



Antifungal duyarlılık testlerinde Etest

Dr.M.Ali SARAÇLI

GİRİŞ

- **Antifungal duyarlılık test çalışmalarında artış var.**
- **İdeal yöntem nedir?**
 - **Eşik değerleri tanımlanmış**

UYGULANMAKTA OLAN YÖNTEMLER

- **Sıvı dilüsyon**
- **Disk difüzyon**
- **E-test**
- **Agar dilüsyon**
- **Hazır paneller**
 - **Sensititre Yeast One (TREK Diagnostic Systems, ABD)**
 - **ASTY (Kyokuto Inc., Japonya)**
 - **ATB Fungus 3 (Bio Me´rieux, Fransa)**
 - **VITEK 2 (Bio Me´rieux, ABD)**
 - **Neo-sensitabs (Rosco Diagnostica, Danimarka)**
- **Deneysel**
 - **MTT/XTT redoks ölçümleri**
 - **“Flow cytometry”**
 - **Ergosterol düzey ölçümü**

MEVCUT STANDARTLAR

YÖNTEM	MAYALAR		KÜFLER	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
SIVI DİLÜSYON	M27-A3 (1995-2008)	E.DEF.7.1 (2008)	M38-A2 (2002-2008)	E.DEF.9.1 (2008)
DİSK DİFÜZYON	M44-A2 (2004-2009)	YOK	M51-A (2010)	YOK

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST : The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing/
Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST)

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)

MAYA SIVI DİLÜSYON

M27 A3 (CLSI)	E.DEF.7.1 (EUCAST)
<i>Candida</i> spp. ve <i>Cryptococcus neoformans</i>	Fermentatif mayalar
Makrodilüsyon/mikrodilüsyon	Mikrodilüsyon
RPMI- %0,2 Glukoz/ U tabanlı mikroplak	RPMI- %2 Glukoz/ Düz tabanlı mikroplak
0.5-2.5x10 ³ CFU/ml	0.5-2.5x 10⁵ CFU/ml
35 °C	35 ± 2 °C
Görsel okuma <i>Candida</i> spp. 24 saat- Ekinokandinler 24/48 saat-AMB, FLC, FLU 48 h diğer triazoller <i>C.neoformans</i> 72 saat	530 nm de spektrofotometrik okuma <i>Candida</i> spp. 24 saat
AMB, FLC, AZOLLER, KANDİNLER	AMB, FLC, AZOLLER, KANDİNLER
Kırılma noktası: AMB %100 diğerleri ≥%50	Kırılma noktası: AMB ≥ %90 diğerleri ≥%50

EŞİK DEĞERLER (µg/ml)

	M27 S3 (CLSI) <i>Candida spp.</i>			E.DEF.7.1 (EUCAST) <i>Candida spp.</i>		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R
Flukonazol	≤8	16-32	≥64	≤2	4	≥8
Itrakonazol	≤0,12	0,25-0,5	≥1			
Vorikonazol &	≤1	2	≥4	≤0,125		>0,125*
Flusitozin	≤4	8-16**	≥32			
Kandinler	≤2***					

* *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* dışındaki *Candida* türleri için yeterli bilgi birikimi yoktur.

Duyarlılık sınırının üzerinde MIK değeri çıkan izolatlarda tekrarlanan testte aynı sonuç alınması durumunda dirençli olarak rapor verilebilir.

** “Intermediate” olarak ifade edilir

*** Ekinokandinler (CAS, ANF, MYC) için “dirençli” kategorisi yoktur. >2 µg/ml “Duyarlı değil” olarak ifade edilir.

&: POS için de uygulanmaktadır

CLSI: *C.glabrata* için FLU ≤32 µg/ml S-DD olarak ele alınmalıdır.

Kandinler/Candida Eşik Değerleri

FKS1 mutasyonuna rağmen MLK <2 µg/ml !!.

Anidulafungin	<i>C.albicans, C.tropicalis, C.krusei</i>	>0.5
Kaspofungin	<i>C.parapsilosis</i>	>4
Mikafungin		
Anidulafungin	<i>C.glabrata</i>	>0.5
Kaspofungin		
Mikafungin		

Pfaller MA ve ark. J Clin Microbiol 2010, 48:1592–1599.

Pfaller MA ve ark. Testing TCSfA (2010c) Clinical breakpoints for the echinocandins and Candida revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. Drug Resist Updat (In press).

VURGULANACAK NOKTALAR

- **AMB**
 - Eşik değerler ?
 - MIK aralığı dar. Antibiotic medium-3'de lot farklılıkları !!.
- Eşik değerler sadece *Candida* türleri içindir.
- *Candida* türleri/FLU için 24 saat sonucu.
- “Trailing” durumunda 24 saat sonucu.
 - EUCAST yöntemi
 - **E-test kullanılması**
 - Spektrofotometrik okuma ergosterol ölçümü
 - pH<5.0 olan besiyeri

KÜF SIVI DİLÜSYON

M38 A2 (CLSI)	E.DEF.9.1 (EUCAST)
<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizopus spp.</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Sporothrix schenkii</i> ' nin miçelyal formu, dermatofitler *	Konidya oluşturan küfler
Makrodilüsyon/mikrodilüsyon	Mikrodilüsyon
RPMI- %0,2 Glukoz/ U tabanlı mikroplak	RPMI- %2 Glukoz/ Düz tabanlı
0.2-2.5x10 ⁴ CFU/ml (530 nm spektrofotometrik) **	1-2.5x10 ⁵ CFU/ml (Hemositometrik)
35 °C (<i>Alternaria spp.</i> ve dermatofitler 30 °C)	35 ± 2 °C
Görsel okuma	Görsel okuma
<i>Rhizopus spp.</i> 24 h	Mucorales 24 h
<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>S.schenkii</i> 48 h***	Diğerleri 48 h
<i>Scedosporium spp.</i> 72 h***	
Dermatofitler 4 gün	
Kırılma noktası: %50-100	Kırılma noktası: %100
Ekinokandinler MEK!!!!	Ekinokandinler MEK!!!!

* Dimorfikler, dermatofitler/ekinokandinler, diğer küfler/siklopiroks-terbinafin-griseofulvin değerlendirilmemiştir. ** Dermatofitler için hemositometrik ve 1-3x10³ CFU/ml.

