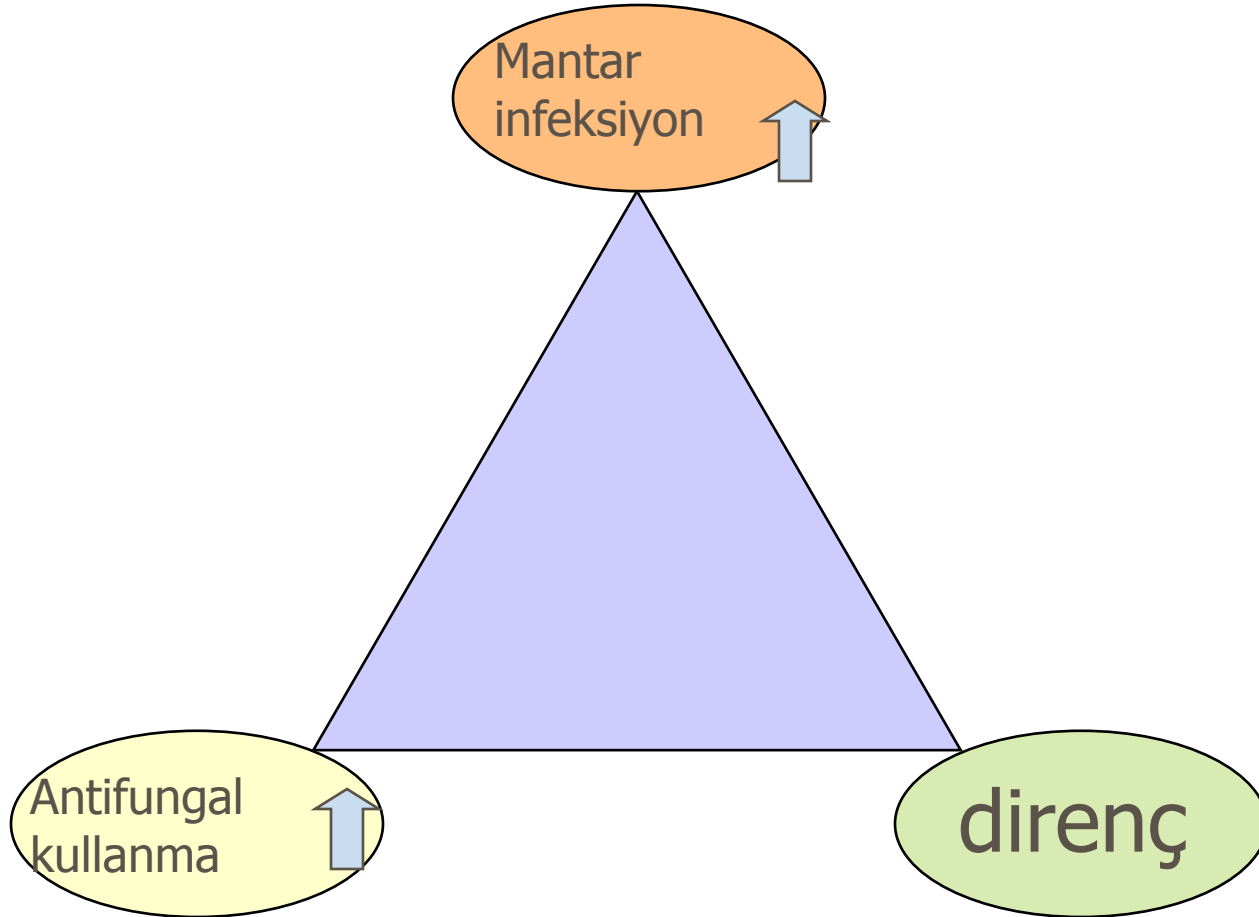




CLSI ve EUROCAST DIŐI YÖNTEMLERLE İLGİLİ GELİŞMELER

Dr. A. Nedret KOÇ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Kayseri.





