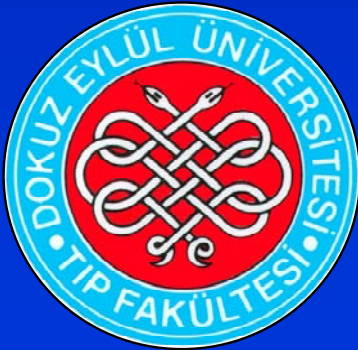


# ANTİFUNGAL DİRENÇ ve ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

**STANDART DUYARLILIK YÖNTEMLERİ  
ve ANTİFUNGAL DUYARLILIK  
TESTLERİNDE NEYİ, NASIL ve NE  
ZAMAN UYGULAMALIYIZ?**



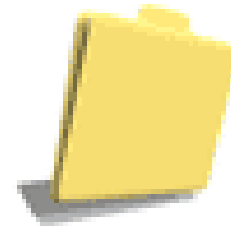
**Mine Doluca Dereli**

**Dokuz Eylül Üniversitesi**

**Tıp Fakültesi**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

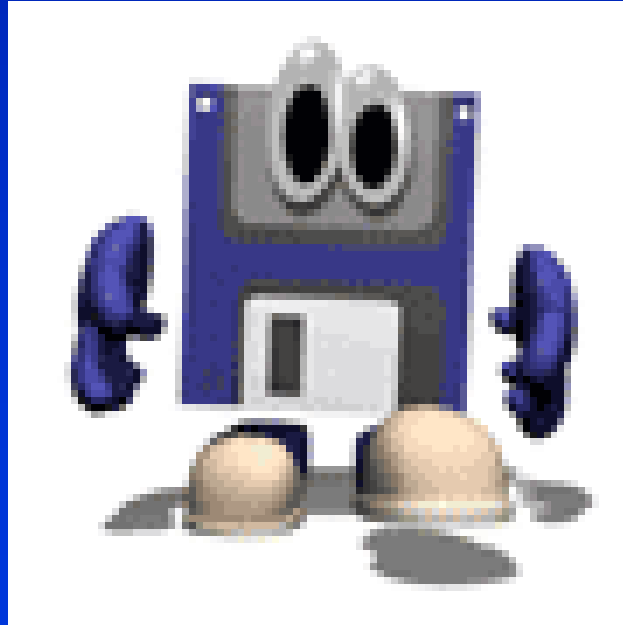
# SUNUM PLANI



- Giriş
- Ne zaman, hangi durumlarda antifungal duyarlılık testleri yapılmalı
- Referans duyarlılık testleri
  - ❖ Mayalar için antifungal duyarlılık testleri
  - ❖ Küfler için antifungal duyarlılık testleri
- CBP / ECV Değerleri
- Sonuç

# GİRİŞ

- İnvaziv fungal infeksiyonların ve antifungal sağaltıma direncin sıklığı artmakta



- uygun sağıaltım stratejilerinin belirlenmesi
- hastaya doğıru antifungal ilacın en kısa zamanda başlanabilmesi
- **antifungal duyarlılık testleri (AFDT)**
  - Epidemiyolojik amaçlı: genel ve bölgesel direnç süurveyansı
  - Rutin hasta sağıaltımının planlanması ve takibi

Her suş için rutin  
AFDT önerilmiyor

Tür düzeyinde  
identifikasyon

**Antifungal Duyarlılık  
Testleri Ne Zaman  
Yapılmalı????**



# Antifungal Duyarlılık Testleri

- Antifungal ilaçların etkinliğini, relatif aktivitelerini belirlemek
- Sağaltım sonucunu tahmin etmek, antifungal sağaltımı takip etmek
- Duyarlı bir popülasyondaki direnç gelişimini izlemek
- Yeni geliştirilmiş antifungal ajanların etki spektrumlarını ve terapötik potansiyellerini saptamak