*** Ekinokandinler için üreme görülür görülmez, genelde 24 h daha kısa süreler uygulanır.

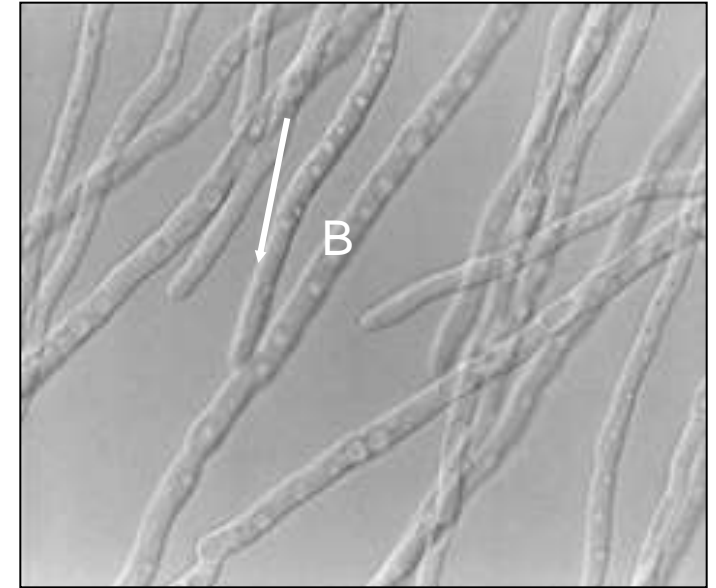
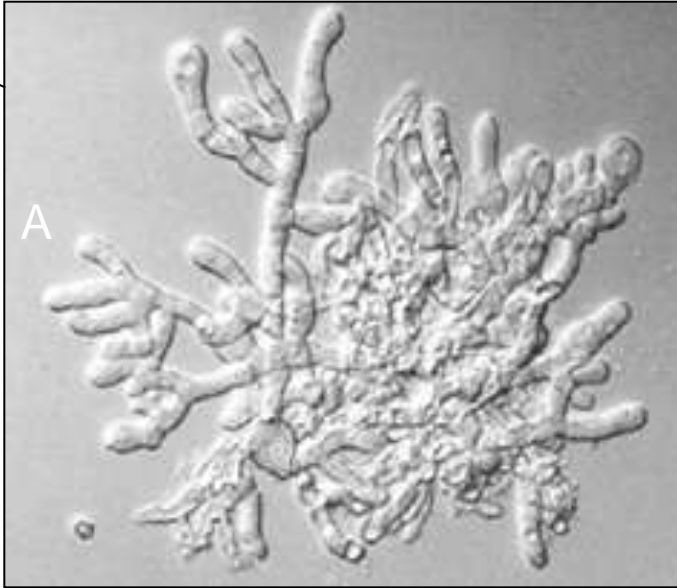
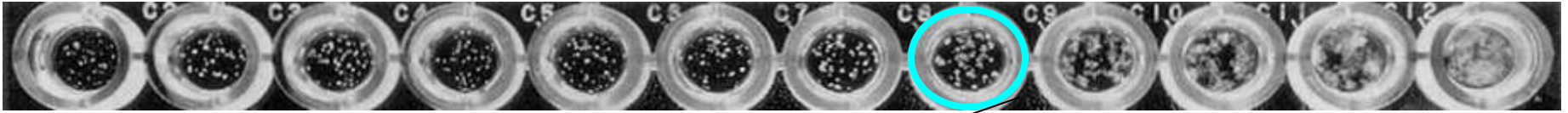
M38-A2 Kırılma Noktaları

- **AMB: %100**
- **ITC, VOR, POS, RAV : %80**
- **KET, FLU, FLC: %50 (dermatofit %80)**
- **Siklopiroks, griseofulvin, terbinafin: %80**

Ekinokandinler ve MEK

- Makroskobik: Mikrokoloniler ve granüler üreme
- Mikroskopik: Kısa, künt, şişkin, çok dallanan hifler

MEK



Kaspofungin/*Aspergillus*

11/42

Kurtz et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(7):1480–1489.

KÜFLERDE EŞİK DEĞERLER

HENÜZ TANIMLANMAMIŞTIR

EPİDEMİYOLOJİK EŞİK DEĞER?

- **VAHŞİ TİP OLARAK ADLANDIRILABİLEN POPÜLASYONUN EN AZ %95'İNİ KAPSAYAN EŞİK MİK DEĞERİDİR.**

DİSK DİFÜZYON

MAYALAR (CLSI, M44 A2) <i>Candida spp.</i>	KÜFLER (CLSI, M51 A)
Müller Hinton agar plakları +%2 glukoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi	Müller Hinton agar plakları
0,5 McFarland standardı (1-5 x 10 ⁶ CFU/ml)	OD 530: 0,09-0,30 (0,4-5,5 x 10 ⁶ CFU/ml)
35 °C Diğer <i>Candida spp.</i> 24 h <i>C.parapsilosis</i> , <i>C.krusei</i> ve <i>C.glabrata</i> : genellikle 48 h	35 °C Zygomycetes 16-24 h <i>A.fumigatus</i> , <i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> 24 h Diğer küfler 24-72 h
FLU (25 µg), VOR (1 µg), CAS (5 µg) POS (5µg) için sadece kalite kontrol	AMB (10 µg), ITC (10 µg), VOR (1 µg), CAS (5 µg), POS (5 µg)
Zon sınırındaki mikrokoloniler ve zon içindeki iri koloniler <u>gözardı edilir</u>	Azoller için zonu aşan hifler, CAS için zon içi mikrokoloniler <u>dikkate</u> <u>alınmaz.</u>

CLSI-M44 DİSK DİFÜZYON

Candida spp. eşik değerleri (mm)

	M-44S2		
	S	S-DD	R
FLU	≥19	15-18	≤14
VOR	≥17	14-16	≤13
CAS	≥11	-	-

***C.krusei* kökenleri FLU'a intrensek dirençli olarak kabul edilirler**

VURGULANACAK NOKTALAR

- ***Candida* türleri için standardize edilmiştir**
- **FLU disk duyarlılık sonucu VOR ve muhtemelen POS ve RAV için belirteçtir.**
- **Dirençli izolatlar mikrodilüsyon ile doğrulanmalıdır.**
- **24 h sonuçları mikrodilüsyon MIK değerleri ve klinik başarı ile daha uyumludur.**

CLSI-M51 DİSK DİFÜZYON

Eşik değerleri (mm)

	KÜFLER (M-51A)		
	S	I	R
AMB	≥15	13-14	≤12
TRİAZOLLAR	≥17	14-16	≤13
CAS			

**AMB testi sadece zigomiçetler için önerilir.
ITC'nin zigomiçetlerde testi önerilmez**

E TEST



E TEST

RPMI+Glukoz+MOPS

- RPMI 1640 (L-glutamin'li) 8.4 g
- MOPS tamponu 34.5 g
- Bacto agar 15.0 g
- D- Glucose 20.0 g
- 1M NaOH 80 – 90 mL
- Deiyonize su ad
1000 mL

450 ml dH₂O-Fitrasyon

450 ml dH₂O-Otoklav

45°C' de birleştir
pH 7.0 ayarla (1 N NaOH)
1000 ml tamamla
Petriye dök (4-5 mm)

