlar ailəsini özündə birləşdirən *BLAST* (ing. *Basic Local Alignment Search Tool*-əsas lokal eyniləşdirmə vasitəsi)

¹⁴ Oryaşın, E. Antimicrobial susceptibility patterns of environmental and hospital isolations of enterococci in Aydın / Biyik, H. H., BaşbülübüL, G., Bozdoğan, B. // *Turkish Journal of Biology*, - 2013, 37, p. 514-519.

proqramında işlənmişdir. Proqramdan istifadə etmək üçün <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov> linkinə daxil olmaq kifayətdir.

Antimikotik dərmanlara həssaslıq testi. İzolə edilən bütün *A.fumigatus* ştamlarının İTR, VOR, POS qarşı həssaslıqlarını təyin etmək məqsədi ilə Antimikrob Həssaslıq Testi üzrə Avropa Komitəsinin - *EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)* tövsiyə etdiyi üsul ilə həssaslıq testi aparılmışdır¹⁵. Hər bir antimikotik agent 2% qlükoza əlavə edilmiş RPMI 1640 mühitində durulaşdırılmış və mikrodurulaşdırma yuvacıqlarına 100 µl həcmində əlavə edilmişdir. İnokulumun hazırlanması üçün SDA aqarda inkişaf etmiş 2-5 günlük kulturanın sporları istifadə edilmişdir. Bu məqsədlə sporların *Tween 20* (1%) əlavə edilmiş steril suda suspenziyası hazırlanmışdır. Hemositometr vasitəsilə suspenziyada sporların qatılığı $2-5 \times 10^6$ konidiya/ml-ə çatdırıldıqdan sonra, ondan 10 dəfə durulaşdırma yolu ilə $2-5 \times 10^5$ konidiya/ml yekun qatılıq əldə edilmişdir. Tərkibində antimikotik dərmanlar olan hər mikrodurulaşdırma yuvacığına 100 µl əldə edilən inokulum əlavə edildikdən sonra plənşetlər 37°C-də 48 saat ərzində inkubasiya edilmişdir. MİK kimi qidalı mühitdə göbələklərin vizual (adi gözlə görünən) inkişafının müşahidə olunmadığı antimikotik qatılığı götürülmüşdür. İTR və VOR üçün MİK dəyərləri ≥ 2 mq/L və POS üçün $\geq 0,5$ mq/L olduqda izolyatlar rezistent hesab edilmişdir.

Rezistent ştamların molekulyar-genetik analizi. Ştamların molekulyar-genetik analizi Hollandiyanın Wageningen Universitetinin Genetik Araşdırma Laboratoriyasında aparılmışdır. DNT-nin ekstraksiyası, amplifikasiyası və PZR məhsullarının sekvenləşdirilməsi daha əvvəl təsvir edilmiş protokollar əsasında aparılmışdır¹⁶.

Hər ştamın konidiaları maya ekstraktlı qlükozalılı bulyona (MEQB- 2% qlükoza, 0.3% maya ekstraktı, 1% pepton) əkilmiş və 37°C-də 24 saat inkubasiya edilmişdir. Əldə edilən miselial kütlə DNT

¹⁵ Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds / EUCAST definitive document E.DEF9.3.2. – 2020.

¹⁶ Snelders, E. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism / van der Lee, H. A. L., Kuijpers, J., Rijs, A. [et al.] // *Plos Medicine*, - 2008, 5 (11), p. 1629-1637.

ekstraksiyası üçün istifadə edilmişdir. *Cyp51A* və *cyp51B* genlərinin tam kodlaşdırma ardıcılıqları müəyyən edilmişdir. PZR-amplifikasiya prosesi ilə əlaqəli ardıcılıqlarda dəyişikliklərin əmələgəlmə ehtimalını istisna etmək üçün hər bir izolyat iki dəfə test edilmişdir.

Miseli öncə 1 kağız vərəq üzərinə və daha sonra 6 şüşə muncuq olan 50 ml həcmində polipropilen sınaq borusuna köçürülmüşdür. Bu boru 10 saniyə ərzində maye azota yerləşdirilmişdir, daha sonra borunun tərkibi 30 saniyə ərzində vorteks vasitəsilə qarışdırılmışdır. Bundan sonra qarışığa 0,8 ml ekstraksiya buferi (200 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,01 M EDTA, 1% natrium dodesilsulfat) əlavə edilmişdir. Əldə edilən qarışıq diqqətlə qarışdırılaraq emulsiya əldə etmək üçün bərabər həcmdə fenol-xloroform əlavə edilmişdir. Əldə edilən emulsiya mikroborulara əlavə edilmişdir və 15000rpm-də 15 dəqiqə sentrifuqa edilmişdir. Əldə edilən çöküntü üzərində olan maye iki dəfə ekstraksiya edilmişdir: fenol-xloroform və xloroform ilə. DNT etanolda presipitasiya və sentrifugalasdırma yolu ilə əldə edilmişdir. Çöküntü 10 mM Tris-HCl pH 7.6-da yenedən dayandırılmışdır. 50 µg/ml RNT-aza A ilə 1 mM EDTA (TE)^{17,18}.

Cyp51A və *cyp51B* genlərinin tam ardıcılıqlarının amplifikasiyası zamanı *cyp51A* geni üçün P450-A1 (5'-ATGGTGCCGATGCTATGG-3') və P450-A2 (5'-CTGTC-TCACTGGATGTG-3') praymerlərdən və *cyp51B* geni üçün P450-B1 (5'-ATGGGTCTCATCGCGTTC-3') və P450-B2 (5'-TCAGGCTTTGGTAGCGG-3') istifadə edilmişdir.

PZR 100 µl həcmdə aparılmışdır ((10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM Tris-Cl (pH 8.8), 2 mM MgSO₄, 10 ng ökü zərəb albumini, 0.1% Triton X2-100M, hər dATP, dGTP, dCTP və dTTP-dən 250 µl (Perkin-Elmer Cetus, Madrid, İspaniya), hər praymerdən 1 µM, 2,5 vahid DNT polimeraza Pfu (Promega) və 50 ng genom DNT)). Amplifikasiya termal sikler (Perkin-Elmer Cetus) vasitəsilə

¹⁷ Mellado, E. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations / Garcia-Effron, G., Alcázar-Fuoli, L., Melchers, W. J. [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2007, 51 (6), p. 1897-1904.