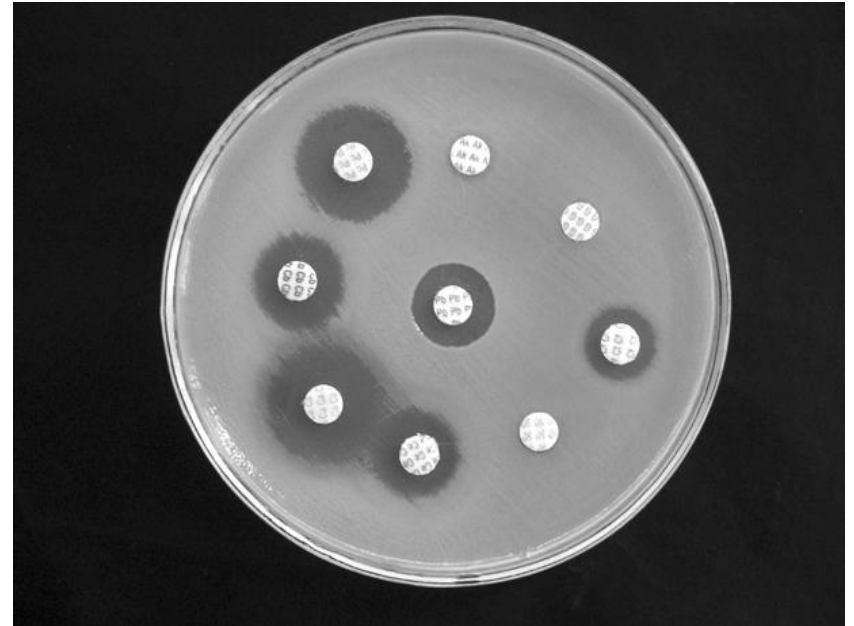
Antifungal direnç

- multifaktöryel özelliklere bağlıdır.
- in vitro
- moleküler
- klinik direnç olarak ayrılabilir

Gözlenen direnç sorunu

- Direnç mekanizması çalışmaları 
- Tedavideki yaklaşımları düzenlenmesi 
- Alternatif ilaçların arayışı 

- Standart antifungal duyarlılık yöntemlerinin önemi artmıştır.





SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testlerindeki Referans yöntemlerin modifikasyonu ve alternatif ticari yöntemler
- Sıvı ve agar bazlı yöntemler
- flow sitometri
- E test
- Disk difüzyon yöntemi
- Antifungal duyarlılıkta moleküler yöntemler
- Fungisidal aktivite
- Sonuç



Standart antifungal duyarlılık testler için raporlar

- 1992 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)/
- CLSI (clinical and laboratory standard institute)
- Food and Drug Administration (FDA) tarafından kullanılmak için değerlendirilip ve tanınmıştır.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST



CLSI (clinical and laboratory standard institute)/EUCAST

- **M27-A3** 04/28/2008
- **M38-A2** 04/28/2008
- **M44-A2** 08/28/2009
- **M44-S3** 08/28/2009
- **M51-A** 2010
- **M51-S1** 2010

- EUCAST-CLSI benzer raporlar belirlemekte ve yeni revizyonlarla yayınlamaktadır.
- revised2010-03-16



Referans yöntemlere alternatif olabilecek;

- Daha kolay,
- Tekrarlanabilir,
- Kullanılabilirliği yüksek
- Ucuz ve
- Uygun yöntemlerin arayışı halen devam etmektedir.



En sık kullanılan ticari yöntemler;

- Etest (AB Biodisk, sonla),
- Integral System Yeasts antifungal disk (Liofilchem Diagnostics, L'Aquila, Italy),
- Candifast (International Microbio/Stago Group, Milona Italy),
- Fungitest (Bio-Rad SDP, Paris, France),
- Vitek 2 (bio merieux),
- Mast goup antifungal disk,
- Rosco Neosensitive disk test (Neo-Sensitabs A/S Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark),
- BD Phonix (Diagnostic Systems Circle Sparks,)
- Yeastone (Trek Diagnosytic system, Inc.),
- ATB fungus 2 (API-bio merieux, Marcy Fransa),
- Mycostandard (Institu Pastuer, aris, Fransa),
- Mycototal (Behring Diagnostic, Rueil-Malmasion, Fransa),
- ASTY colorimetric panel (Kyokyuto Pharmaceutical Indrustrial, Ltd. Japon),
- Biomic®vision sistem

