

CLSI Yöntemi ve Yeni Öneriler



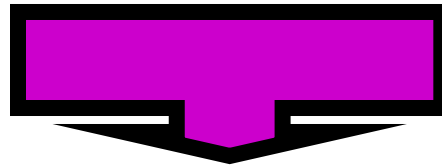
Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağı
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler
- M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler
- Yeni M51-A dökümanı
- Sonuçlar

Antifungal duyarlılık testlerine (AFDT) neden ihtiyaç var?

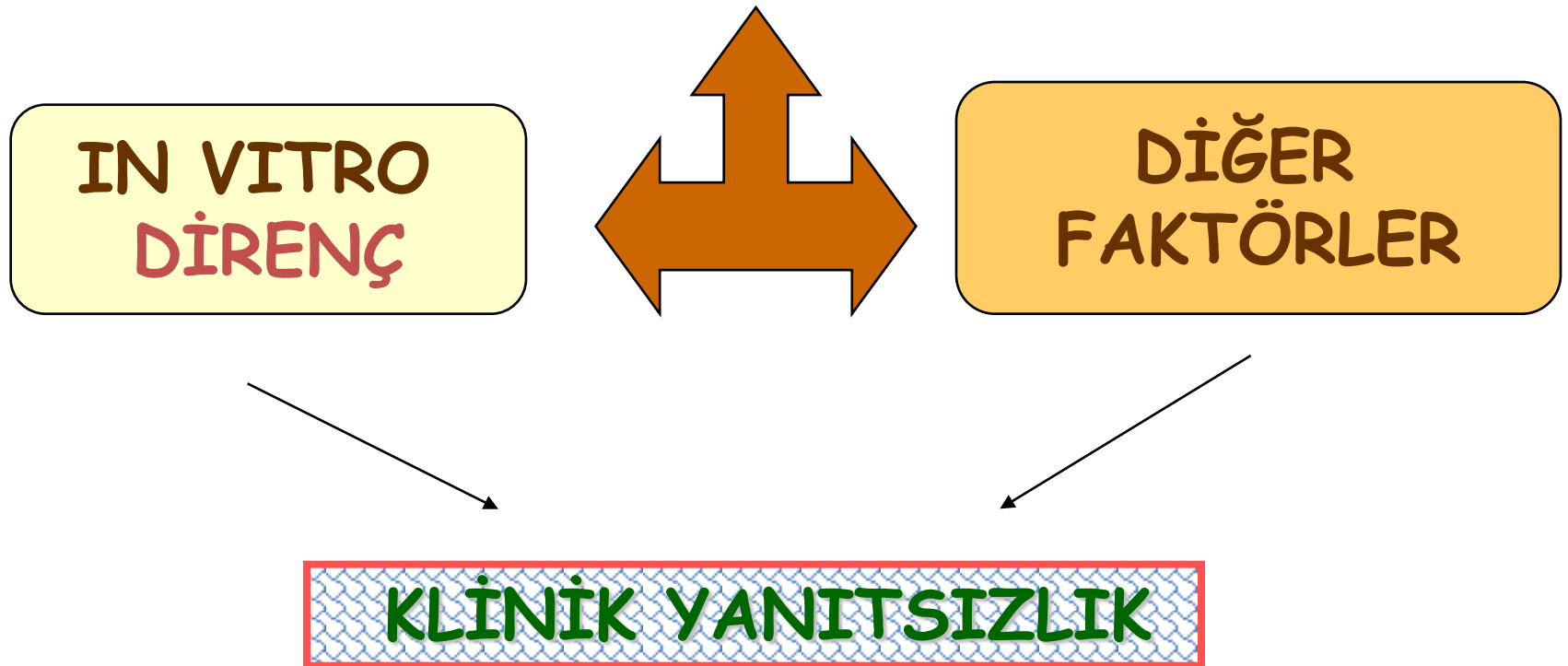
- **İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ KONAK** sayısında artış
İnvazif fungal enfeksiyon (İFE) insidansında artış
- **Nadir rastlanan MANTAR cins ve türlerinin İFE etkeni olarak ortaya çıkması**
- Yeni **ANTİFUNGAL İLAÇLARIN** geliştirilmesi
- **ANTİFUNGAL İLAÇLARA primer direnç olduğunun farkedilmesi, sekonder direncin ortaya çıkması**