¹⁸ Diaz-Guerra, T. M. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2003, 47 (3), p. 1120-1124.

həyata keçirilmişdir. PZR məhsulları pGEM-T vektor sisteminə köçürülmüşdür və sonda DNT “ABI Prism 377” DNT sekvenator (*Perkin-Elmer*) istifadə edilərək sekvenləşdirilmişdir.

Ştamların filogenetik analizi. İzolyatlar arasında genetik oxşarlıqları müəyyən etmək məqsədilə onların filogenetik analizindən istifadə edilmişdir. Oxşar DNT ardıcılıqlarını aşkar etmək üçün ClustalW alqoritmindən (“qonşuları birləşdirmə” üsulundan) istifadə edilmişdir¹⁹. Filogenetik məsafələr maksimum oxşarlıq üsulu ilə hesablanmışdır²⁰. Yuxarıda qeyd edilən bütün təhlillər MEGA X proqram paketindən istifadə etməklə aparılmışdır²¹.

TƏDQIQATIN NƏTİCƏLƏRİ VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Azərbaycanda göbələk infeksiyalarının epidemioloji yükü. Göbələk xəstəliklərinin yükü 2018-ci il üçün hesablanmışdır (Cədvəl 1) və təxminən 225974 (əhəlinin 2,3%-i) təşkil etmişdir.

Aspergillozun payı göbələk patologiyalarının ümumi sayının təxminən **3,5%**-ni təşkil etmişdir. Ən çox rast gəlinən patologiya residivləşən (təkrarlanan) vulvovaginal kandidoz (rVVK) olmuşdur və göbələk patologiyalarının ümumi sayının təxminən **70%**-ni təşkil etmişdir.

rVVK-nın payı nəzərə alınmadıqda, digər göbələk patologiyaları arasında aspergillozun payı **12%** təşkil etmiş olur ki, bu da çox yüksək göstəricidir.

Qafqaz regionunda bu problemlə bağlı çox az epidemioloji məlumat olduğu üçün infeksiyaların yükünün lazımı səviyyədə qiymətləndirilmədiyini hesab edirik²².

¹⁹ Gascuel, O., Steel, M. Neighbor-joining revealed // *Mol Biol Evol*, - 2006, 23 (11), p. 1997-2000.

²⁰ Kannan, L., Wheeler, W. C. Maximum Parsimony on Phylogenetic networks // *Algorithms for Molecular Biology*, - 2012, 7 (1), p. 9.

²¹ Kumar, S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*, - 2018, 35 (6), p. 1547-1549.

²² Huseyov R.M. The burden of serious fungal infections in Azerbaijan / Javadov S., Osmanov A., Khasiyev S [et al.] // *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 2021, 8, p. 1–13.

Göbələk xəstəliklərinin və yanaşı gedən xəstəliklərin klinik simptomlarının oxşarlığı səbəbindən differensial diaqnostikada yaranan çətinliklər göbələk patologiyalarının yükünün qiymətləndirilməsini çətinləşdirən başqa bir amildir.

Cədvəl 1

Azərbaycanda ciddi göbələk infeksiyalarının yükü

	Yanaşı gedən xəstəliyi olan pasiyentlərin sayı				Tezlik (1/100000)	Ümumi yük	
	Xəstəliksiz	Respirator	HİV/QİÇS	KML/Xərçəng	İTŞ		
Ezofageal kandidoz	–	–	579	–	–	5.8	579
Oral kandidoz	–	–	808	–	–	8.1	808
Kandidemiya	–	–	–	–	499	5	499
Candida-peritonit	–	–	–	–	75	0.75	75
rVVK	159489	–	–	–	–	3196	159489
ABAA	–	4927	–	–	–	49.4	4927
AGSA	–	6504	–	–	–	65.2	6504
XAA	–	2307	–	–	–	86.8	2307
İA	–	36	–	81	577	7.0	693
Kriptokokk meningiti	–	–	5	–	–	0.05	5
PSP	–	–	55	–	–	0.55	55
Mukoromikoz	–	–	–	20	–	0.2	20
Göbələk keratiti	?	–	–	?	–	0.12	12
Allergik göbələk sinusiti	50000	–	–	–	–	50	50000
Ümumi yük	209489	14351	1447	101	1151	–	225974

Qeydlər. ABAA – allergik bronx-ağciyər aspergillozu, HİV/QİÇS – insan immun çatışmazlığı virusu/qazanılmış immun çatışmazlıq sindromu, İA – invaziv aspergilloz, İTŞ – intensiv terapiya şöbəsi, KML – kəskin miyeloid leykoz, PSP – pnevmosistoz pnevmoniya, rVVK – residivləşən vulvovaginal kandidoz, AGSA – ağır göbələk sensibilizasiyalı astma, XAA – xroniki ağciyər aspergillozu

“Qızıl” standart hesab olunan kultural üsul aşağı həssaslığa malikdir. Əksər hallarda dəqiq və zamanında diaqnoz qoymaq məqsədilə kompleks tədqiqatlar tələb olunur. Azərbaycanda göbələk infeksiyalarının diaqnostikasının əsas üsulları mikroskopik, kultural və histopatoloji üsullardır. Biopsiya/autopsiya zamanı göbələklərin toxumaya invaziyasının aşkarlanması göbələk infeksiyasının qəti (yekun) diaqnozudur. Mikroskopiya ilə göbələyi müəyyən etmək mümkün deyilsə, kultural və ya molekulyar tədqiqat üsullarının tətbiqi tələb olunur. Bununla belə, kultural üsul nümunələrdə göbələkləri izolə edilməsində aşağı həssaslığa malikdir.

Digər tərəfdən, trombosit sayı aşağı olan immunsupressiv xəstələrdə biopsiya və histopatoloji müayinənin aparılması mümkün deyildir. Bundan əlavə, xəstələr əksər hallarda invaziv prosedurlardan imtina edirlər. Qalaktomannan və β -D-qlükən kimi seroloji diaqnostika üsulları belə hallarda çox faydalıdır.

Göbələk infeksiyaları probleminin daha yaxşı başa düşülməsi profilaktik və müalicəvi tədbirlərin işlənilib hazırlanmasına, Azərbaycanda referent mikoloji laboratoriyasının yaradılması üçün tökan verəcək.