- 
- Candifast, Integral System Yeasts, Fungitest referans M27-A yöntemi ile uyumunun sınırlı olduğunu belirleyen araştırmalar yanında kullanılabiliirliğinde savunan araştırmalar vardır.
 - ATP Fungus, Mycostandard, Mycototal benzer sistemlerdir ve referans M27-A yöntemi ile uyumunun sınırlı olduğunu yayınlamışlardır.

Davey KG, et al. J Clin Microbiol 1998;36:926–930.

Posteraro B, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 2000;38:29–36.

Witthuhn F, J Clin Microbiol 1999;37:864–866.

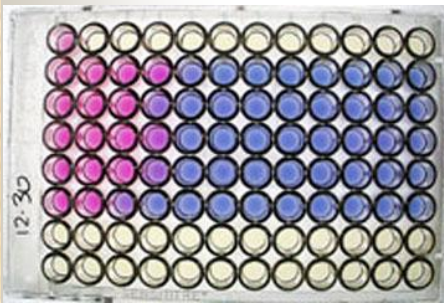
- Alamar Blue kolorimetrik sistemlerden Sensititre Yeast one Colorimetric antifungal panel referans sistemle %85 uyum elde edildiğini bildiren çalışmalar yanında
- C. neoformans ile bazı zorlukların olduğu rapor edilmektedir
- ASTY colorimetric panel M27 referans yöntemle uyumlu olduğu bildirilmektedir.

Espinel-Ingroff A, et al. J Clin Microbiol 1999; 37:591–595.

Lopez-Jodra O, et al. J. Antimicrob Chemother 2000 ;45:645–9.

Qian Q, et al. J. Mycol. Med. 1999;9:181–184.

Pfaller, MA, et al. J Clin Microbiol 1998; 36:2609–2612.



- 
- NeoSensitabs disk testi çalışılmasında flukonazol, vorikonazol için M44-A disk testine göre uyum olduğu ve bu uyumun itrakonazol ve kaspofungin disk için uygulanabileceği
 - Amfoterisin B için daha fazla çalışma gerektiği uyumun düşük olduğu bildirilmektedir.

Espinel-Ingroff A, et al. J Clin Microbiol. 2007; 45: 858–864.



Referans yöntemlerin potansiyel kullanımı için modifikasyonlar

- Mikrodilusyonlu yöntemlerde spektrofotometre ile sonuçları değerlendirilmesinde daha kullanışlı olduğu
- *Cryptococcus neoformans*, için bu durumunun daha iyi olduğu
- MOPS tamponunun molaritesinin düşürülmesi *C. albicans* suşlarının direnci belirlemede önemli olduğu
- İnkübasyonun 24 saat kısaltılması ve pH ın azaltılması *Candida* türleri için uygulanabilir olduğu

Anaissie E J, et al. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2387–2391.

Tornatore MA, et al. J Clin Microbiol 1997;35:1473–1476.

Marr K A, et al. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1383–1386.



Referans yöntemlerin potansiyel kullanımını için modifikasyonlar

- Metabolik aktiviteyi tetrazolium salt XTT ve menadione eklenerek spektrofotometrik olarak ölçülmesinin uygun olduğunu göstermişlerdir
- *C. albicans* suşlarında karşı antifungal duyarlılık sonuçlarını fluresans boyama ile modifiye edildiği referans yöntemine göre duyarlılığının %92.8 olduğunu bildirmişlerdir.

[Antachopoulos C, J. Antimicrob Chemother 2007;59, 230–7.](#)

[Liao RS, et al. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3236–42.](#)



Mayalarda flow sitometri yönteminin kullanımı:

- *C. albicans* suşlarının amfoterisin B ve flukonazol duyarlılığı flow sitometrik antifungal duyarlılık testi ile referans yöntemine göre uyum sırasıyla % 96 ve 93; olduğu
- amfoterisin B nin direncini belirlenmesinin özellikle kullanılabileceğini bildirmektedir.