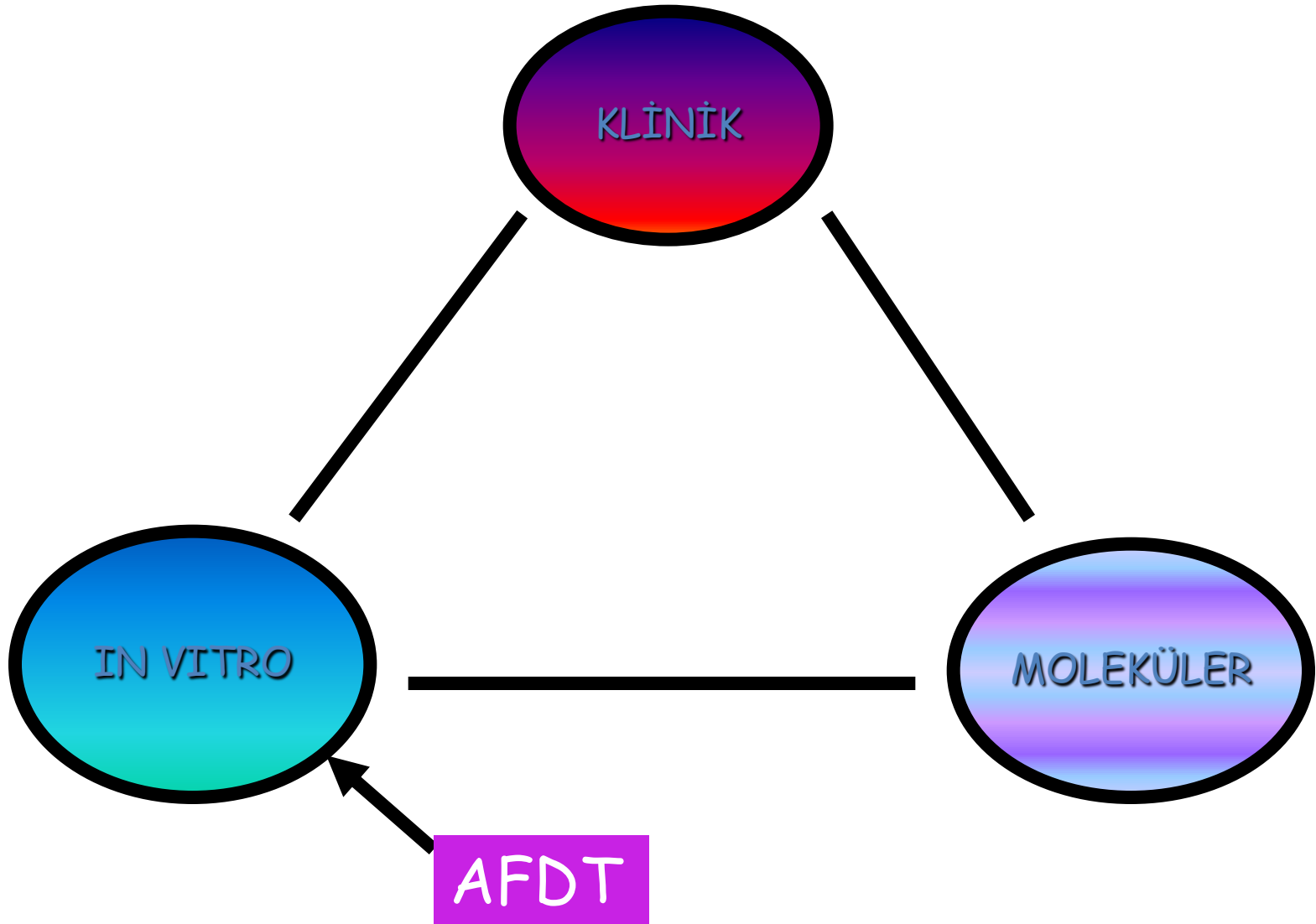
ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ :

- **ANTİFUNGAL TEDAVİNİN DOĞRU YÖNLENDİRİLEBİLMESİ**
 - **KLİNİK YANITIN TAHMİN EDİLEBİLMESİ**
- için gerekli...