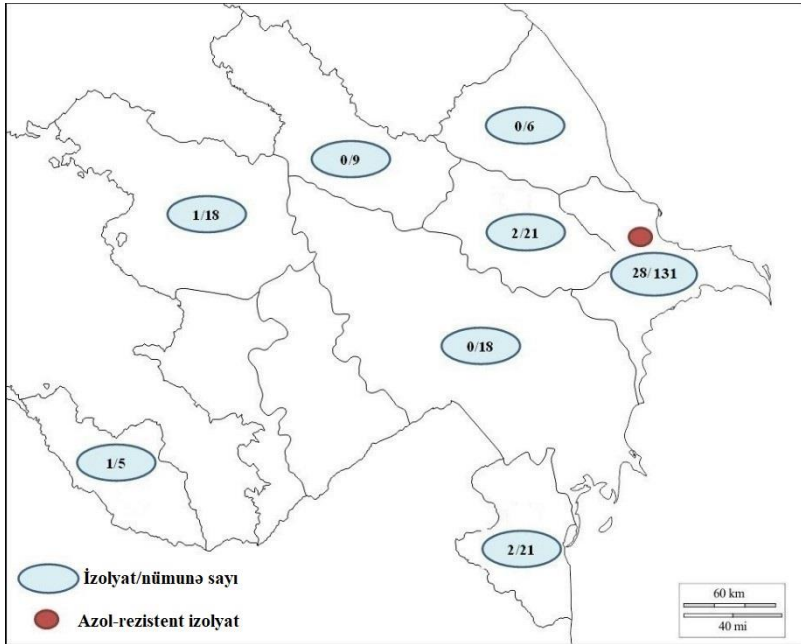
Prospektiv analizin nəticələri. Azərbaycan Respublikasının ətraf mühitində rezistent *A.fumigatus* ştamlarının yayılması qiymətləndirilmişdir. 229 (218-i torpaq və 11-ü hava olmaqla) nümunədən 31 ştam izolə edilmişdir (Cədvəl 2).

Cədvəl 2

Ətraf mühitdən izolə edilmiş *A.fumigatus* ştamları

Region	Nümunələr (n)	<i>A.fumigatus</i> (n)	Rezistent izolyatlar (n)
Bakı-Abşeron	131	26	1
Dağlıq Şirvan	21	2	0
Gəncə-Qazax	18	1	0
Şəki-Zaqatala	9	0	0
Lənkəran	21	1	0
Aran	18	0	0
Quba-Xaçmaz	6	0	0
Naxçıvan	5	1	0
Ümumi	229	31	1

İzolə edilən şamların coğrafi paylanması şəkil 1-də göstərilmişdir.



Şəkil 1. Azərbaycan Respublikasının 8 regionunda izolə edilmiş *A.fumigatus* şamlarının coğrafi yayılması

Qeydlər: mavi dairələr: *A.fumigatus* sayı/nümunələrin sayı. Qırmızı dairə: rezistent ştammin aşkar edildiyi yer

Prospektiv tədqiqat həmçinin, 2 qrup xəstələrdə aparılmışdır: bütün növ yanaşı gedən xəstəliklər olan qrup ($n = 163$) və yalnız ağciyər xəstəlikləri olan qrup ($n = 1170$).

Birinci qrupdakı xəstələrin orta yaşı $41,8 (\pm 18,4)$ il olmuşdur. 165 *Aspergillus spp.* ştammi izolə olunmuşdur, bunlardan 87-si *A.niger*, 28-si *A.flavus*, 19-u *A.fumigatus* və 2-si *A.terreus* olmuşdur. 29 izolyat *Aspergillus* cinsinə qədər identifikasiya edilmişdir. *Aspergillus* növlərinin müxtəlif xəstə qruplarında paylanması diaqram 1-də göstərilmişdir.

Xarici otit (71%) və ağciyər xəstəlikləri (56%) olan xəstələrdə *A.niger* üstünlük təşkil etmişdir. Ağciyər xəstəliyi və xarici otiti olan xəstələrdə ikinci ən çox rast gəlinən növlər müvafiq olaraq *A.fumigatus* (24,0%) və *A.flavus* (23,6%) olmuşdur.

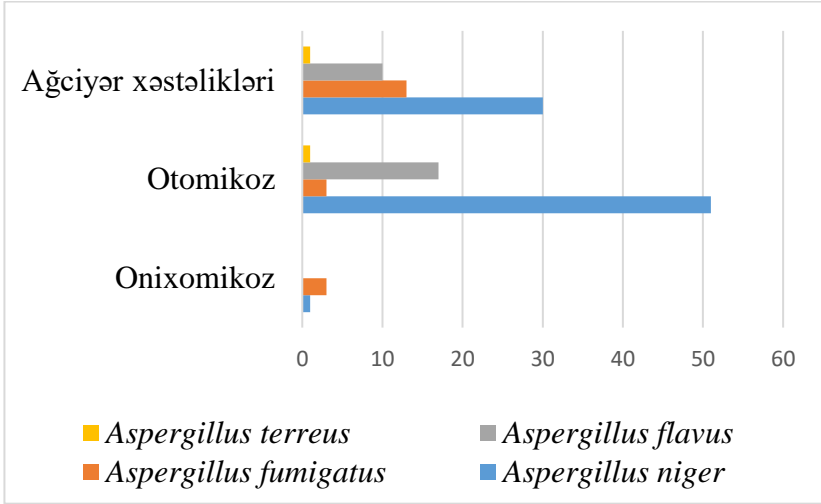


Diagram 1. Müxtəlif pasiyent qruplarında *Aspergillus spp.* növlərinin paylanması

Cədvəl 3-də hər xəstə qrupunda *A.fumigatus* və *Aspergillus spp.* ştamplarının yayılmasındakı fərqlərin statistik əhəmiyyətini müqayisə edilmişdir.

Cədvəl 3

Müxtəlif xəstə qruplarında *A.fumigatus* və *Aspergillus spp.* izolə edilməsi

Əsas xəstəlik	<i>A.fumigatus</i> (19)	<i>Aspergillus spp.</i> (146)	<i>p</i>
ACXOX	5	3	<0.01
AV	4	5	0.02
BA	1	6	1.000
Otomikoz	3	88	<0.01
Digərləri	6	44	1.000

Qeydlər: AX-ağciyər xəstəliyi, ACXOX- ağciyərlərin xroniki obstruktiv xəstəliyi, BA-bronxial astma

AV ($p=0,01$), ACXOX ($p<0,01$) və otomikoz ($p<0,01$) üçün *A.fumigatus* və *Aspergillus spp.* aşkar edilməsində statistik əhəmiyyətli fərqlər müşahidə edilmişdir.