Gökahmetoğlu S, Koç AN, Mycoses 2003;46:307-311.

Favel A, et al.J. Antimicrob. Chemother. 1999;43:227–232.



Mayalarda flow sitometri boyaların kullanımı:

- flow sitometri yöntemi ile referans yöntemler arasın %96 to 99 arasında uyum olduğu ve 2 ile 4 saat arasında sonuç alınabildiğini gösterilmiştir.

Gren L J, et al. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:830–835.

Wenisch C, et al. J Clin Microbiol 1996; 35:5–10.

Chaturvedi V, et al. J Clin Microbiol 2004;42:2249–2251.



Mayalar için agar baz alternatif yöntemler

- NeoSensitabs disk testi ve E test çalışmaları bildirilmektedir.

Espinel-Ingroff A, et al. J Clin Microbiol 2007; 45: 858–864.



Mayalar için Etest yöntemi

- E test stripler amfoterisin B, kaspofungin, flusitozin flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve psokonazol için ticari stripler vardır.
- flukonazol, itrakonazol ve flusitozin için FDA onayı alınmıştır.
- Endpoint belirleme bazı suşlarda zor olmakla birlikte bir çok Candida suşu için standart yöntemlerle uyumlu olduğu kabul edilmektedir



Mayalar için Etest yöntemi

- *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* ve *C. neoformans* suşlarında bu uyumun düşük olduğu
- Besiyeri olarak en iyi performans RPMI besiyerine % 2 glikoz eklemekle
- Amfoterisin B potansiyel direnci en iyi Etest ile belirlenebildiği kabul edilmektedir

Peyron Fet al. J Clin Microbiol 2001;39:339–342.

Wanger A, et al. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2520

Clancy C J, et al. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1289–90.



Mayalar için Etest yöntemi

- Candida suşlarının amfoterisin B, ketokonazol, itrakonazol ve flukonazol duyarlılığı Etest antifungal duyarlılık testi ile referans yöntemle göre uyum sırasıyla % 93.1, % 85.2, % 82.3 olduğu göstermişlerdir.

Koç AN et al. Mycoses 2000;43:293-7.



Anidulafungin Etest ve CLSI

- *Candida parapsilosis* ve *C. guilliermondii* (% 54.4 ve 82.4 uyum iyi olmadığı
- *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, ve *C. tropicalis* (% 87.9 ve 100) iyi uyum olduğu bildirilmektedir.

Espinel-Ingroff A, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:1347-50.

Mayalar için Etest yöntemi

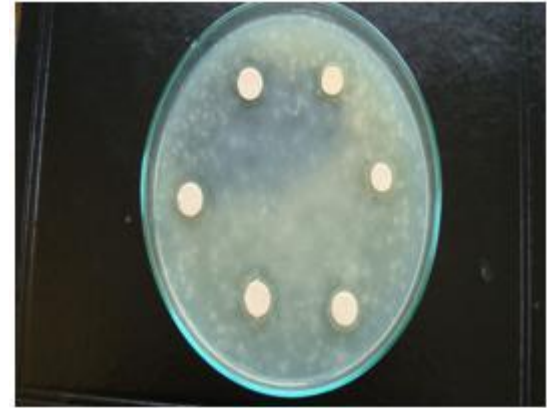
- Lee ve ark *Candida* türlerine karşı flukonazol ve vorikonazol duyarlılığını % 2 glikozlu ve Müller-Hinton besiyeri kullanılarak Etest ve disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi referans yöntemine göre (M27-A) yüksek uyumluluk gösterdiği ve yöntemin pratik olduğunu vurgulamışlardır.



Lee, S. C., et al. Microbiol Immunol Infect
2009;42: 148-153..

Küfler için agar baz alternatif yöntemler

- Mayalar gibi küfler içinde agar baz alternatif yöntemler; agar dilusyon, bazı antifungaller için disk difüzyon ve Etest ve yarı katı besiyeri yöntemleridir.



