

CLSI - EUCAST ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

STANDARTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Mine Doluca Dereli, Ayşe Nedret Koç

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kayseri

Bilindiği gibi son yıllarda antifungal duyarlılık testlerinde (AFDT) standardizasyon sağlanmıştır. Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) maya ve küf mantarları açısından AFDT için standartları belirlemiştir. Geliştirilen ve standardize edilen bu yöntemler mikro ve makrodilüsyon ile disk difüzyon testleri olup, bunlardan maya mantarları için olanlar CLSI M27-A3 + M27-S4, EUCAST E.Def 7.2, CLSI M44-A2; küf mantarları için olanlar ise CLSI M38-A2, EUCAST E.Def 9.2, CLSI M51-A klavuzlarında yayınlanmıştır.

Referans yöntemlerden mikrodilüsyon için CLSI ve EUCAST'ın belirlediği standartlar genelde aynı olup, besiyeri içeriğinde, inokulum miktarında, kullanılan mikroplak şeklinde, inkübasyon süresinde ve MİK son nokta belirlenmesinde küçük farklılıklar bulunmaktadır (tablo 1 ve 2). Tablo 1 ve 2'de görüldüğü üzere mayalar ve küfler için mikrodilüsyon yöntemlerinde her iki kurumun önerdiği inokulum miktarları farklıdır. Bunun yanında her iki yöntem de sodyum bikarbonatsız, L-glutaminli, fenol kırmızılı ve 0.165M MOPS ile pH:7.0'ye tamponlanmış RPMI 1640 besiyerini kullanır ancak içerdikleri glukoz miktarları farklıdır. Şöyle ki CLSI M27-A3 ve M38-A2 klavuzlarında besiyerinde %0.2, EUCAST E.Def 7.2 ve 9.2'de ise %2 oranında glukoz bulunması gerektiği belirtilmiştir. Bunun dışında hem mayalar hem de küfler için CLSI mikrodilüsyon yönteminde U tabanlı, EUCAST yönteminde ise düz tabanlı mikroplaklar kullanılır. Yine yöntemler arasında inkübasyon süreleri açısından da fark bulunmakta olup, CLSI M27-A3 klavuzunda inkübasyon süresi *Candida* türleri çalışıldığında ekinokandinler için 24 saat, 5 flusitozin için 48 saat, amfoterisin B ve flukonazol için 24-48 saat, diğer azoller için ise 48 saat; *C. neoformans* çalışıldığında ise 70-74 saat olarak belirtilmiştir. EUCAST E.Def 7.2 klavuzunda ise bu süre $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat olarak bildirilmiştir. Bir absorbans değerinin $\leq 0,2$ olması zayıf üremeyi göstermesi nedeniyle bu şekildeki plakların 12-24 saat daha inkübe edilmesi önerilmiştir.

Küfler için mikrodilüsyon yöntemine bakıldığında ise CLSI M38-A2 klavuzunda inkübasyon süresi *Rhizopus* spp. için 21-26 saat, diğer türler-*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Paecilomyces* spp. ve *Sporothrix schenckii* için 46-50 saat, *Scedosporium* spp. için 70-74 saat, diğer türler için 48-96 saat, dimorfikler için ise 5-7 gün olarak belirtilmiştir. EUCAST E.Def 9.2 klavuzunda bu süre $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de Mucorales için üreme yeterli olduğunda 24 saat, diğer küfler için ise 48 saat olarak yazılmıştır. Ayrıca EUCAST nadir durumlarda örneğin *Scedosporium* türleri ile çalışıldığında kontrol kuyucuğunda yeterli üreme elde etmek için ek 24 saatlik inkübasyon süresi gerekebileceğini bildirirken, 72 saat üzerinde inkübasyon önermemektedir.

Mayaların mikrodilüsyon yönteminde CLSI, son nokta değerlendirmesinin gözle ve spektrofotometrik (492 nm dalga boyunda) yapılabileceğini belirtirken, EUCAST sadece spektrofotometrik okumayı kabul etmiştir. EUCAST, mikrodilüsyon plaklarının absorbansını ölçmek için öncelikle 530 nm'lik dalga boyununun kullanımını önermiş ancak 405 nm veya 450 nm'lik dalga boylarının da kullanılabileceğini bildirmiştir.

Mayalar açısından CLSI standartlarında amfoterisin B için üremenin tam (%100) inhibe olduğu noktanın (MİK-0), 5 flusitozin, ekinokandinler ve azoller için bulanıklıkta belirgin

azalmanın olduğu noktanın (MİK-2), 492 nm dalga boyunda ise kontrole göre \geq %50 inhibisyon noktasının; EUCAST standartlarında ise amfoterisin B için ilaç içermeyen kontrole göre \geq 90; 5 flusitozin, azoller ve ekinokandinler için üremede \geq %50 inhibisyona yol açan en düşük ilaç konsantrasyonunun MİK olarak belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Küfler açısından ise sonuçların gözle okunması benimsenmiş olup, M38-A2 standartında amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol için üremenin tam (%100) inhibisyon noktasının, flukonazol ve 5 flusitozin için \geq %50 azalma sağlayan en düşük konsantrasyonun; EUCAST E.Def 9.2 klavuzunda da ekinokandinler dışındaki tüm antifungal ilaçlar için görsel olarak üremenin izlenmediği en düşük ilaç konsantrasyonunun MİK olarak belirlenmesi gerektiği yazılmıştır. Ekinokandinler için ise hem CLSI hem de EUCAST "minimum efektif konsantrasyon"un belirlenmesinin uygun olduğunu belirtmiştir. CLSI klavuzunda bu değerlerin çoğu küf için 21-26, *Scedosporium* spp. için 46-72 saat sonra belirlenmesinin gerektiği vurgulanmıştır. CLSI bu yöntemin minör değişiklikler ile dermatofitlere de uygulanabileceğini, *T. rubrum* için "oatmeal agar"da 35°C'de 4-5 günlük inkübasyon gerektiği, MİK olarak ise üremede \geq %80 azalma sağlayan en düşük konsantrasyonun saptanmasının uygun olduğu bildirilmiştir.