Eyni zamanda, digər ağciyər xəstəlikləri (BA) olan xəstələrdə *A.fumigatus* və *Aspergillus spp.*-nin izolə edilmə tezliklərində statistik əhəmiyyətli fərq müşahidə olunmayıb ($p\geq 0,05$).

Binar reqressiya analizinin nəticələri göstərmişdir ki, *A.fumigatus* izolə edilməsi üçün statistik əhəmiyyətli risk faktoru ACXOX (Şanslar Nisbəti 0.188 95% 0.043-0.816, $p=0,01$). Maraqlıdır ki, logistik reqressiyanın nəticələri AV olan xəstələrdə digər qrup xəstələrlə müqayisədə *A.fumigatusun* izoləedilmə şansının təxminən 5 dəfə aşağı olduğunu (ŞN 0.188 95% 0.043-0.816, $p=0,03$), otomikozlu xəstələrdə isə - 7 dəfə aşağı (ŞN 0.137 95% 0.037-0.516, $p=0,03$) olduğunu göstərmişdir.

Cins, yaş və digər xəstəliklərin olması kimi göstəricilər, reqressiya analizinin təhlilinə əsasən, nəticəyə (*A.fumigatus* izolə edilməsi) əhəmiyyətli təsir göstərməmişdir.

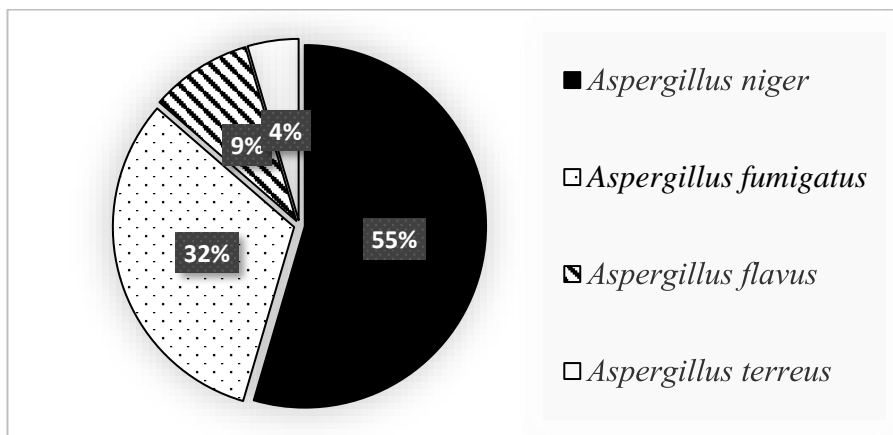
İkinci qrupa müxtəlif ağciyər xəstəlikləri olan 1170 xəstə daxil edilmişdir (orta yaş $[\pm SD]$ 48,8 $[\pm 18,15]$). 22 xəstənin nümunəsində 22 *Aspergillus spp.* koloniyalarının inkişafı müşahidə edilmişdir (1,9%). Xəstələrin orta yaşı 53 ± 18 idi (cədvəl 4, diaqram 2).

Cədvəl 4

Ağciyər xəstəlikləri ilə əlaqəli *Aspergillus* ştamları

Əsas xəstəlik	Xəstə sayı	<i>A.niger</i> (12)	<i>A.fumigatus</i> (7)	<i>A.flavus</i> (2)	<i>A.terreus</i> (1)
ACXOX	178	2	5	0	0
AV	195	1	2	0	1
BA	185	7	0	0	0
Digərləri	-	2	0	2	0

7 ştam ACXOX diaqnozlu pasientdə, 7 ştam - BA, 4 ştam - AV və 4 ştam digər ağciyər patologiyaları olan pasientlərdə aşkar olunmuşdur (kəskin respirator çatışmazlıq, bronxiektatik xəstəlik və ekssudativ plevritli). *Aspergillus* cinsinin 4 növü izolə edilmişdir: *A.niger*, *A.fumigatus*, *A.flavus* və *A.terreus*. Ən sıx aşkar edilən növlər *A.niger* (12) və *A.fumigatus* (7) olmuşdur.



Diaqram 2. İzolə edilən *Aspergillus* ştamlarının proporsiyası

A.niger ən çox BA ilə əlaqəli idi (7 ştamm), *A.fumigatus* isə ACXOX və AV xəstələrdə üstünlük təşkil edirdi (müvafiq olaraq 5 və 2 ştamm).

ACXOX olan xəstələrdə *Aspergillus* ştamlarının izolə olunma tezliyi 3,9% (178 xəstədən 7-də), AV olan xəstələrdə - 2,0% (195 xəstədən 4-də), BA olan xəstələrdə - 3,8% (185 xəstədən 7-də) təşkil etmişdir. Xi-kvadrat (χ^2)/Fişerin dəqiq test nəticələri ACXOX ($p=0,01$), və *A.fumigatus* izolyasiyası arasında əlaqəni göstərmişdir.

Testlərin heç biri (Xi-kvadrat (χ^2)/ dəqiq Fisher testi və binar logistik reqressiya) AV olan xəstələr üçün *A.fumigatus* izolyasiyasında statistik əhəmiyyətli fərqlər göstərməmişdir (müvafiq olaraq $p=0,33$ və $p=0,2$).

Bundan əlavə, Xi-kvadrat (χ^2)/dəqiq Fisher testi BA ($p<0.001$) və *A.niger* izolyasiyası arasında əlaqəni göstərmişdir. *A.fumigatus* əvəzinə asılı dəyişən kimi *A.niger* istifadə edildikdə, reqressiya analizi *A.niger* izolyasiyası ilə BA arasında əlaqənin olduğunu (ŞN 7.303 95% 2.238-23.839, $p<0.001$) göstərir.

Azərbaycanda azol rezistentliyinin yayılması. Tədqiqat zamanı 50 *A.fumigatus* ştamı müayinə edilmişdir, onlardan 19-u klinik nümunələrdən, 31-i isə ətraf mühətdən izolə edilmişdir. Antimikotik həssaslıq testinin nəticələri **Cədvəl 5-də** təsvir edilmişdir.