- 
- Khan ve ark. maya, küf ve dermatiflere karşı agar dilusyon yöntemini kullanarak yaptıkları duyarlılık testinin referans yöntemine göre kolay kullanılabılır yöntem olarak tespit etmişlerdir.

[Khan S,et al. Indian J Medical Microbiol 2006;24:171-176.](#)



Küf mantarları için Agar dilusyon yöntemi:

- Imhof ve ark. Çeşitli *Aspergillus* türleri için kasfofungin duyarlılık çalışmasında agar dilusyon yönteminin kullanılmasının basit, tekrarlanabilir ve doğru güvenilir sonuçlar alınabildiği vurgulanarak klinik laboratuvarlar uygun olabileceği bildirilmektedir.,

Imhof A, et al. J Clin Microbiol 2003;41:5683-8.



Küf mantarları için Etest yöntemi:

- M38-2A yöntemini karşılaştırılmasında;
- triazolerin uyumu (>%90) Amfoterisin B den (>%80) daha iyi olduğu,
- Amfoterisin B ve itrakonazol uyumun yüksek olduğu,
- MİK sonuçlarının klinikal ilişkisi vurgulanması gerektiği belirtilmektedir

Cartledge JD, et al. J Antimicrob Chemother 1997;40:117–119.

Pfaller, M. A., et al. J Clin Microbiol 2000;38:3359–3361.



Posaconazole Etest-CLSI

- *Aspergillus fumigatus* % 80 ve 84 uyum olduğunu bildirilmektedir.

Araujo R, Espinel-Ingroff A. Antimicrob Agents Chemother.
2009;53:4921-3.

Küfler için sıvı dilusyon alternatif yöntemler

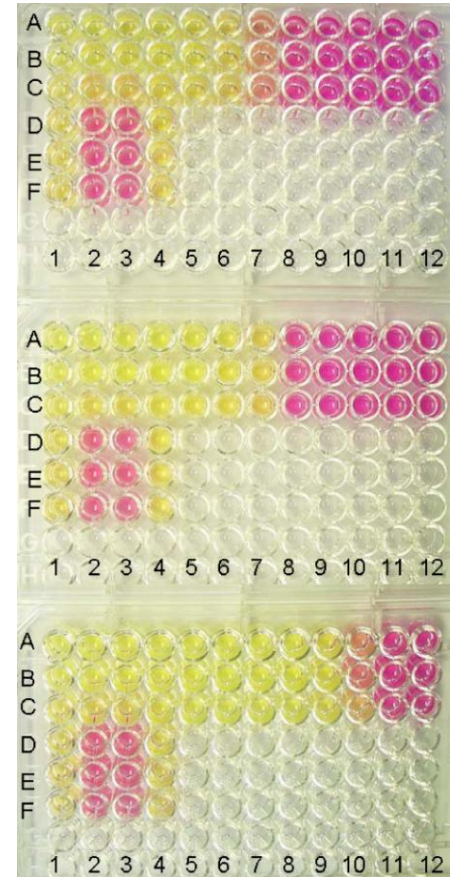
- The Sensititre YeastOne antifungal panel testler dermatofitler için çalışılmış referans yöntemlere göre uyumun; amfoterisin B (%81.6) ve itrakonazol için (%87.7) daha yüksek, flukonazol (%67.3) ve ketokonazol için (%69.4) düşük olduğu bildirilmektedir.



Yamaguchi H, et al. J Infect Chemother 2002;8:374–377.

- *Aspergillus* suşlarına karşı vorikonazol ve itrakonazol için alamar blue ile kolorimetrik yöntemin rutin için alternatif kullanılabilecek yöntem olduğunu rapor edilmiştir.

Pujol I, et al. J Clin Microbiol
2002;46: 2618–262.



Küflerde flow sitometri boyaların kullanımı:

- Ramani ve ark. A. *fumigatus* suşlarına karşı amfoterisin B, itrakonazol ve vorikonazol aktivitesini 4 saat gibi kısa sürede belirlenebileceğini rapor etmişlerdir.

Lass-Florl C, et al. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:124–8.