- Kan ve steril bölgelerden soyutlanan *Candida* türlerine
- Daha önce antifungal ilaç kullanmış hasta suşlarına
- Sağaltıma yanıt vermeyen klinik başarısızlığın izlendiği hasta izolatlarına
  - ❖ *Candida* spp: AmB, FC, FLU, VOR, ekinokandinler
  - ❖ *C. neoformans*: FLU, AmB, FC
  - ❖ *Aspergillus* spp: AmB, POSA, ITRA, VOR

- Nadir ve yeni ortaya çıkan türlere
- Antifungallere dirençli / az duyarlı olduğu bilinen türlere
- Antifungal ajanlara yanıt vermeyen
- Tekrarlayan infeksiyonların izlendiği
- Sekonder direnç gelişimi riskinin olduğu olgulara

➤ Kan ve steril vücut sıvılarından soyutlanan *Candida glabrata* suşlarının

❖ FLU, VOR, ekinokandin

➤ Aynı örneklerden soyutlanan *Candida* dışı maya türlerinin

❖ FLU

rutin değil  
ama yararlı

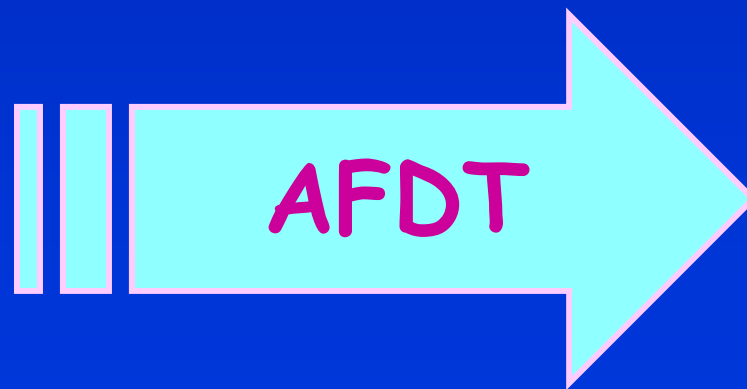
➤ Diğer *Candida* türlerinin

❖ FLU, VOR, ekinokandin, FC

➤ *C. glabrata* dışında düşünülebilir türlerinin ekinokandin duyarlılığı ancak ilk sağaltım yanıtının iyi olmadığı durumlarda

# Invazif Kandidoz Sağaltım Klavuzları

- *C. glabrata* dışında antifungal sağaltıma yanıt vermeyen / azol direnci kuşkusunun kuvvetli olduğu *Candida* türlerine





*MIS FLORES*

# Antifungal Duyarlılık Testleri

- Küf mantarları
- *Aspergillus* suşları
- *Cryptococcus neoformans* suşları için önerilmemekte



düşünülmeli

- ❖ İlk sağaltıma klinik başarısızlığın izlendiği invazif *Aspergillus* ve *C. neoformans* olgularına

➤ *A. terreus*--r

➤ *C. krusei*--

➤ *Crypto*

ekinc

➤ *R* azoller ve  
kinoliner

➤ *Mic* es--VOR, ekinokandinler

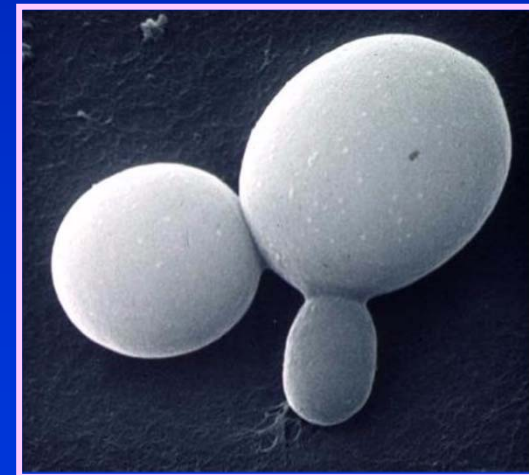
**Intrinsik direnci  
bilinen durumlarda  
AFDT yapılmamalı!!!**



Figura 2. *Cryptococcus neoformans* in Staib agar without creatine.