***A.fumigatus* ştamlarının həssaslıq testi nəticələri**

Mənbə (n)	Antimikotik agent	Rezistent ştamm sayı
Klinik izolyatlar (19)	İTR+VOR+POS	2
	POS	2
Ətraf mühit izolyatları (31)	İTR+VOR+POS	1

50 izolyatdan 3-ü test edilən hər üç azola rezistent olmuşdur, 2-si isə yalnız POS-a rezistent olmuşdur. Bununla belə, 31 ətraf mühit izolyatından yalnız biri bütün azollara rezistent idi (MİK diapazonu 1 - ≥ 8 mq/l). Rezistent ştamm Bakı-Abşeron bölgəsindən aşkar edilib. 19 klinik ştamdan 2-si bütün azollara (41c və 68c) (MİK diapazonu 2- ≥ 16 mq/l), 2 ştamm (64c və 94c) isə POS-a (MİK=0,5 mq/l) rezistent idi.

Klinik ştamlar arasında rezistent ştamların aşkar olunma tezliyi nisbətən yüksək olmuşdur - 21%. Hesab edirik ki, bunun əsas səbəbi sınaqdan keçirilmiş ştamların sayının az - cəmi 19 olmasıdır.

Azərbaycanın ətraf mühitində rezistent ştamların yayılması 0,4% təşkil edir. Rezistent izolyat ictimai parkdan aşkar edilmişdir. Ətraf mühit ştamlarında rezistentlik TR₃₄/L98H və TR₄₆/Y121F/T289A mutasiyaları nəticəsində yaranır, İTR-a yanaşı VOR-a və POS-a da qarşı çarpaz rezistentlik göstərirlər. Rezistentlik səviyyəsi aşağı olan bölgələrdə əsas problem azol rezistent izolyatlarla törədilən sporadik xəstəliklər zamanı ölüm hallarının qarşısının alınmasıdır²³. Beləliklə, hesab edirik ki, MİK testi aspergillozun müalicəsinin effektiv nəticə vermədiyi hallarda aparılmalıdır. VOR-AMB kombinasiyası azol rezistentliyi $\geq 10\%$ olan ərazilərdə isə birinci sıra müalicə kimi tövsiyə edilir³.

Rezistent ştamların molekulyar-genetik analizi. Azol preparatlarına *in vitro* rezistentlik göstərən 5 *A.fumigatus* ştamının *cyp51A* geni sekvenləşdirilmişdir. Bunlardan 4-ü klinik nümunələrdən (41c, 64c,

²³ Lestrade, P. P. A. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management / Meis, J. F., Melchers, W. J. G., Verweij, P. E. et al.] // *Clin Microbiol Infect.* - 2019, 25 (7), p. 799-806.

68c, 94c) və biri ətraf mühitdən (118e) izolə edilmişdir. 5 ştamdan 4-də *cyp51A* genində müəyyən nöqtəvi mutasiyalar aşkar edilmişdir. Yalnız bir ştamda (41c) kombine TR₃₄/L98H mutasiyası - nöqtəvi mutasiya ilə promotor bölgədə tandem təkrarlarının kombinasiyası aşkar edilmişdir. Bu ştamın aşkarlanması faktının özü Azərbaycanda *A.fumigatus* izolyatları arasında rezistent nümayəndələrin və rezistentliyə səbəb olan mutasiyanın mövcudluğunun ilk sübutudur.

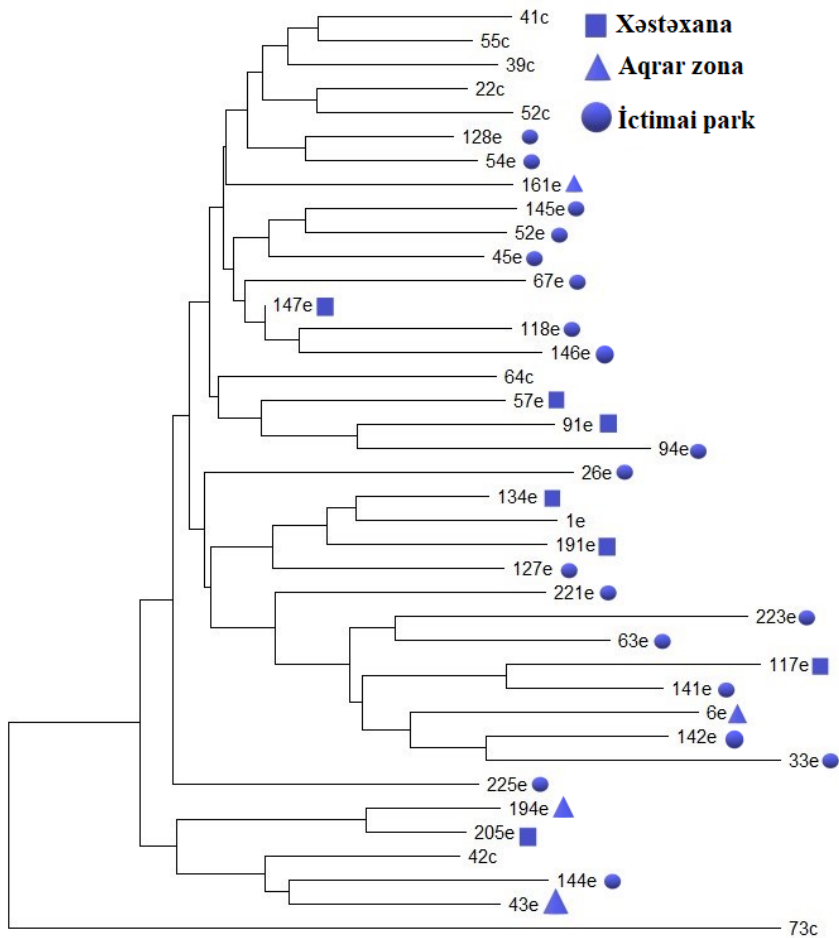
Bu tip mutasiyaya malik ştamların seleksiyasının kənd təsərrüfatında istifadə olunan azol preparatlarının təsiri altında ətraf mühitdə baş verdiyi güman edilir. Tədqiqatımızda klinik nümunədə bu tip mutasiyaya malik bir ştam müəyyən edilmişdir.