Ramani R, et al. Antimicrob Agents

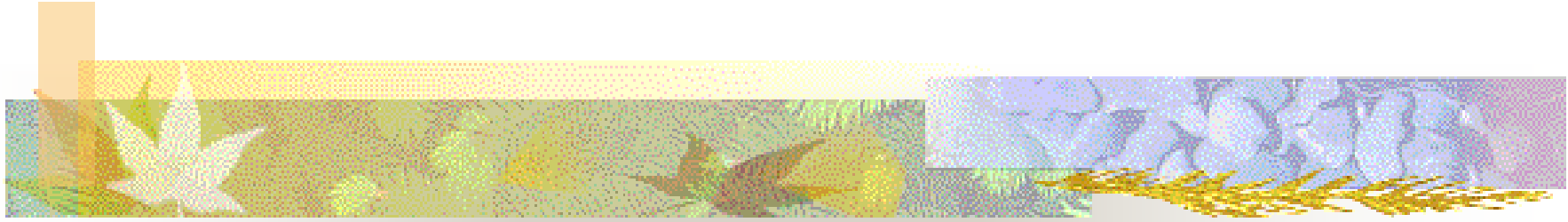




Hızlı yöntem- oksiyen tüketiminin belirlenmesi

- *Aspergillus fumigatus*
- amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol
- oksiyen tüketiminin belirlenmesi biyolojik oksijen belirleyiciler tarafında ölçülmüş ve uyumlu (%87) ve 4-8 saatte sonuç alınabiliyor.

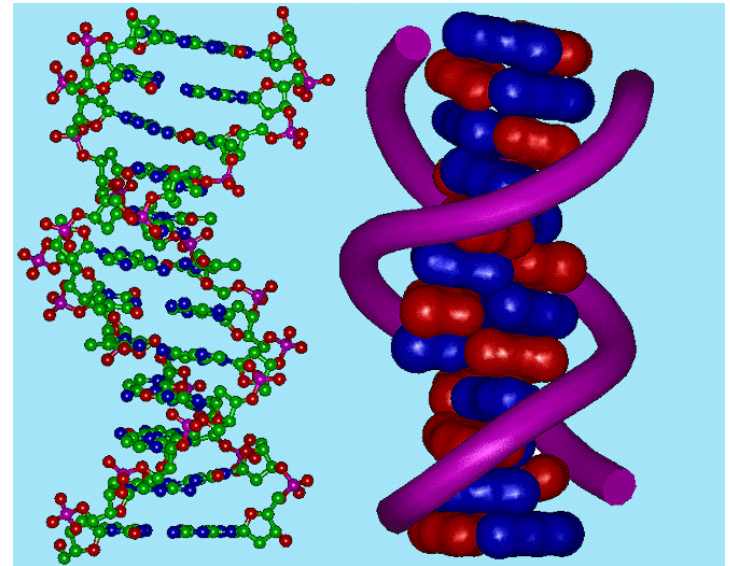
[Araujo R. Et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 62: 1277–80](#)



Antifungal duyarlılıkta moleküler yöntemlerin yeri

moleküler yöntemler

- Antifungal dirençte potansiyel mekanizmaları araştırmak için mantarların tanısında ve identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerin bir çoğunu kullanılmaktadır.





Moleküler yöntemler kullanılarak;

- Amfoterisin B direnci olan *C. albicans* suşlarında ERG2 ve ERG3 genlerinde defekt olduğu ve bunun sonucunda ergosterol yapımında azalma olduğu rapor edilmiştir

Loeffler J K, *J Clin Microbiol* 2000; 38: 586-90



Azollerin

- Hedefi olan 14 alfa demetilaz (14DM) enzimini kodlayan gen ERG11 genidir.
- Genellikle gelişen direnç mekanizmaları bu enzimle ilgilidir.

Shen YZ, et al. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2010;49:245-9.

Moleküler yöntemler kullanılarak

■ *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus* da azol direnci ile ilişkili ERG11 de nokta mutasyon, aşırı ekspresyon, gen amlifikasyon ve mikotik rekombinasyon içeren çeşitli değişiklik gösterilmiştir

Chen J, *J Antimicrob Chemother* 2005;55:31-7

Lo HJ, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1213-5

Iliades P, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:741-8

MacPherson S *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1745-52

Kim TH, et al. *Folia Microbiol (Praha)* 2010;55:301-4.