# Antifungal Duyarlılık Testleri

- ❑ *C. glabrata*
  - FLU, VOR, AmB
- ❑ *C. krusei* ve *C. lusitaniae*
  - AmB
- ❑ *C. rugosa*
  - AmB, FLU





# Antifungal Duyarlılık Testleri

CLSI

EUCAST



Mikrodilüsyon  
Makrodilüsyon  
Disk difüzyon

- Maya mantarları için: CLSI M27-A3 + M27-S4, EUCAST E.Def 7.2, CLSI M44-A2
- Küf mantarları için: CLSI M38-A2, EUCAST E.Def 9.2, CLSI M51-A

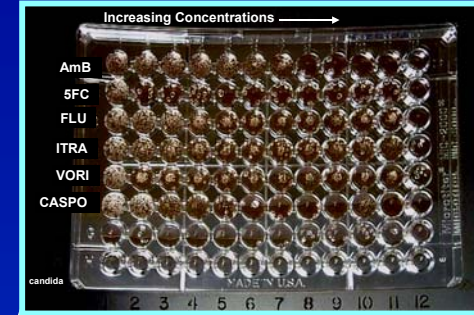


# Mayalar İçin Antifungal Duyarlılık Testleri

| Özellik                          | CLSI M27-A3                                                 | EUCAST E.Def 7.2                                                         |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Uygulanacak türler               | <i>Candida</i> ve <i>Cryptococcus</i>                       | <i>Candida</i>                                                           |
| <u>İnokulum</u>                  | $0.5-2.5 \times 10^3$ KOÜ/ ml                               | $0.5-2.5 \times 10^5$ KOÜ/ ml                                            |
| <u>İnokulum standardizasyonu</u> | Spektrofotometrik                                           | Hemositometrik                                                           |
| <u>Besiveri</u>                  | RPMI 1640 (%0.2 glukoz içerir)                              | RPMI 1640 ve %2 glukoz                                                   |
| <u>Tampon</u>                    | MOPS, pH 7.0                                                | MOPS, pH 7.0                                                             |
| <u>Mikrodilüsyon plağı</u>       | U tabanlı                                                   | Düz tabanlı                                                              |
| <u>Sıcaklık</u>                  | 35°C                                                        | 35°C                                                                     |
| <u>İnkübasyon süresi</u>         | 24-48 saat<br><i>Cryptococcus</i> spp için 72 saat          | 24 saat                                                                  |
| <u>Okuma</u>                     | Gözle / spektrofotometrik (492 nm)                          | Spektrofotometrik (530nm) (405/450nm)                                    |
| <u>Son nokta (sınır değeri)</u>  | AmB için %100; azol ve kandinler için $\geq$ %50 inhibisyon | AmB için $\geq$ 90; 5FC, azoller ve kandinler için $\geq$ %50 inhibisyon |

## ➤ CLSI ve EUCAST maya mikrodilüsyon yöntemlerinin farklılıkları

- İnokulum miktarı farklı
- Besiyeri RPMI 1640 ancak içerdiği glukoz oranı farklı (%0.2 / %2)
- Farklı plak kullanılır (U / düz tabanlı)
- İnkübasyon değişebilir (24-48/24 h)
- Okuma farklı (gözle / fotometrik)
- Son nokta (sınır değer) belirlenmesi farklı (amfo B için %100, azol ve kandinler için  $\geq$  %50; Amfo B için  $\geq$  %90, 5FC, azol ve ekinokandinler için  $\geq$  %50) inhibisyon



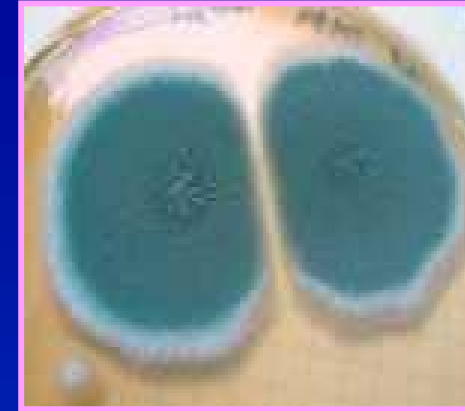
Interlaboratory Variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp.  
Using CLSI and EUCAST Methods: Should the Clinical Laboratory Be  
Testing This Agent?