- AM3, Casitone agar, YNB ve MHA-GMB

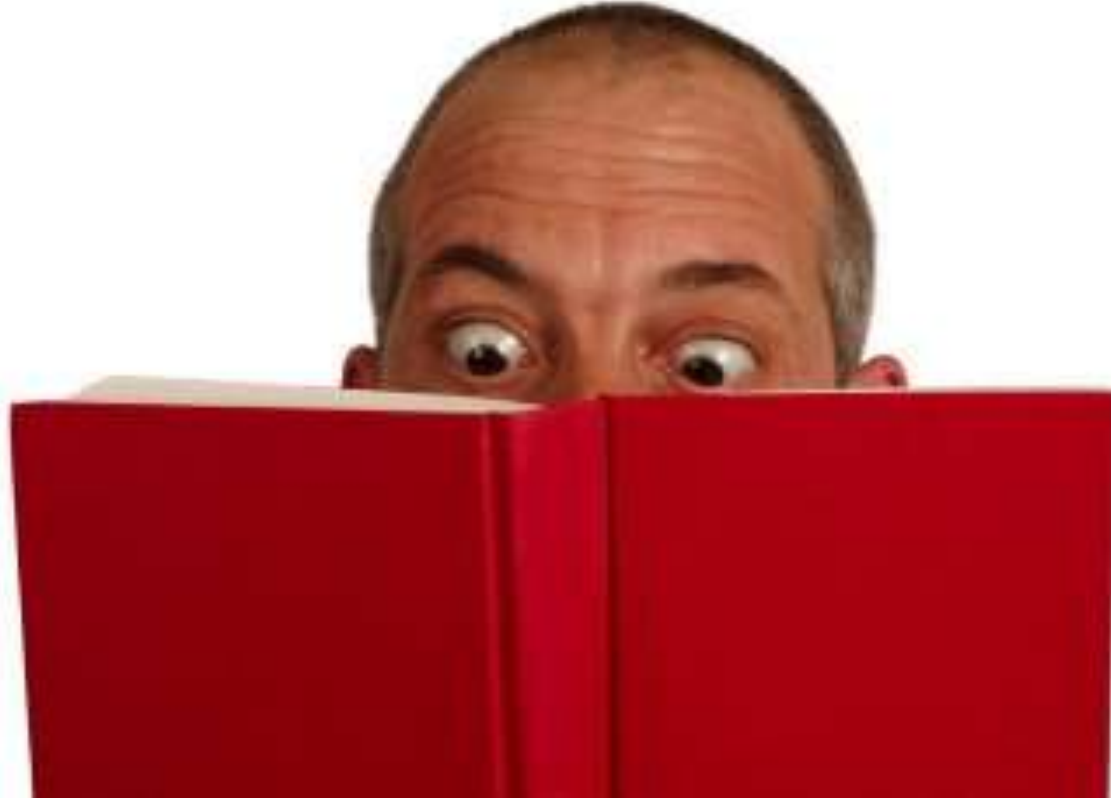
ETEST-MAYA YÖNTEM

- SDA kültürü
- SF ile inokulum ayarla
 - *Candida* türleri: 0.5 McFarland
 - *C.neoformans*: 1 McFarland
- RPMI+%2 glukoz+MOPS (Kuru)
- Torba içinde, 35 °C'de inkübasyon
 - *Candida* türleri 24-48 h
 - *C.neoformans* 48-72 h

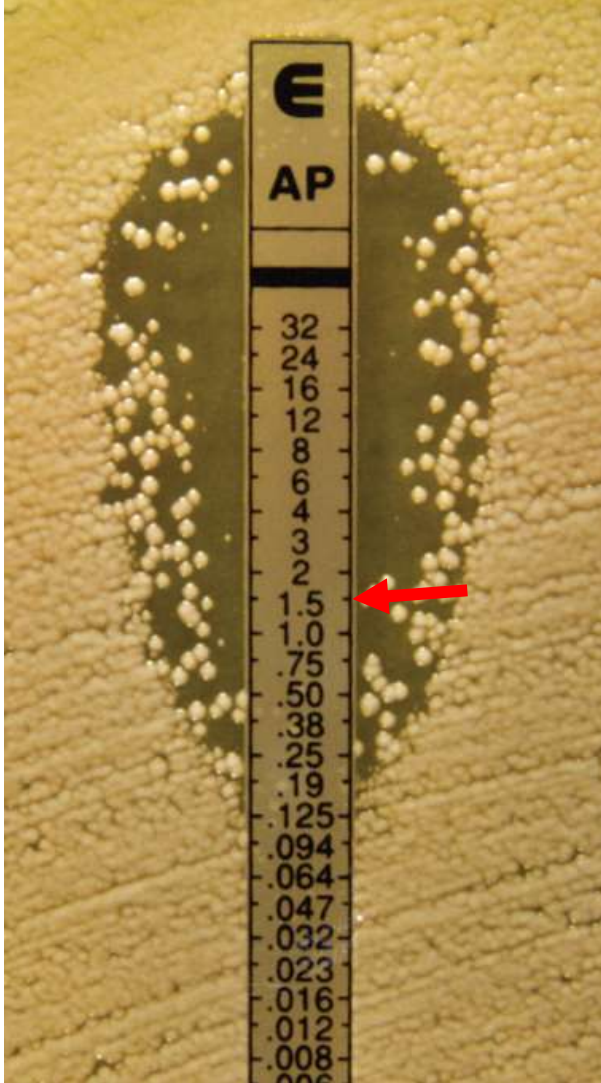
ETEST-KÜF YÖNTEM

- SDA/PDA 3-7 günlük yatık kültür
- SF ile (*Aspergillus* için + %1 Tween 20) süspansiyon
- Steril tüpe aktar, 15 dk partiküller çöksün
- İnokulum ayarla
 - *Aspergillus* spp. 0.5 McFarland
 - *Fusarium* ve *Rhizopus* spp. 0.5-1 McFarland
- **RPMI+%2 glukoz+MOPS** (Taze plaklar kurutulmalı)
- Torba içinde, 35 °C'de inkübasyon
 - *Aspergillus* ve *Rhizopus* türleri 18-24 h
 - *Fusarium* spp. 24-48 h , sonra oda ısısında ilave 24-48 h