Alınan nəticələrə əsasən təxmin etmək olar ki, rezistent *A.fumigatus* ştamlarının seleksiyasının həm xəstələrin müalicəsi zamanı, həm də ətraf mühitdə baş verə bilər. Kənd təsərrüfatında və ətraf mühitdə azol istifadəsinin nəzarət strategiyalarına və klinik təcrübədə antimikrob dərmanlara rezistentlik probleminə kompleks yanaşma vacibdir. Bununla belə, bu göbələkdə rezistentliyin mənbələrini və mexanizmlərini tam aydınlaşdırmaq üçün daha genişmiqyaslı araşdırmalara ehtiyac vardır.

Klinik nümunələrdə rezistent *A.fumigatus* ştamlarının aşkar olunması antimikrob rezistentliyin yayılmasına nəzarət etmək məqsədilə davamlı monitorinqin aparılmasına və strategiyaların işlənilməsinə ehtiyac olduğunu göstərir. Qeyd etmək lazımdır ki, tədqiqat Azərbaycanda azol rezistent izolyatlara dair ilkin məlumatları təqdim edir və alınmış nəticələr göbələklərdə rezistentliyin inkişafına səbəb olan amillərin daha dərinlən öyrənilməsi, eləcə də bu fenomenlə mübarizə aparmaq məqsədilə effektiv strategiyaların hazırlanması üçün başlanğıc ola bilər.

Aspergillus ştamlarının filogenetik analizi. Tədqiqat nəticəsində yaranan filogenetik ağac şəkil 2-də göstərilmişdir²⁴. MEGA X proqram paketindən istifadə etməklə klinik ştamlar və ətraf mühit izolyatları arasında epidemioloji əlaqənin təhlili aparılmışdır²³.

²⁴ Гусейнов Р.М. Филогенетический анализ штаммов *Aspergillus fumigatus*, изолированных из клинических образцов и окружающей среды Азербайджана // *Azərbaycan Tibb Jurnalı*, - 2020, (специальный выпуск), с. 151-155.



Şəkil 2. 39 *A.fumigatus* izolyatının filogenetik ağacı.

Qeydlər: e - ətraf mühitin izolyatları, c isə klinik izolyatlardır

8 klinik ştam və 31 ətraf mühit ştamı tədqiq edilmişdir. 31 ətraf mühit ştamından 19-u ictimai parklardan, 7-si xəstəxana torpağından və havasından, 4-ü isə kənd təsərrüfatı sahələrindən izolə edilmişdir.

Filogenetik təhlil, 5 klinik (22c, 39c, 41c, 52c və 55c) ştamların və ətraf mühitdən (ictimai parklar) izolə edilən 54e və 128e ştamları arasında, 64c ştamı və 57e, 91e və 94e ştamları arasında və 42c

şammı və 143e şamları arasında epidemioloji əlaqənin olduğunu göstərmişdir. Ətraf mühit şamlarından əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənən yeganə klinik izolyat 73c şammı olmuşdur.

Qeyd edək ki, 57e və 91e şamları xəstəxana ərazilərinin torpaq nümunələrindən aşkar edilmişdir. Bu fakt xəstələrin ətraf mühit şamlarından yoluxmaları və yaxud özlərinin rezistent şamm mənbəsi olma ehtimalını göstərir.

Beləliklə, tədqiqatımız Azərbaycanda rezistent şamların və rezistentliyə səbəb olan mutasiyanın mövcudluğu faktını müəyyən etdi. Mutant şamm test edilmiş bütün azollara (ITR, VOR, POS) qarşı *in vitro* rezistentlik göstərmişdir. Aspergillozun müalicəsində azol preparatlarının birinci sıra dərmanlar olduğunu nəzərə alsaq, bu tip mutasiyaların olması bu patologiyaların müalicəsində ciddi problem yaradır. Klinik nümunələrdən 19 şamm izolə edilmişdir, onlardan 4-ü *in vitro* (21%) rezistentlik göstərmişdir ki, bu da kifayət qədər yüksək rezistentlik səviyyəsidir. 19 şamdan yalnız birində (5%) bütün sınaqdan keçirilmiş azollara qarşı rezistentliyə səbəb olan mutasiya aşkar olmuşdur. 19 klinik şammın analizinə əsaslanaraq mutant şamların yayılması haqda mühakimə yürütmək mümkün deyil, çünki izolyatların sayı statistik cəhətdən əhəmiyyətli nəticə əldə etmək üçün kifayət deyildir. Lakin bu tip mutasiyaların olması faktı belə nəticəyə gəlməyə imkan verir ki, bu növ rezistentlik Azərbaycan Respublikasının ətraf mühitində kifayət qədər yayılmışdır. Bu fərziyyəni təsdiqləmək üçün daha çox sayda xəstəni əhatə edən və daha çox sayda şamm üzərində araşdırma aparılması lazımdır. Bununla yanaşı, hesab edirik ki, tədqiqatımız bu dissertasiyanın əvvəlində qarşıya qoyulmuş bir sıra vəzifələri yerinə yetirmişdir: 1) *A.fumigatus* şamlarının izolə edilməsi; 2) azol rezistent *A.fumigatus* şamlarının aşkar edilməsi; 3) rezistentliyə səbəb olan mutasiyaların aşkar edilməsi; 4) ətraf mühitdən və klinik nümunələrdən izolə edilən şamlar arasında korrelyasiyanın öyrənilməsi.

Hesab edirik ki, tədqiqatın nəticələri ölkənin bütün tibb müəssisələrində nəzərə alınmalıdır. Beləliklə, məqsədi rezistent göbələk şamlarının vaxtında aşkar edilməsi olan referent mikoloji laboratoriyanın təşkili məsələsi aktuallaşmış olur.