- ▶ CLSI ve EUCAST verilerinde *Candida* türleri için kaspofungin MİK değerleri ile ilgili çok fazla değişkenlik saptanmış

*Candida* türleri için kaspofungin MİK değerleri çalışılmamalı ve raporlanmamalı; yerine mikafungin ve anidulafungin verisi kullanılmalı



# Küfler İçin Antifungal Duyarlılık Testleri



| Özellik                          | CLSI M38-A2                                                                                    | EUCAST E.Def 9.2                                                                               |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Uygulanacak türler               | Konidyum oluşturan tüm küf mantarları                                                          | <i>Aspergillus</i> türleri ve küfler                                                           |
| <u>İnokulum</u>                  | $0.4-5 \times 10^4$ KOÜ/ ml                                                                    | $1-2.5 \times 10^5$ KOÜ/ ml                                                                    |
| <u>İnokulum standardizasyonu</u> | <u>Spektrofotometrik</u>                                                                       | <u>Hemositometrik</u>                                                                          |
| <u>Besiveri</u>                  | RPMI 1640 (%0.2 <u>glukoz</u> içerir)                                                          | RPMI 1640 ve %2 <u>glukoz</u>                                                                  |
| <u>Tampon</u>                    | MOPS, pH 7.0                                                                                   | MOPS, pH 7.0                                                                                   |
| <u>Mikrodilüsyon plağı</u>       | U tabanlı                                                                                      | <u>Düz tabanlı</u>                                                                             |
| <u>Sıcaklık</u>                  | 35°C                                                                                           | 35°C                                                                                           |
| <u>İnkübasyon süresi</u>         | 48-50 saat                                                                                     | 24-48 saat                                                                                     |
| Son nokta (sınır değeri)         | Azol ve <u>polyenler</u> için üreme olmayan <u>kuyucuk</u> MİK, <u>ekinokandinler</u> için MEK | Azol ve <u>polyenler</u> için üreme olmayan <u>kuyucuk</u> MİK, <u>ekinokandinler</u> için MEK |

# CLSI M38-A2

- Konidyum oluşturan küfler
- Mikrodilüsyon
- İnokulum:  $0.4 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$  KOÜ/ml
- Besiveri: Sodyum bikarbonatsız, glutaminli, fenol  
k... **EUCAST E.Def 9.2** pH:7.0'ye  
ta... **Mucorales için 24,**  
➤ in... diğer küfler için 48 saat
- İnkübasyon süresi: 21-26 saat (*Rhizopus* spp.), 46-50 saat (diğer türler-*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Sporothrix schenckii*) 70-74 saat (*Scedosporium* spp.), dimorfikler için 5-7 gün

# CLSI M38-A2

➤ Son nokta belirlenmesi:  
Gözle değerlendirme

- AmB, itrakonazol, VOR, posaconazol için üremenin tam inhibe olduğu



MİK

## EUCAST E.Def 9.2

-Ekinokandinler dışında görsel olarak üremenin izlenmediği

- Ekinokandinler için düşük konsantrasyon MİK etkili
- Ekinokandinler için MEK için 21-26