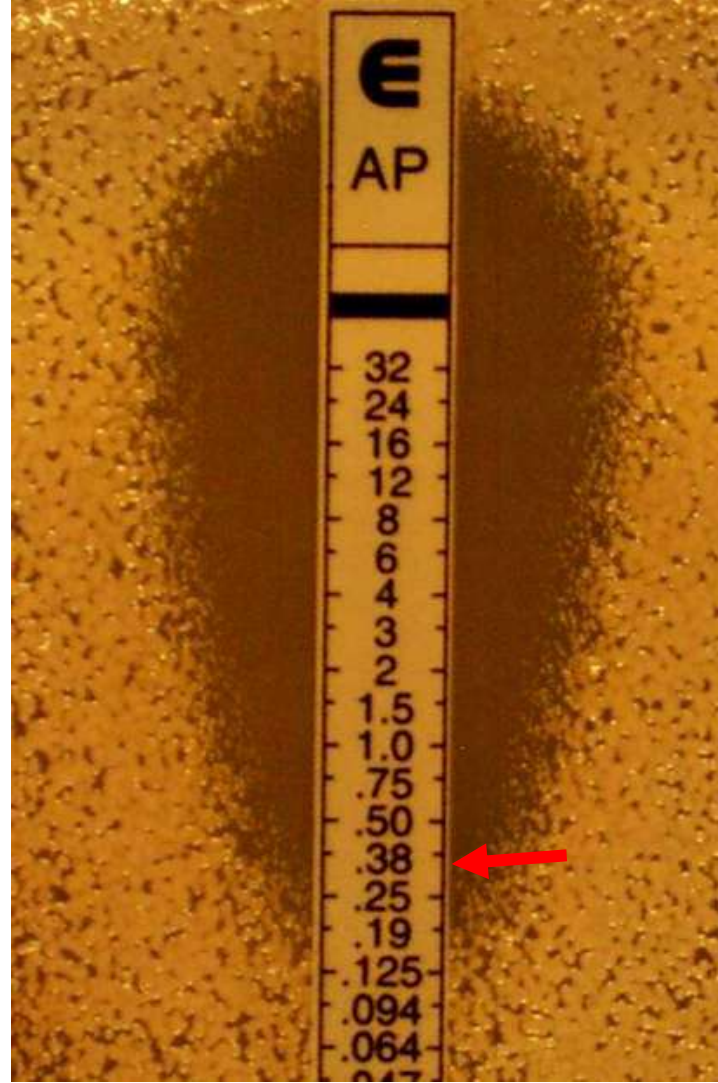
EEST OKUMA ÖLÇÜTLERİ



Amfoterisin B



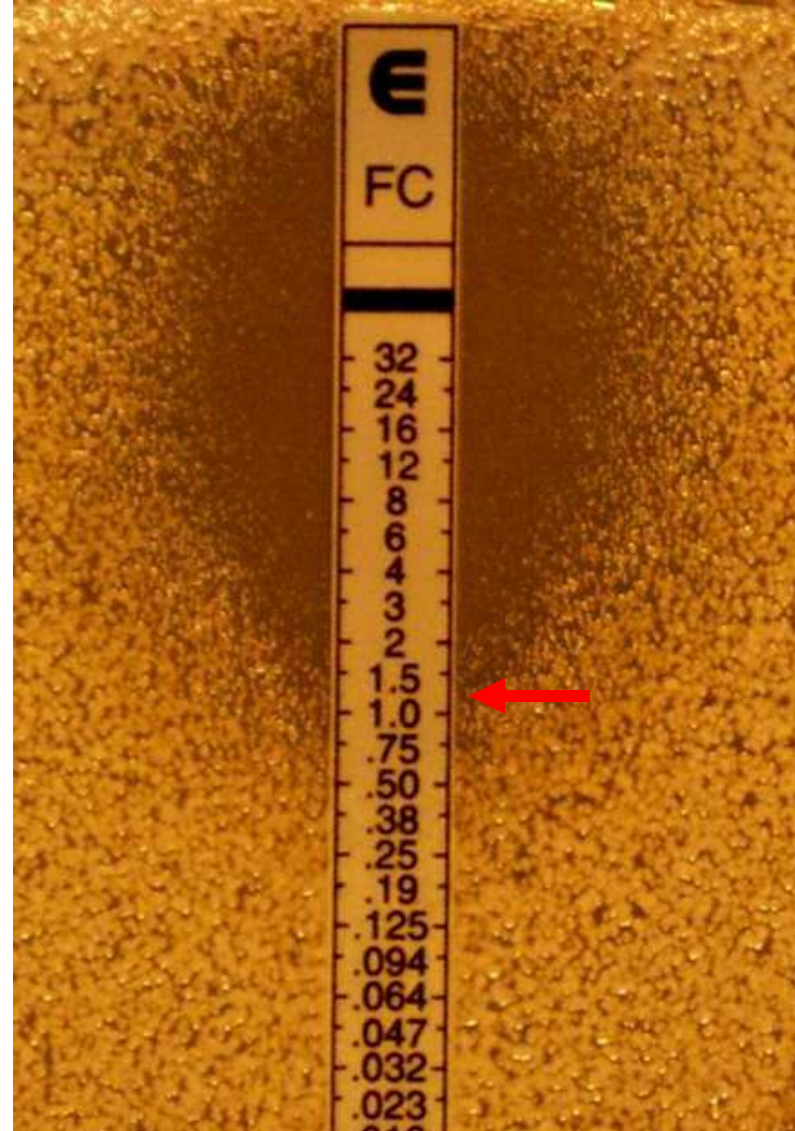
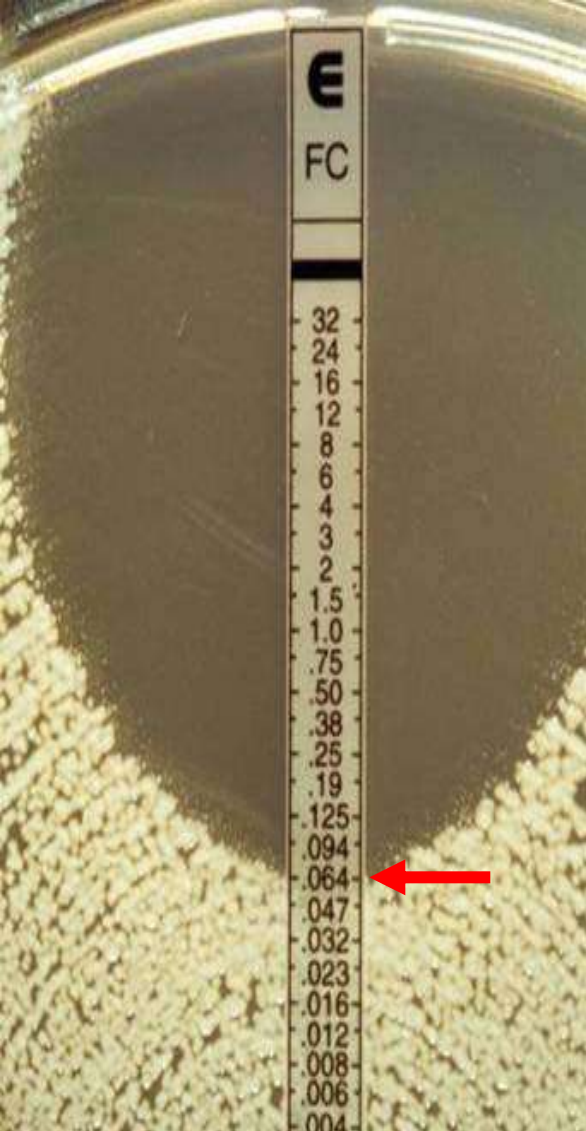
Zon içi iri koloniler