NƏTİCƏLƏR

1. 2018-ci ildə Azərbaycanda göbələk patologiyalarının yükü əhalinin 2,3 faizini və ya 225974 nəfər təşkil etmişdir. Bunlardan 7927 nəfər aspergillozun bu və ya digər formasından, o cümlədən, 4927 nəfər allergik ağciyər aspergillozundan (AAA), 2307 nəfər xroniki ağciyər aspergillozundan (XAA) və 36 nəfər invaziv aspergillozdan (İA) əziyyət çəkmişdir.
2. Ağciyər xəstəlikləri olan 1170 xəstədən alınan klinik nümunələrin təhlili göstərdi ki, bu qrup xəstələrdə *Aspergillus* cinsli göbəklərin aşkaredilmə tezliyi 1,9% təşkil edir. *Aspergillus* ştammları AXOX-lu xəstələrin 3,9%-də, AV olan xəstələrin 2,0%-də və BA olan xəstələrin 3,8%-də aşkar edilmişdir.
3. Azərbaycanda kliniki ştammlar arasında rezistent ştammların tezliyi nisbətən yüksək olub, 21% təşkil edir. 19 klinik ştamm izolə edilmişdir, onlardan 4-ü azollara qarşı rezistentlik göstərmişdir (41c, 64c, 68c, 94c).
4. Azərbaycanın ətraf mühitində rezistent ştammların yayılma tezliyi aşağıdır və 0,4% təşkil edir (229 ətraf mühit nümunəsindən 1-də).
5. Azərbaycan Respublikasında ilk dəfə olaraq Avropa ölkələrində geniş yayılmış və ətraf mühitdən qaynaqlanan TR₃₄/L98H mutasiyası aşkar edilmişdir. Ehtimal olunur ki, bu “tandem təkrar-nöqtəvi mutasiya” kənd təsərrüfatı sənayesində istifadə olunan azolların təsiri ilə seleksiya olunub.
6. Tədqiqatımıza daxil olan 39 *A.fumigatus* ştamının filogenetik analizi ətraf mühit ştammları ilə klinik izolyatlar arasında epidemioloji əlaqənin mövcudluğunu təsdiqləmişdir.

PRAKTİK TÖVSIYƏLƏR

1. Azərbaycanda göbələk patologiyalarının diaqnostikasının əsas üsulu kultural üsuldur. Ölkəmiz üçün aktual olan məsələ diaqnostik imkanların təkmilləşdirilməsidir. Buna iki yolla nail olmaq mümkündür: i) referent mikoloji laboratoriya yaratmaqla; ii) böyük klinik mərkəzlərin lazımi diaqnostik testlərlə təchiz edilməsi ilə.

2. Azərbaycanda aspergilloz üçün əsas risk qrupları ACXOX, AV, BA və s. kimi ağciyər xəstəlikləri olan xəstələrdir. Bu faktı nəzərə alaraq, bu xəstələrdə *Aspergillus spp.* infeksiyasının diaqnostikası məqsədi ilə sistemli monitorinqin aparılması vacibdir.
3. Azərbaycan Respublikasının ətraf mühitində rezistent şamların yayılması aşağı səviyyədədir (0,4%). Rezistentlik bu səviyyədə olduqda rutin antimikotiklərə həssaslıq testi aparılmadan empirik müalicə tövsiyə olunur.
4. Tərəfimizdən aşkar edilən TR₃₄/L98H tipli mutasiya AV olan bir xəstədən alınan klinik nümunədən izolə edilmişdir. Bu tip mutasiya eyni vaxtda bir neçə azola qarşı rezistentliyin olmasına cavabdehdir və empirik müalicəyə tabe olmur. Bu fakta əsaslanaraq, azol rezistentliyinə şübhə olduqda (empirik müalicənin təsiri olmadıqda), ağciyər patologiyası olan xəstələrin klinik nümunələrindən izolə edilmiş *Aspergillus* şamlarının antimikotiklərə həssaslıq testinin aparılmasını zəruri hesab edirik.
5. Ətraf mühitdən və klinik nümunələrdən izolə edilən şamlar arasında epidemioloji əlaqənin olması azol funqisidlərinin Azərbaycanda tətbiqi miqyasının öyrənilməsi zərurətini göstərir.

Dissertasiyanın mövzusunə dair dərc olunmuş elmi əsərlərin siyahısı:

1. Гусейнов Р.М. Джавадов С.С. Морфо-биологические особенности штаммов *Aspergillus*, изолированных при отомикозах // Тəbabətin Aktual Problemləri, Bakı, 2018, с. 260.
2. Гусейнов Р.М. Штаммы *Aspergillus spp.*, изолированные у больных с легочными заболеваниями // Azərbaycan Cümhuriyyətinin 100 illik yubileyinə həsr olunmuş Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutunun elmi əsərləri toplusu, Bakı, 2018, с. 201).
3. Гусейнов Р.М. Заболевания, вызываемые грибами рода Аспергиллус // Rafiq Əşrəf oğlu Əsgərovun 85 illik yubileyinə həsr olunmuş Beynəlxalq Elmi Konfrans materiallarının toplusu / - Bakı, - 2018, с. 171.

4. Гусейнов Р.М., Джавадов С.С. Эпидемиология и механизмы азоловой резистентности штаммов *Aspergillus fumigatus* // Sağlamlıq, - 2018, с.22
5. Osmanov, D. Denning, R. Huseynov. The Burden of Serious Fungal Infections in Azerbaijan // 9th Trends in Medical Mycology, - Nice, - 2019, P249. URL: https://drupal.aspergillus.co.uk/conference_abstracts/burden-serious-fungal-infections-azerbaijan
6. Гусейнов Р.М. Хронический легочный аспергиллез как осложнение легочного туберкулеза // Azərbaycan Təbabətinin Müasir Nailiyyətləri, - 2019, 4, с. 116-120.
7. Гусейнов Р.М., Джавадов С.С., Кадырова А.А., Аскерова Ш.М. Диагностическая значимость выделения грибов рода *Aspergillus spp.* из образцов больных легочным туберкулезом // Материалы международного научно-практического конгресса, посвященного 90-летию Азербайджанского Медицинского Университета, - Баку, - 2020, с. 289-290.
8. R. Huseynov, S. Javadov. Phylogenetic Analysis of Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates in Azerbaijan // ASM Microbe Online, - 2020, 401. URL:<https://virtualmeeting.ctimeetingtech.com/asm2020/attendee/eposter/poster/2479?q=aspergillus>
9. Huseynov R.M. Azole- and amphotericin B-resistant *Aspergillus fumigatus* strains isolated from clinical specimens and environment in Azerbaijan / Javadov S.S., Kadyrova A.A., Bozdogan B. [et al.] // 9th Advances Against Aspergillosis, - Lugano, -2020, 28. URL: https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/azole-and-amphotericin-b-resistant-aspergillus-fumigatus-strains-isolated-from-clinical-specimens-and-environment-in-azerbaijan/
10. Huseyov R.M. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens / Javadov S., Kadyrova H., Karalti I. [et al.] // The Journal of Fungus, - Turkey, 2020, 11(1) p.94-100. URL: <https://dergipark.org.tr/en/pub/mantar/issue/53928/705353>
11. Huseyov R.M. Pulmonary Aspergillosis: A Case Report of Invasive Aspergillosis Caused by *Aspergillus fumigatus* / Javadov