İnvazif Fungal Enfeksiyonlarda Tedavi Başarısızlığının Nedenleri



DİRENÇ



SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler
- M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler
- Yeni M51-A dökümanı
- Sonuçlar

CLSI-Referans AFDT Yöntemleri

CLSI M27-A3

Candida, Cryptococcus

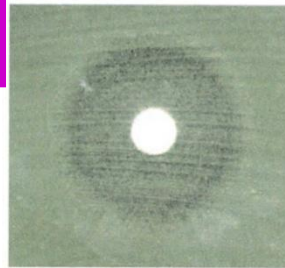
CLSI M38-A2

Aspergillus, Fusarium,
Rhizopus, P. boydii,
S. schenckii-küf formu,
dermatofitler...

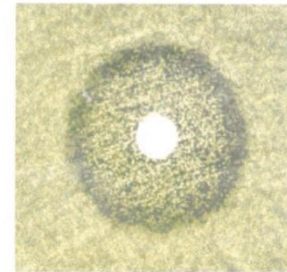


CLSI M44-A2

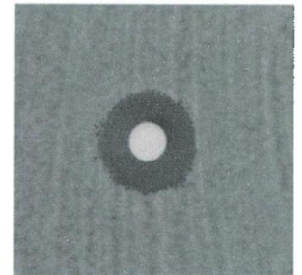
Candida



(a) *A. fumigatus*



(b) *A. flavus*



(c) *C. krusei* ATCC 6258

CLSI M51-A

invazif enf. etkeni küf mantarları

SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- **M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler**
- M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler
- Yeni M51-A dökümanı
- Sonuçlar

CLSI - Maya Mikrodilüsyon Dökümanları

- M27-P Aralık 1992
- M27-T Ekim 1995
- M27-A Haziran 1997
- M27-A2 Ağustos 2002
- **M27-A3 Nisan 2008**



M27-A3, S3: Önceki dökümana kıyasla YENİ öneriler, güncellenen bilgiler

- YENİ bölüm: Antifungal Duyarlılık Testlerini Uygulama Endikasyonları
- MİK okuma zamanı ile ilgili ek ve ayrıntılı öneriler
- *C. glabrata* - flukonazol sonuçları ile ilgili ek öneriler
- Ekinokandin grubu antifungal ilaçların AFDT sonuçlarının okunması ve yorumlanması
- Ekinokandinler için MİK direnç sınır değerleri
- Ekinokandinler için çözücü ve sulandırıcılar
- Kalite kontrol ve referans suşları için güncellenmiş bilgiler

M27-A3 Antifungal Duyarlılık Testlerini Uygulama Endikasyonları--GENEL

- Tanımlama sonucuna göre duyarlılık profilinin tahmini mümkün değilse,
 - Direncin olası olduğu türlere ait suşlar için,
 - Direnç epidemiyolojisinin saptanmasında,
 - Yeni antifungal ilaç çalışmalarında.

M27-A3 Antifungal Duyarlılık Testlerini Uygulama Endikasyonları--RUTİNDE

◆ Periyodik taramalar için,

◆ Standart tedavi seçeneğine ve dozuna yanıt vermeyen refrakter orofaringiyal kandidoz olgularında tedavi seçeneğinin belirlenmesine katkı için,

◆ Azollerin tedavideki etkinliği ile ilgili belirsizliğin mevcut olduğu invazif Candida enfeksiyonlarında, tedavi seçeneğinin belirlenmesine katkı için (örn. non-

Duyarlılık testlerinin yapılma kararının, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji bölümleri ile Enfeksiyon Kontrol Komitesinin işbirliğinin sonucunda alınması en ideal yoldur.