Zon içi küçük koloniler

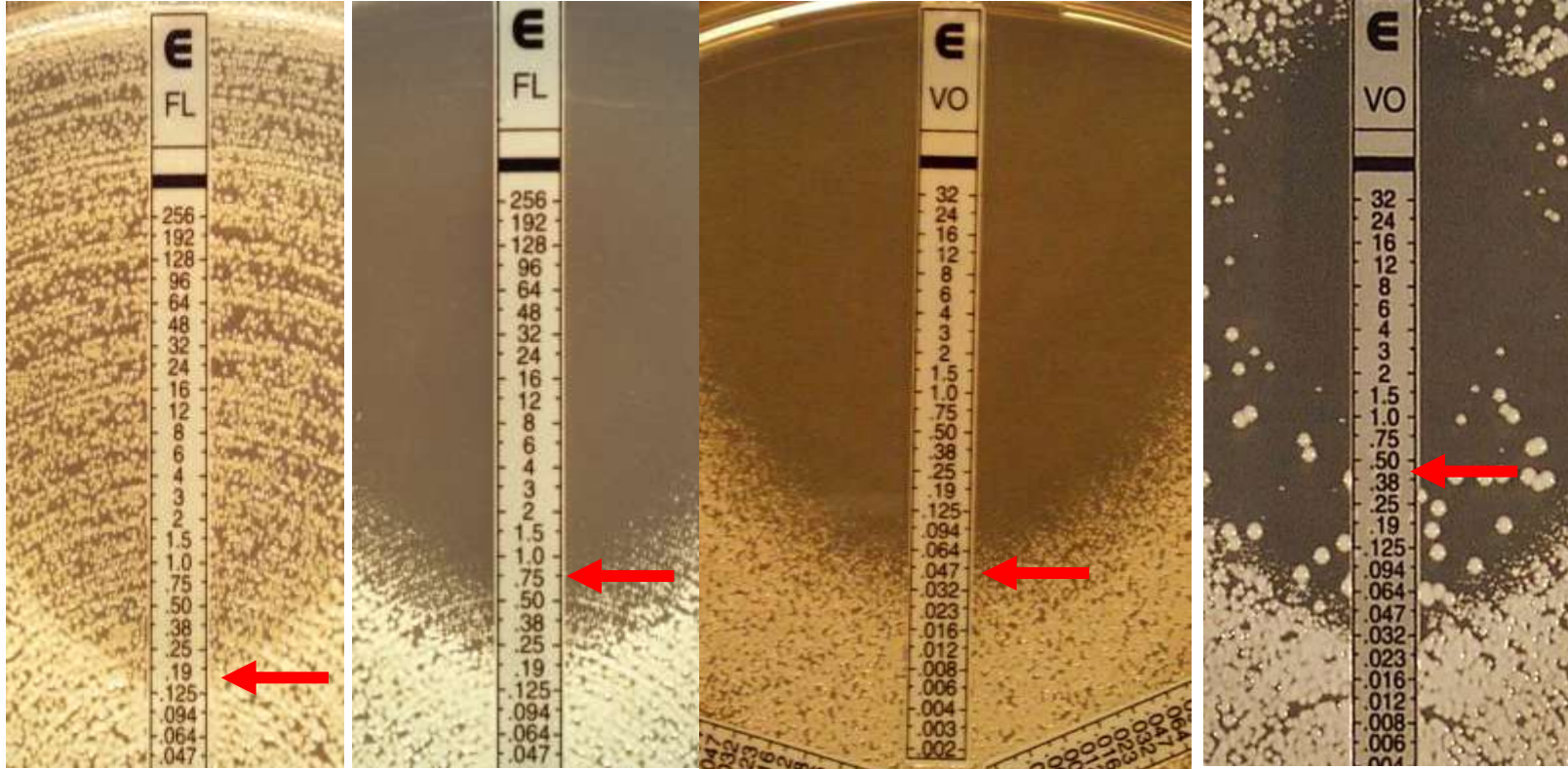
- **%100 inhibisyon**
- **Tüm üremeler dikkate alınır**

Flusitozin



- %90 inhibisyon
- Silik üremeler ve mikrokoloniler gözardı edilir

AZOLLER



Mikrokoloniler

“Mikrokoloni Trailing”
Dar elips

Geniş elips

Makrokoloniler

- %80 inhibisyon
- Üremede ilk değişiklik dikkate alınır
- “Mikrokoloni trailing” durumunda elips dikkate alınır.

EKİNOKANDİNLER



- %80 inhibisyon
- Üremede ilk değişiklik dikkate alınır
- Paradoksal üreme gözardı edilir

E TEST-EŞİK DEĞERLER

MAYALAR İÇİN;

	<u>S</u>	<u>S-DD</u>	<u>I</u>	<u>R</u>
AMB	$\leq 1^*$	-	-	-
ANI, CAS	≤ 2	-	-	-
FLU	$\leq 8^{**}$	16-32	-	≥ 64
ITC	≤ 0.125	0.25-0.5	-	≥ 1
VOR	≤ 1	2	-	≥ 4
FLC	≤ 4	-	8-16	≥ 32

* >1 ise olası dirençli

** *C.krusei* hariç

MAYALARDA ETEST UYUM DEĞERLENDİRMELERİ (≤ 2 dilüsyon)

% Uyumluluk değerleri		AMB	FLC	FLU	ITC	VOR	CAS	ANF
Dannaoui E ve ark. Clin Microbiol Infect 2010	EUCAST	75	90	-	71	87	-	-
Negri M ve ark. J Clin Lab Analysis 2009	CLSI	83	-	64	63	-	-	-
Pfaller MA ve ark. J Clin Microbiol 2010	CLSI						90.2	93,2
Espinel Ingrof A ve ark. Antimicrob Agents Chemother 2010	CLSI	-	-	-	-	-	-	54-82 ^a 88-100 ^b
Claudino AL ve ark. Pharmazie 2008	CLSI	100	96,6	-	-	-	-	-
Matsumoto FE ve ark. Can J Microbiol 2007	CLSI	100	100	67-100 c	45-90 c	88-100	-	-

a: *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*; **b:** *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*

c: ITC ve FLU için düşük değerler *C.glabrata* ve *C.tropicalis*' de gözlenmiştir.

KÜFLERDE ETEST



Aspergillus/vorikonazol

KÜFLERDE ETEST UYUM DEĞERLENDİRMELERİ

Araştırma	Detaylar	%	Not
Martos AI ve ark. Med Mycol 2010	CLSI, Aspergillus, CAS, ANF, MCF	82.4-100	<i>A.niger</i> ve <i>A.glaucus</i> hariç
Araujo J, Espinel Ingrof I. Antimicrobial Agents Chemother 2009	CLSI, <i>A.fumigatus</i> , POS	92 90	24 saat 48 saat

E TEST AVANTAJ

- **Kontaminasyon kolay fark edilir (Dilüsyon)**
- **AMB için MK aralığı daha geniş**
- **İnokulum düzeyi değişkenliklerine tolerans gösterir**
- **MK, mikroorganizma üreme hızlarından etkilenmez**
- **15 dilüsyonluk skalası vardır**

PİYASA BİLGİSİ (2010)