- S., Karalti I., Taqiyev B. [et al.] // The Journal of Fungus, - Turkey, 2020, 11(2) p. 101-104. URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1023324>
12. Huseynov R.M. The profile of *Aspergillus* species isolated from clinic specimens in Azerbaijan // 2nd conference - “Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates”-International Electronic Scientific and Practical Journal “WayScience”,-2020, p. 31-32
 13. Гусейнов Р.М. Аллергический бронхолегочный аспергиллез как осложнение бронхиальной астмы / Джавадов С.С., Кадырова А.А., Аскерова Ш.М. [и др.]. Медицинские новости, - 2020, 6, с. 61-63.
 14. Гусейнов Р.М. Филогенетический анализ штаммов *Aspergillus fumigatus*, изолированных из клинических образцов и окружающей среды Азербайджана // Azərbaycan Tibb Jurnalı, - 2020, (специальный выпуск), с. 151-155.
 15. Гусейнов Р.М. Азоловая-резистентность штаммов *A.fumigatus*: клинические последствия, диагноз и лечение // Sağlamlıq, - 2020, 15(2), с. 18-24
 16. Huseyov R.M. The burden of serious fungal infections in Azerbaijan / Javadov S., Osmanov A., Khasiyev S [et al.] // Therapeutic Advances in Infectious Disease. January 2021. doi:10.1177/204993612111043969
 17. E-test performance in determination of *Aspergillus fumigatus* susceptibility to azoles/Javadov S.S., Osmanov A., Denning D.// 10th Trends in Medical Mycology, Aberdeen, -2021, 281-282
 18. Hüseynov R.M. Göbələk infeksiyalarında molekulyar diaqnoz. Ştamların genotipləndirilməsi; nə vaxt lazımdır?// “1st international Azerbaijan Laboratory medicine congress & LAB EXPO”, Baku, 2023, p. 111-112
 19. Гусейнов Р.М., Джавадлы С.С. Азол-резистентные штаммы *Aspergillus fumigatus*, изолированные из клинических материалов и образцов окружающей среды Азербайджанской Республики / Azərbaycan Təbabətinin Müasir Nailiyyətləri, - 2023, 3, с. 50-55.

ŞƏRTİ İXTİSARLAR

1. ABPM - allergik bronxopulmonar mikoz;
2. ABPA – allergik bronxopulmonar aspergilloz;
3. AMB – Amfoterisin B;
4. BA – bronxial astma;
5. BAL – bronxoalveolyar lavaj;
6. MSBA – mikogen sensibilizasiyalı bronxial atma;
7. İİV – İnsan İmmunodefisiti virusu;
8. VOR -vorikonazol;
9. HKH – hematopoetik kök hüceyrəsi;
10. İA – invaziv aspergilloz;
11. İGİ – invaziv göbələk infeksiyaları;
12. İSA – isavukonazol;
13. İTR – itrakonazol;
14. KDA – kartoflu dekstrozalı aqar;
15. KT – kompüter tomoqrafiyası;
16. TYEH – tənəffüs yollarının epitel hüceyrələri;
17. AV – ağciyər vərəmi;
18. MİK – minimum inhibisiya konsentrasiyası;
19. MEK – minimal effektiv konsentrasiya;
20. QTM-qeyri-tuberkulyoz mikobakterioz;
21. KML – kəskin miyeloid leykoz;
22. İTŞ – intensiv terapiya şöbəsi;
23. YİAA-yarımkəskin invaziv ağciyər aspergillozu;
24. POS – posakonazol;
25. PSP – pnevmosist pnevmoniyası;
26. PZR – polimeraz zəncirvari reaksiya;
27. rVVK – residivləşən vulvovaginal kandidoz;
28. TSQR-“transplantın sahibə qarşı” reaksiyası;
29. SDA – Saburo Dekstroz Aqar;
30. QİÇS – qazanılmış immun çatışmazlığı sindromu;
31. GSAA – göbələk sensibilizasiyalı ağır astma;
32. XQ-xroniki qranulematoz;
33. XAA – xroniki ağciyər aspergillozu;
34. XNA-xroniki nekrozlaşan aspergilloz;

35. XKAA-xroniki kavitar ağciyər aspergillozu;
36. XFAA-xroniki fibrozlaşan ağciyər aspergillozu;
37. FLU – flukonazol;
38. BLAST – Basic Local Alignment Search Tool;
39. CDC – Centers for Disease Control and Prevention;
40. CORE – Chronic Obstructive Respiratory diseases in CIS countries;
41. E-test-epsilometrik gradient testi;
42. ECDC – European Centre for Disease Control;
43. ECOFF – epidemiological cut-off values;
44. EORTC/MSG -European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group;
45. ESCMID-ECMM-ERS – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/ European Confederation of Medical Mycology/European Respiratory Society;
46. EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;
47. FISH – Fluorescent *in situ* hybridization;
48. GOLD – Global Initiative for Obstructive Lung Diseases;
49. IDSA – Infectious Diseases Society of America;
50. ITS – internal transcribed rDNA spacer regions;
51. RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium);
52. TR₃₄/L98H – сочетание тандемных повторов (tandem repeats) в промоторном регионе гена *Cyp51A* с точечной мутацией;
53. TRANSNET – Transplant-Associated Infection Surveillance Network

Dissertasiyanın müdafiəsi "23" fevral 2024-cü il tarixində saat 16⁰⁰ Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının Azərbaycan Tibb Universitetinin nəzdində fəaliyyət göstərən BED 4.19 Birdəfəlik Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcəkdir.

Ünvan: AZ1022, Bakı şəhəri, Ə.Qasımlı küçəsi 14 (konfrans zalı).

Dissertasiya ilə Azərbaycan Tibb Universitetinin kitabxanasında tanış olmaq mümkündür.

Avtoreferatın elektron versiyası Azərbaycan Tibb Universitetinin rəsmi internet saytında yerləşdirilmişdir (www.amu.edu.az).

Avtoreferat "25" yanvar 2024-cü il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 17.01.2024
Kağız formatı: 60x84 ¹/₁₆
Həcm: 36076 işarə
Tiraj: 50