MEK

saat, *Scedosporium* spp. için 46-72 saat sonra belirlenir



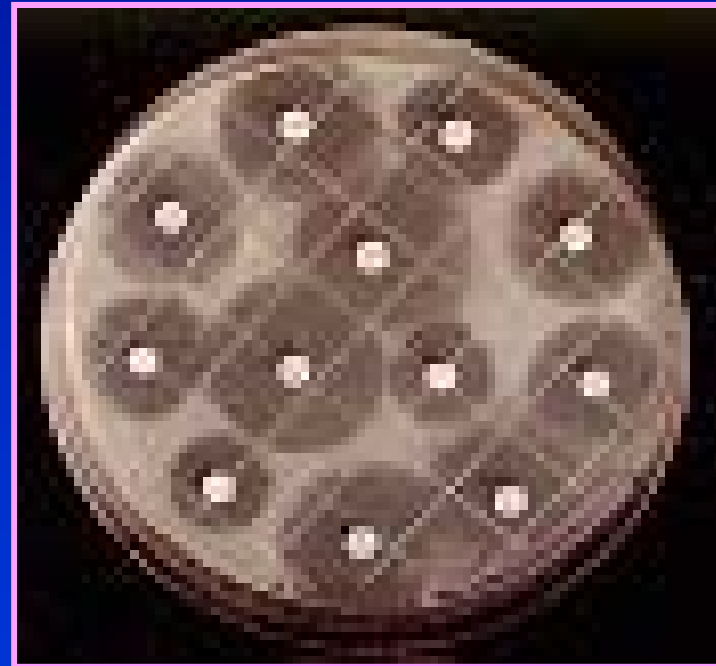
# Disk Difüzyon / CLSI M44-A2

- Mayalar için uygun
- *Candida* / FLU, VOR, POSA ve kaspofungin için standardize edilmiş
- **İnokulum:**  $1-5 \times 10^6$  KOÜ/ml
- **Besiyeri:** Mueller-Hinton agar + %2 glukoz + 0.5 µg/mL metilen mavisi  
pH:7.2-7.4



# CLSI M44-A2

- İnkübasyon ısısı:  
35°C
- İnkübasyon süresi:  
20-24 saat, yeterli  
değil ise 48 saat
- Değerlendirme:  
Üremede belirgin  
azalmanın olduğu  
zon çapı belirlenir



# Disk Difüzyon / CLSI M51-A

- Dermatofit dışı filamentöz funguslar
- Kaspofungin, AmB, triazoller
- Mueller Hinton agar
- İnokulum M38-A2 gibi
- Prosedür maya disk difüzyon gibi
- 35°C'de 16-24 saat mucoraceous funguslar, 24 saat *Aspergillus* spp., 48 saat diğer küfler için
- **Değerlendirme:** Yoğun üremenin azaldığı / yok olduğu inhibisyon zonu en yakın tam mm'ye ölçülür
  - Zon kenarındaki mikrokoloniler ve zon içindeki büyük izole koloniler amfoterisin B dışındaki ilaçlar için dikkate alınmaz





# CBP / ECV Değerleri

- “klinik direnç sınır değerleri” (CBP)
  - türe özgü değerler
- “epidemiyolojik eşik değerler” (ECV) (ECOFFs)
  - sağaltım sonucunu belirleyemez, kazanılmış direnç mekanizmalarının saptanmadığı (“wild- type”) izolatların MİK dağılımlarını belirler
  - “wild-type” ve “non wild-type” suşların ayırımını sağlayan bir eşik değeri
  - ECV üzerindeki MİK değerlerine sahip olan (“non wild-type”) suşlarda direnç gelişimi söz konusu



*Mis Flores*

# SONUÇ

- Mikoloji laboratuvarlarında öncelikle mutlaka tür identifikasyonu yapılmalı
- Sonrasında ancak endikasyonları belirlenmiş durumlarda ve bildirilen suşlara rutin olarak AFDT uygulanmalı
- Bu amaçla referans yöntemler kullanılmalı, sonuçlar kullanılan yönteme uygun olarak yorumlanmalı
- Sonuçların yorumu açısından klinisyenler bilgilendirilmelidir



# Tesekkür ederim