- 30'luk ambalaj: 270 Euro
- 100'lük ambalaj: 780 Euro

Bütçe: 25,8 TL

MEVCUT ANTİFUNGAL ŞERİTLER

Amphotericin B AP {0.002-32 µg/ml}

Anidulafungin AND {0.002-32 µg/ml}

Caspofungin CS {0.002-32 µg/ml}

Fluconazole FL {0.016-256 µg/ml}

Flucytosine FC {0.002-32 µg/ml}

Itraconazole IT {0.002-32 µg/ml}

Ketoconazole KE {0.002-32 µg/ml}

Posaconazole POS {0.002-32 µg/ml}

Voriconazole VO {0.002-32 µg/ml}

KOMBİNASYON TESTLERİ



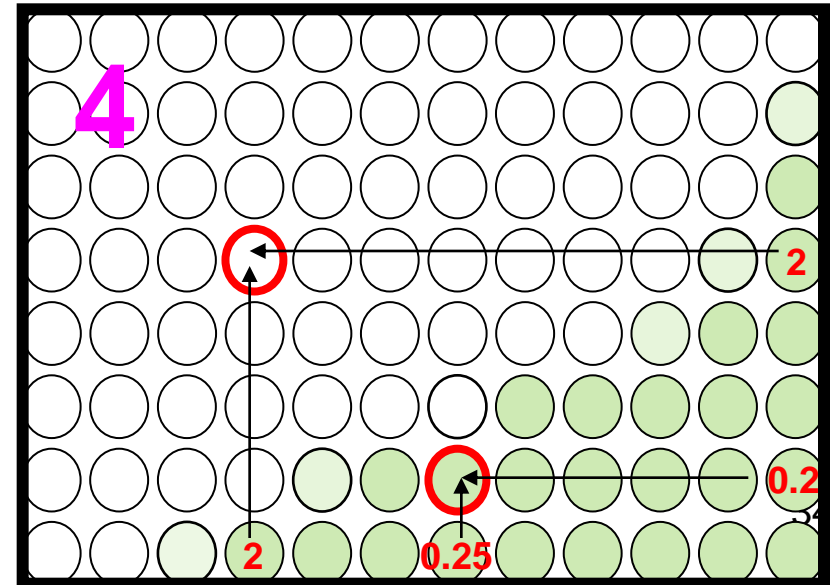
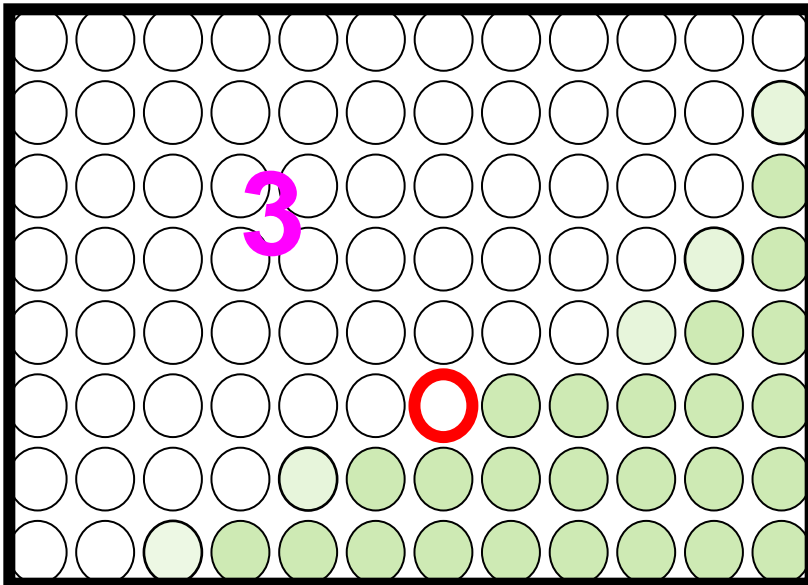
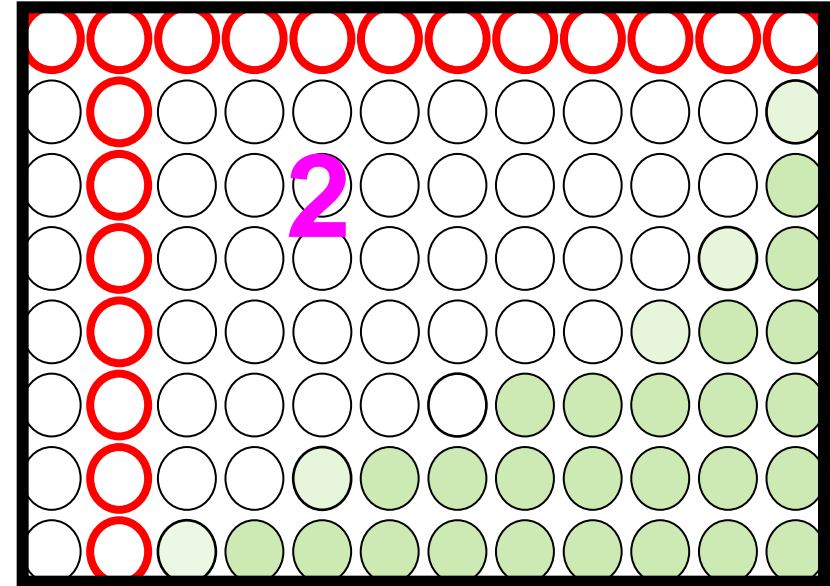
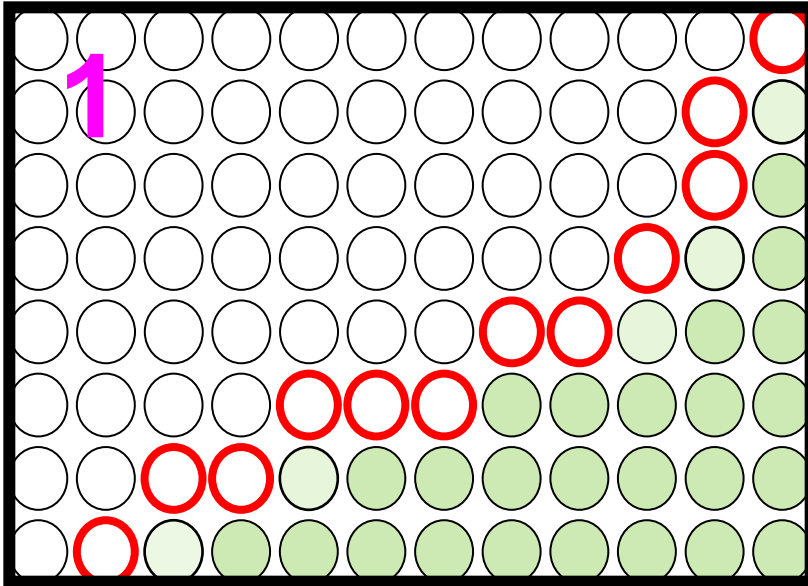
Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) indeksi

$$\sum F_i K_i = \frac{\text{MİK A -kombinasyon}}{\text{MİK A}} + \frac{\text{MİK B-kombinasyon}}{\text{MİK B}}$$