Candida - MİK direnç sınır değerleri

CLSI, M27-A3, M44-A2, M27-S3

Pfaller et al. JCM 2006; 44: 819

Antifungal ilaç	S	S-DD	I	R	NS
Flukonazol, MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 8	16-32	-	≥ 64	-
Flukonazol, disk (25 μg)(mm)	≥ 19	15-18	-	≤ 14	-
Itrakonazol, MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 0.125	0.25-0.5	-	≥ 1	-
Flusitozin, MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 4	-	8-16	≥ 32	-
Vorikonazol, MİK ($\mu\text{g/ml}$)	≤ 1	2	-	≥ 4	-
Vorikonazol disk (1 μg) (mm)	≥ 17	14-16	-	≤ 13	-
Kaspofungin	≤ 2	-	-	-	>2
Anidulafungin	≤ 2	-	-	-	>2
Mikafungin	≤ 2	-	-	-	>2



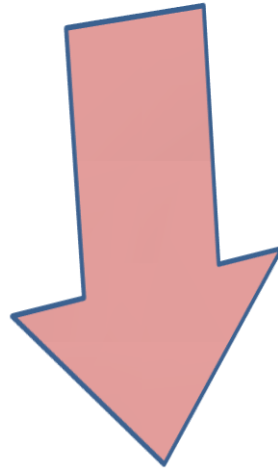
CANDIDA
Anidulafungin
Kaspofungin
Flukonazol
Flusitozin
İtrakonazol
Mikafungin
Vorikonazol

dışında kalan mantar-ilaç kombinasyonları için AFDT'lerinin yapılmasının rutindeki geçerliliği ve önemi **bilinmemektedir.**

M27-A3 MİK okuma zamanı ile ilgili ek ve ayrıntılı öneriler

Antifungal İlaç	MİK OKUMA ZAMANI (Yeterli üreme olduğunda!)	
	24 saat	48 saat
Amfoterisin B	EVET	EVET
Ekinokandinler	EVET	HAYIR
Flukonazol	EVET	EVET
Flusitozin	HAYIR	EVET
Itrakonazol	HAYIR	EVET
Posakonazol	HAYIR	EVET
Ravukonazol	HAYIR	EVET
Vorikonazol	HAYIR	EVET

C. glabrata,
Flukonazol MİK $\leq$ 32



Flukonazol tedavisi maksimum dozdan verilmeli

M27-A3 Ekinokandin grubu antifungal ilaçların AFDT sonuçlarının okunması ve yorumlanması

Kaspofungin
Mikafungin
Anidulafungin



	⚙️ 24 saat	
	⚙️ MİK-2 (%50 azalma)	

M27-A3 Ekinokandinler için MİK direnç sınır değerleri

Ref.: CLSI M27-A3



$MİK \leq 2 \mu g/ml$: DUYARLI

$MİK > 2 \mu g/ml$: DUYARLI DEĞİL
("non-susceptible")

Bu direnç sınır değerinin, dökümana alındıktan sonra çok yüksek olduğu anlaşıldı. Şu anda revize ediliyor.

Ekinokandinler için çözücü ve sulandırıcılar

Antifungal İlaç	Çözücü	Sulandırıcı
Kaspofungin	Su	Besiyeri
Mikafungin	Su	Besiyeri
Anidulafungin	DMSO	Besiyeri

Ref.: CLSI M27-S3

SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler
- **M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler**
- Yeni M51-A dökümanı
- Sonuçlar