Moleküler yöntemler:

- *A. fumigatus* suşlarındaki triazol direnci belirlemek için ilaç hedefi olan yerde Cyp51A genetik değişiklikleri belirleyen real-time PCR kullanılması kolay hızlı (iki saat) olduğu gösterilmiştir

Garcia-Effron G, et al. J Clin Microbiol. 2008; 46:1200–1206.

Klaassen CH, et al. J Antimicrob Chemother. 2010;65:901-5.



DNA ve RNA analizi ile *MDR1* or *CDR2* özgü primerler kullanarak

- Flukonazole resistant *Candida albicans* klinik izolatların ilaç reflüks kolaylaştıran genin kodunun yüksek düzeyde transkripsiyon gösterilmiştir
- Flukonazole resistant *Candida* suşlarının (*C. glabrata*) quantitative RT-PCR kullanarak ERG11, CDR1 ve CDR2 over ekspresyonlarının olduğu gösterilmiştir.

Harry JB. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2785–2792

Shen YZ, et al. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2010;49:245-9.



PCR ve takibinde arbitrarily primed-PCR (AP-PCR)

- *Candida* türlerinin identifiye edildiği ve azol dirençli ve duyarlı *Candida albicans* suşlarının moleküler farklılıklarının pratik kolay ve güvenilir şekilde tanımlandığını bildirmektedirler

Cirak MY. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:1027-32



Ekinokandinlerin

- Moleküle çalışmalarla kasfafungin direncinde FKS1 ve FKS2 gendeki mutasyonların rolünün önemli olduğunu bildirmektedirler.

Katiyar SK et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1772-8



Ekinokandinlerin

- *C. albicans* ve *C. glabrata* kasfofungin direncini southern ve northern hibridizasyon ve spesifik problemler ve RFLP kullanarak FKS1 ve FKS2 mutasyonu, allelleri ve genlerin dizi analizini tanımlanmıştır.

Douglas CM, *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2471–2479.

Katiyar S, *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2892–2894.

Fungisidal aktivite:

- CLSI çalışmaları laboratuvarlarda MFC ve time-kill çalışmaları güvenilir yapılmasını gerektiğini bildirmiştir. *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal aktiviteyi mikrodilusyon kolorimetrik yöntemle yapan bir çalışmada fungisidal aktivitenin antifungal ajanlara göre farklı olabileceğini bildirerek bu yöntemin kültür kullanılarak yapılan yöntemle göre hızlı ve % 91- 100 oranında uyumlu olduğu bildirilmektedir

Meletiadis J, et al. Antimicrob Agents Chemother 2007; 3329–37.



Fungisidal aktivite:

- Hastaların tedavilerinde MFC sonuçlarınının değerlendirilmedeki güvenilirliği için bu prosedürlerin standart olmasına ihtiyaç vardır. Bu yöntemlerin standart olması için invivo ve invitro sonuçların korelasyonunu içermelidir.



Sonuç olarak;

- Antifungal duyarlılık testi, 1982 den bu zamana kadar büyük gelişmeler göstermiştir.
- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu yöntemlerin daha fazla uygulanabilmesi ve kullanılması için kabul edilebilir modifikasyonları da vardır.
- Mantar hastalıklarının tedavilerinde duyarlılık testleri ile ilgili sorunlar tam anlamıyla yanıtlanmamıştır.



Sonuç olarak;

- Yanıtlanmayı bekleyen sorular:
 - 1-maya ve küflerin yeni antifungallar ile çalışmalarının sonuçları;
 - 2-nadir karşılaşılan maya küflerin sonuçları;
 - 3-antifungal kombinasyonları ve bunların organizma üzerindeki sonuçları

Bu çalışmalar devam etmeli, sonuçları değerlendirilmeli ve literatüre sunulmalıdır.

TEŞEKKÜRLER