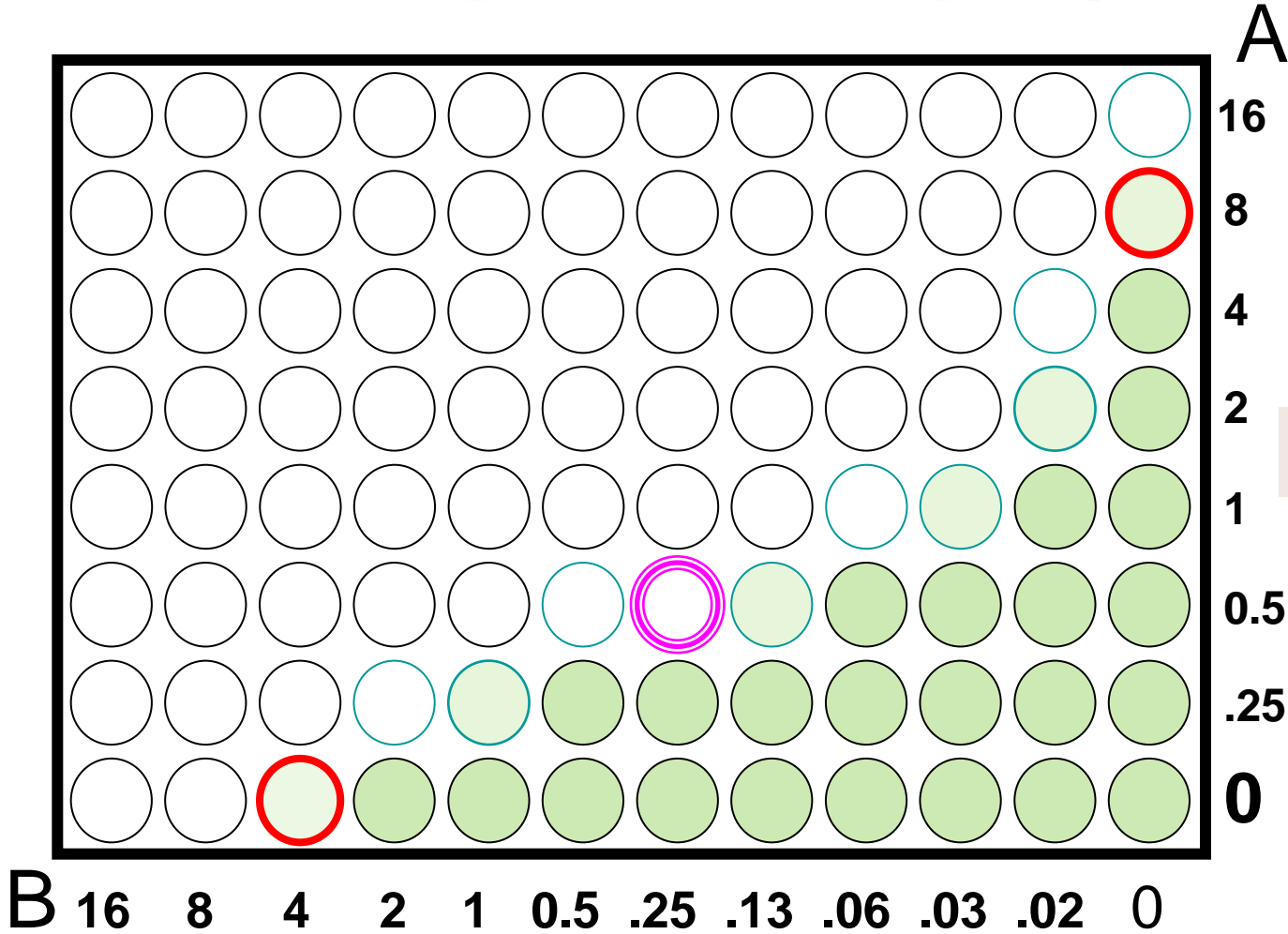
$\sum F_i K_i: \leq 0.5$	sinerji
$> 0.5 - 4.0$	fark yok
> 4.0	antagonizma

- Her bir ilaç kendi kriterlerine göre önce tek olarak okunur
- Kombinasyon MİK değerinin okunması farklılıklar gösterir
- Meletiadis J ve ark. Antimicrobial Agents Chemother 2010, 54(2):602.
FİKİ: ≤ 0.5 sinerji ; $> 0.5 - 2.0$ fark yok ; > 2.0 Antagonizma
- Fothergill AW ve ark. Infect Dis Clin N Am 2006, 20:699.
FİKİ: ≤ 0.5 sinerji ; $> 0.5 - 1.0$ fark yok ; > 1.0 Antagonizma