CLSI - Küf Mikrodilüsyon Dökümanları

- M38-P

Kasım 1998

- M38-A

Ağustos 2002



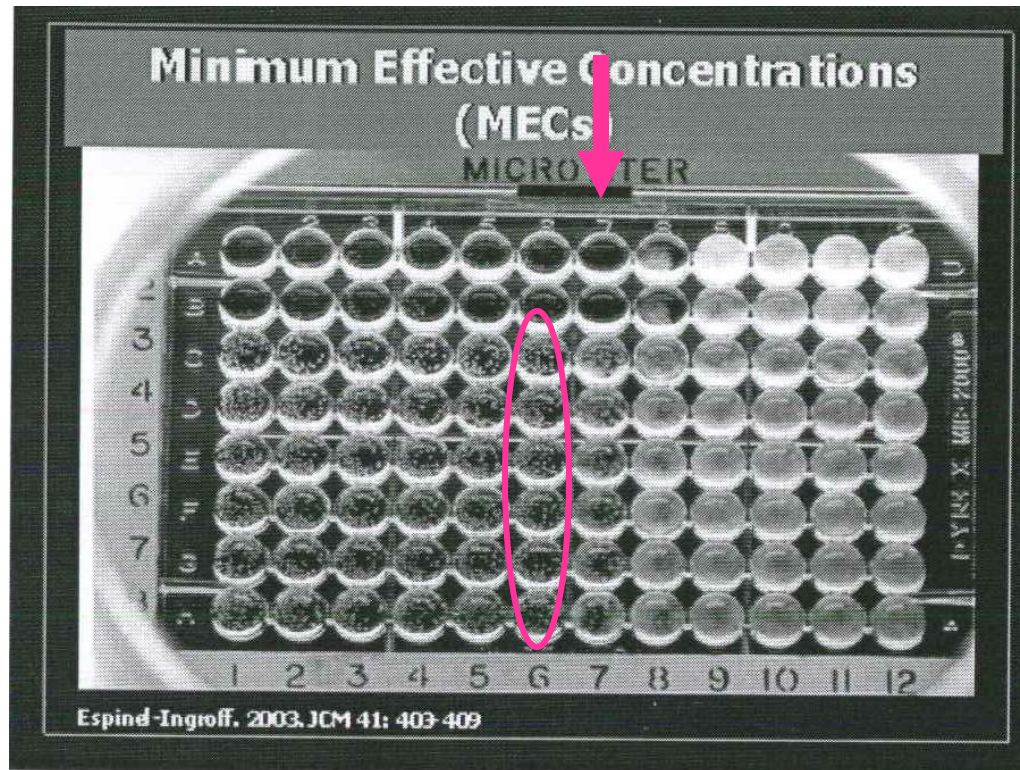
- **M38-A2**

Nisan 2008

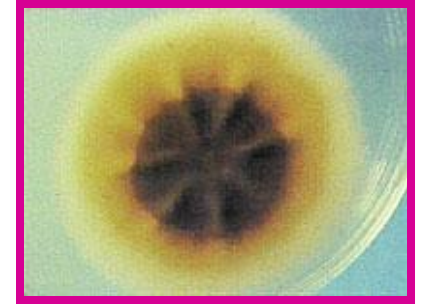
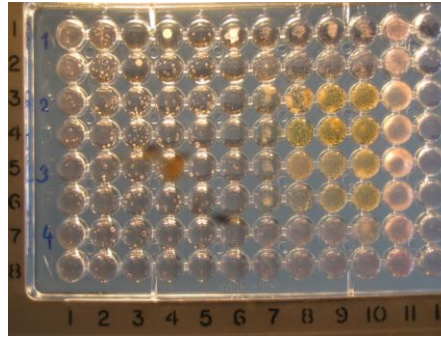
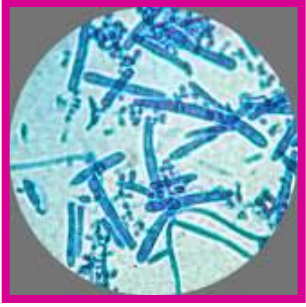
M38-A2: Önceki dökümana kıyasla YENİ öneriler, güncellenen bilgiler

- Minimum Efektif Konsantrasyon (MEK) tanımı, ekinokandinler için MEK değerlerinin okunması
- Dermatofitler için test edilecek ilaçlar, yöntem, test parametreleri, okuma kriterleri
- Itrakonazol, yeni triazoller, siklopiroks, grizeofulvin ve terbinafin sonuçlarının okunması ile ilgili öneriler
- Anidulafungin, kaspofungin, mikafungin, siklopiroks, grizeofulvin ve terbinafin için çözücü ve sulandırıcılar
- Yeni bazı ATCC suşları ile ilgili eklemeler, kalite kontrol ve referans suşları için güncellenmiş bilgiler

"Üreme kontrol çukurunda gözlenen, hifal üremeye kıyaslandığında küçük, yuvarlak, hif formlarının oluşmasına neden olan en düşük ekinokandin konsantrasyonu"



Dermatofitler için test edilecek ilaçlar, yöntem, test parametreleri, okuma kriterleri:



Test parametreleri

T. menta izolasyon besiyeri:
PDA, 30°C, 4-5 gün

T. rubrum izolasyon besiyeri:
"oatmeal cereal" agar

Hemositometrik sayım: $1-3 \times 10^3$ cfu/ml

RPMI-1640

35°C, 4-7 gün

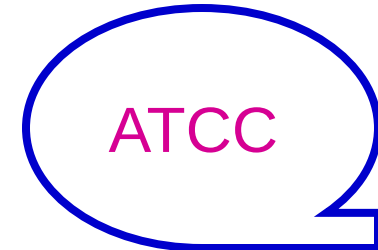
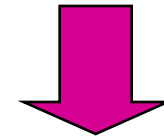
MIC-1, MIC-2

İlaçlar

Sikloproks
Flukonazol
Grizeofulvin
Itrakonazol
Posakonazol
Terbinafin
Vorikonazol

Referans suşlar

T. rubrum MRL666
T. mentagrophytes
MRL1957



Itrakonazol, yeni triazoller, siklopiroks, grizeofulvin ve terbinafin sonuçlarının okunması ile ilgili ayrıntılı öneriler

Itra, Posa, Vori, (Ravu):	MİK-0 (Aspergillus) MİK-1 (dermatofitler)
Siklopiroks:	MİK-1
Grizeofulvin:	MİK-1
Terbinafin:	MİK-1

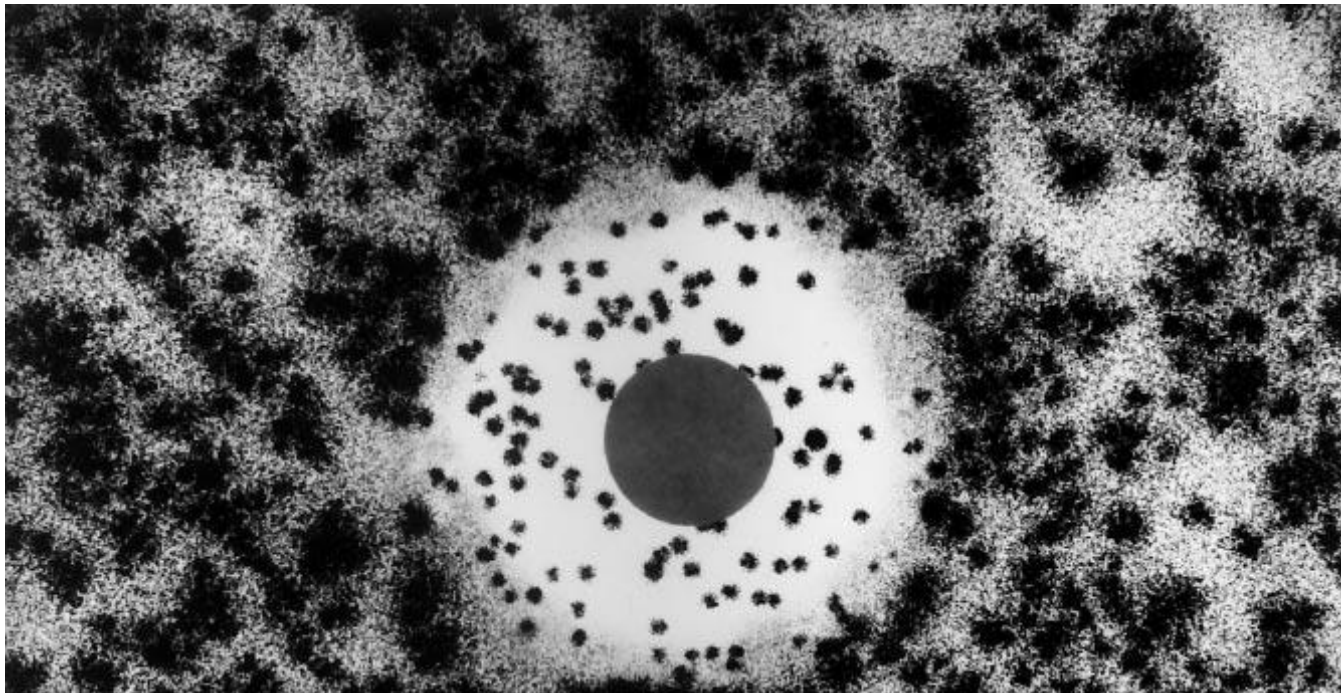
Anidulafungin, kaspofungin, mikafungin, siklopiroks, grizeofulvin ve terbinafin için çözücü ve sulandırıcılar