FİKİ HESAPLAMA YÖNTEMLERİ



MİKRODİLÜSYON KOMBİNASYON TESTİ

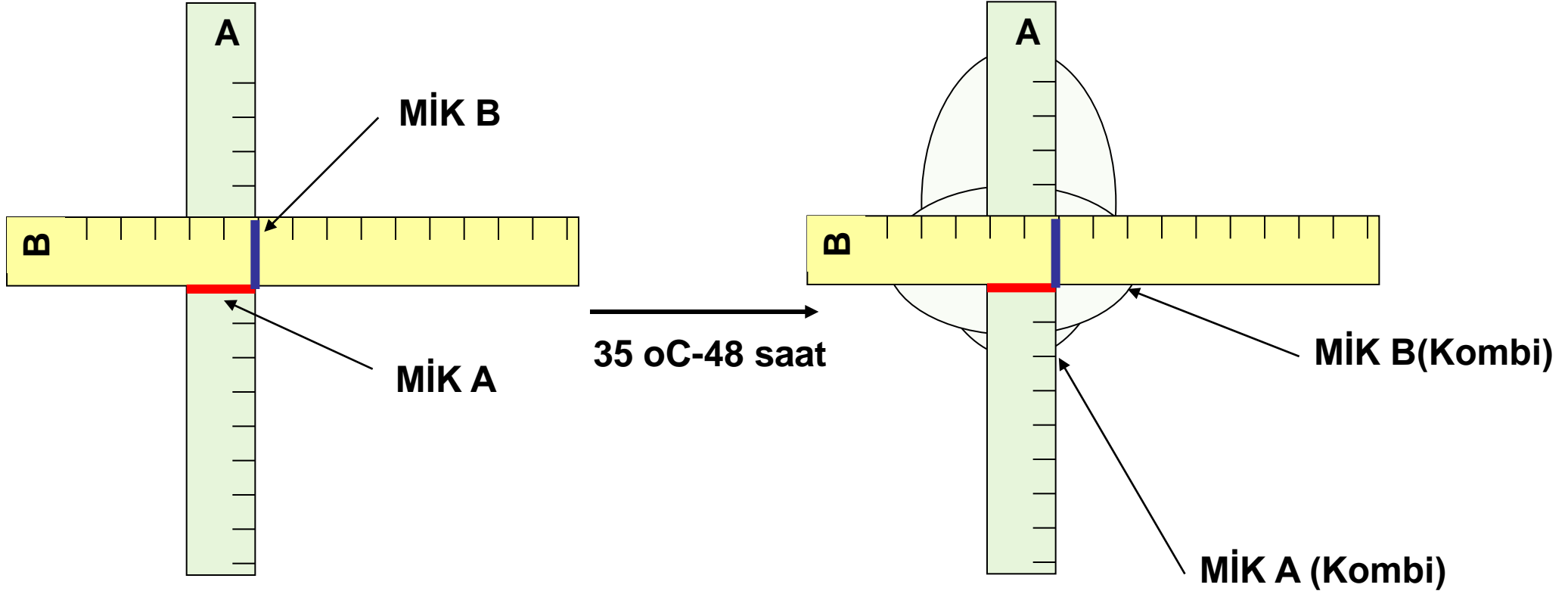


$$\sum F_i K_i = \frac{1.7}{8} + \frac{0.7}{4} = 0.39$$

$$\sum F_i K_i = \frac{0.5}{8} + \frac{0.25}{4} = 0.13$$

E TEST KOMBİNASYON TESTİ

Yöntem 1



E-TEST KOMBİNASYON TESTİ



Sadece FL için MİK değeri

Kombinasyonda FL için MİK değeri

$$\sum FIKI = \frac{0.125}{0.38} + \frac{8}{24} = 0.66$$

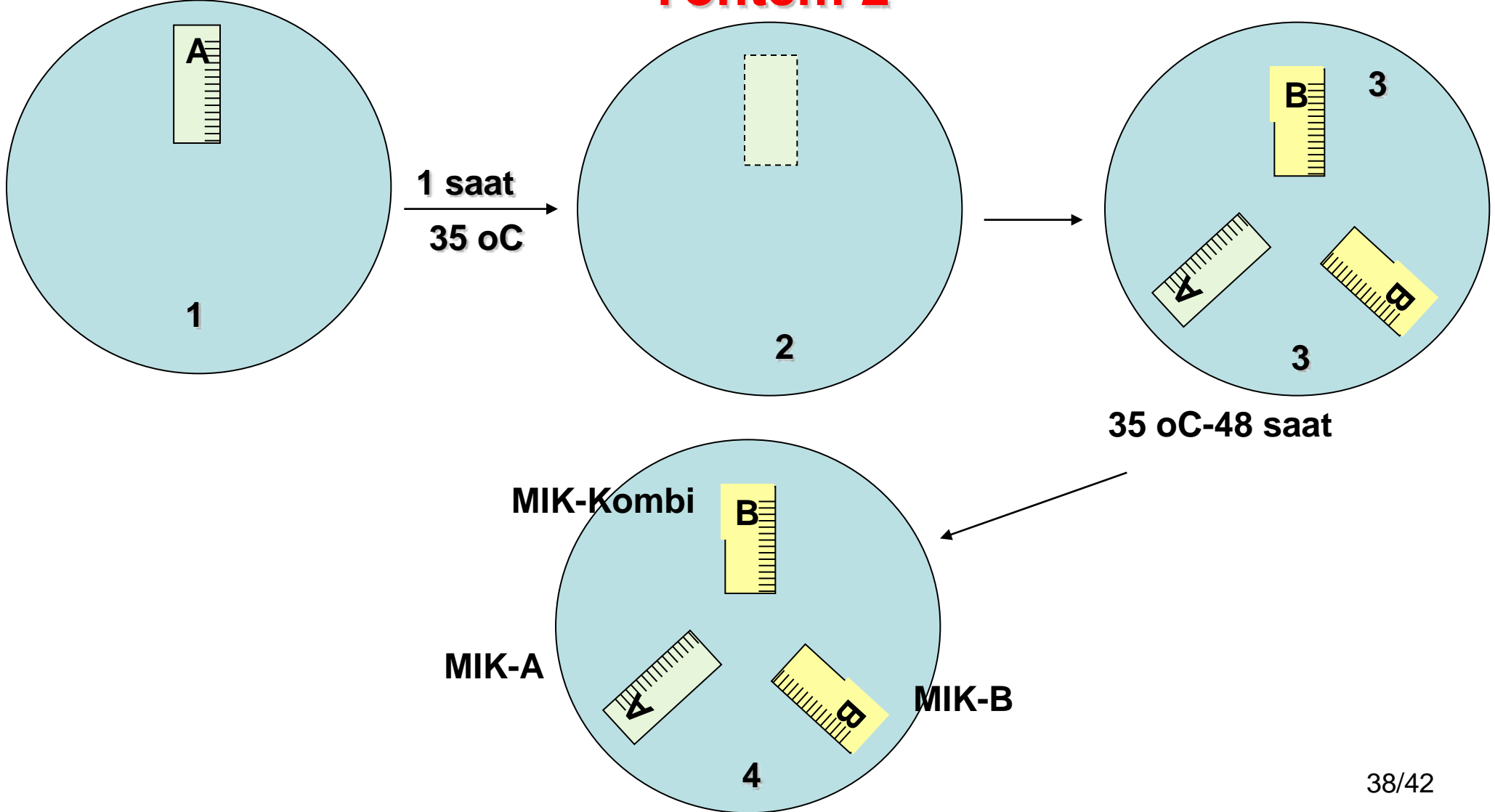
YORUM: FARK YOK

Sadece CS için MİK değeri

Kombinasyonda CS için MİK değeri

E-TEST KOMBİNASYON TESTİ

Yöntem 2



E-TEST KOMBİNASYON TESTİ

Alternatif Değerlendirme Yöntemi

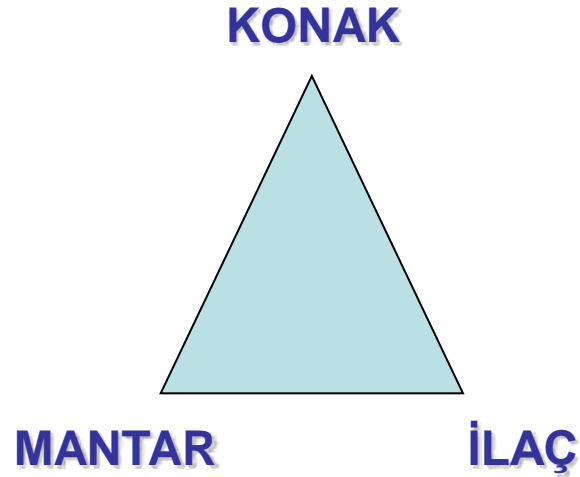
Sinerji	≥ 3 dilüsyon MİK azalması
Additif etki	2 dilüsyon MİK azalması
Fark yok	< 2 dilüsyon MİK azalması
Antagonizma	≥ 3 dilüsyon MİK artışı

Lewis RE ve ark. J Antimicrob Chemother 2002; 49:345-51.

SONUÇ OLARAK

- **Antifungal duyarlılık testleri rutin değil endikasyon dahilinde kullanılmalı**
 - **Epidemiyolojik nedenler**
 - **Steril vücut bölgelerinden izole edilen kökenler**
 - **Ampirik tedavi protokolleri hazırlanması**
 - **Tedaviye yanıtsızlık**
 - **Aynı etkenle tekrarlayan enfeksiyon**
 - **Nadir kökenler**
 - **Direnç olasılığı yüksek durumlar (FLU-*C.glabrata*)**

- **Etken mutlaka tür düzeyinde tanımlanmalıdır**
- **Bilinen dirençlerde rutin test gerekli değildir.**
 - **AMB - *A.terreus***
 - **FLU - *C.krusei***
- **Test sonuçları kıyaslanırken yöntem farklılıkları dikkate alınmalıdır.**



- **Düşük MİK ≠ Klinik Başarı**
- **90/60 kuralı unutulmamalı***
- **Konağa ve ilaca bağlı faktörler daha önemlidir**

* Rex, J.H., Pfaller, M.A., 2002. Clin Infect Dis 35: 982–989.