Antifungal İlaç	Çözücü	Sulandırıcı
Anidulafungin	DMSO	Besiyeri
Kaspofungin	Su	Besiyeri
Mikafungin	Su	Besiyeri
Siklopiroks	DMSO	Besiyeri
Grizeofulvin	DMSO	Besiyeri
Terbinafin	DMSO	Besiyeri

SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler
- M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler
- **Yeni M51-A dökümanı**
- Sonuçlar

CLSI M51-A: *Dermatofit dışı küf mantarları için yeni onaylanan bir disk difüzyon dökümanı*



• M51-P

Haziran 2009

➔ • **M51-A**

Mayıs 2010

CLSI M51-A yöntemi ile test edilebilecek küf cinsleri ve türleri

İnvazif hastalık etkeni küfleri kapsar.

Ref.: CLSI M51-A

Alternaria
Aspergillus
Bipolaris
Fusarium
Paecilomyces
Zygomycetes sınıfı
Pseudallescheria boydii
Scedosporium prolificans

Endemik dimorfik mantarların maya ya da küf formlarını ve dermatofitleri kapsamaz.

CLSI M51-A yöntemi RUTİN de kullanılabilir mi?

- Klinik önemi ve klinik direnç sınır değerleri henüz saptanmamıştır.
- **RUTİN AMAÇLI KULLANILMASI ÖNERİLMEZ.**

CLSI M51-A YÖNTEM

%2 glukoz ve %0.5 metilen mavisi EKLENMEMİŞ Mueller Hinton agar (pH: 7.2-7.4)

Mantarın üretilmesi: PDA'da $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 7 gün ya da iyi sporülasyon oluşana kadar (M38 dökümanındaki gibi)

İnokulum hazırlanması: $0.4-5 \times 10^6$ cfu/ml, spektrofotometrik (M38 dökümanındaki gibi)

İnkübasyon: $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de
16-24 sa. (Zygomycetes), 24 sa. (A. flavus, A. fumigatus, A. niger),
48 sa. (diğer Aspergillus spp.), 48-72 sa. (Alternaria, Bipolaris,
Fusarium, Paecilomyces, P. boydii, S. prolificans)

Okuma değeri: Üremede belirgin azalma (%80) sağlayan zon çapı.
Triazol ve kandinler için "trailing" yok sayılarak okuma yapılır.
Diğer ilaçlarda (örn. AMB) "trailing" direnci işaret eder!

Filamentöz mantarlar için saptanmış olan inhibisyon
zon çapı (IZ) *epidemiyolojik "cut-off" (ECO)*
değerleri ve karşılık gelen MİK ve MEK ler

Antifungal İlaç	Disk içeriği (μ g)	IZ (mm) ECO	Karşılık gelen MİK/MEK ECO (μ g/ml)
Amfoterisin B	10	15	1
Kaspofungin	5	17	1
Itrakonazol	10	17	1
Posakonazol	5	17	1
Vorikonazol	1	17	1

SUNUM PLANI

- Antifungal duyarlılık testleri (AFDT) ile ilgili temel bilgiler
- Referans CLSI AFDT yöntemleri
- M27-A3 dökümanındaki yeni öneriler
- M38-A2 dökümanındaki yeni öneriler
- Yeni M51-A dökümanı
- Sonuçlar

SONUÇLAR

- Geçtiğimiz yıllarda CLSI antifungal duyarlılık testi yöntem dökümanları ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir.
 - Bu gelişmeler, CLSI antifungal duyarlılık testlerinin kullanılabilirliğini kolaylaştırmakta, belirsizlikleri azaltmakta ve duyarlılık testi sonuçlarının yorumlanmasına katkı sağlamaktadır.
- Ancak, özellikle rutin uygulama ile ilgili birçok belirsizlik halen devam etmektedir.