CLSI ve EUCAST mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyum oranı türe, ilaca ve inkübasyon zamanına bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle yüksektir. Örneğin yapılan bir araştırmada *Candida* türleri ve azoller için %90 ve üzerinde bir uyum saptanmıştır. Pfaller ve arkadaşlarının *Candida* türlerinin ekinokandinlere duyarlılığı açısından her iki yöntemi karşılaştırdıkları çalışmalarında ± 2 dilüsyonda uyum %90-99; duyarlılık kategorileri açısından ise *C. glabrata* ve *C. krusei* - kaspofungin kombinasyonu hariç diğer *Candida* türleri ve ekinokandinler için uyum \geq %90 olarak belirlenmiştir. Bir başka araştırmada on antifungal ilaç *Candida* türlerine etkinliği açısından her iki yöntem ile de incelenmiş ve MİK değerleri açısından genel uyum %79 (posakonazol) ile %100 (flukonazol) arasında saptanmıştır. Aynı çalışmada kaspofungin hariç tüm antifungaller için duyarlılık kategorisi uyumu ise $>$ %93; kaspofungin için ise %85 olarak belirlenmiştir. Yine Pfaller ve ark. nın *Aspergillus* türleri için itrakonazol, posakonazol ve vorikonazolün çalışıldığı bir araştırmasında MİK değerleri uyumu ± 2 dilüsyonda %98-100 olarak saptanmıştır.

Hem CLSI hem de EUCAST verilerinde özellikle *Candida* türleri çalışılırken merkezlere, türlere ve zamana göre kaspofungin MİK değerleri ile ilgili çok fazla değişkenlik saptanmış olup, bu sorun çözülene dek *Candida* türleri için kaspofungin MİK değerlerinin çalışılmaması ve raporlanmaması; yerine mikafungin veya anidulafungin verisinin kullanılması önerilmiştir.

Sonuç olarak vurgulanması gereken en önemli nokta antifungal duyarlılık testleri uygulanırken CLSI ve EUCAST tarafından belirlenmiş standartlara uygun olarak çalışılması ve hangi standartlara göre çalışıldı ise sonuçların da ona göre yorumlanmasıdır.

KAYNAKLAR

- 1) CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard-Third Edition; CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
- 2) CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne ,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 3) Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*. Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. EUCAST Definitive Document EDef 7.2; revised March, 2012.

- 4) Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, Howard SJ and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. EUCAST Definitive Document EDef 9.2; revised August, 2014.
- 5) Fothergill AW. Antifungal susceptibility testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods. In: Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents How to Detect Resistance. Hall GS (ed), 1st ed, Springer Science+Business Media, LLC, 2012: 65-74.
- 6) Johnson EM, Espinel-Ingroff AV, Pfaller M. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous fungi. In: Manual of Clinical Microbiology. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW(eds:) 10th ed, Washington DC, ASM Press, 2011: 2020-2037.
- 7) Lass-Flörl C, Perkhofers S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 2010; 53: 1-11.
- 8) Doluca Dereli M. Antifungal duyarlılık testlerinde yenilikler: CLSI Dökümanları. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Konuşma Özetleri ve Bildirileri Kitabı. 2014:44-45
- 9) Metin DY. Antifungal duyarlılık testlerinde yenilikler: EUCAST Dökümanları. XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Konuşma Özetleri ve Bildirileri Kitabı. 2014:46.
- 10) Doluca Dereli M. Duyarlılık Testleri: CLSI & EUCAST. I. Ulusal Klinik Mikoloji Kongresi Özet Kitabı. 2014:13-14.
- 11) Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, et al. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on antimicrobial susceptibility testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. J Clin Microbiol 2011; 49:845-850.
- 12) Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, et al. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and E test methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol 2010; 48:1592-1599.
- 13) Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 79:198-204.
- 14) Pfaller M, Boyken L, Hollis R, et al. Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. J Clin Microbiol 2011; 49:1110-1112.
- 15) Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. Drug Resistance Updates 2013; 16:81-95.
- 16) Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, et al. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: Should the clinical laboratory be testing this agent? Antimicrob Agents Chemother 2013; 57:5836-5842.

Tablo 1. Mayalar için AFDT açısından CLSI ve EUCAST standartlarındaki farklılıklar

Özellik	CLSI M27-A3	EUCAST E.Def 7.2
Inokulum	$0.5-2.5 \times 10^3$ hücre ml ⁻¹	$0.5-2.5 \times 10^5$ hücre ml ⁻¹
Besiyeri	RPMI 1640 %0.2 glukoz	RPMI 1640 %2 glukoz
Mikroplak	U tabanlı	Düz tabanlı
İnkübasyon süresi	24-48h	18-24h
Okuma	Gözle / spektrofotometrik	Spektrofotometrik
Son nokta / inhibisyon	AmB için %100; azol ve kandidinler için \geq %50	AmB için \geq 90; 5FC, azoller ve kandidinler için \geq 50,

*7 Nolu kaynaktan uyarlanarak çevrilmiştir

Tablo 2. Küfler için AFDT açısından CLSI ve EUCAST standartlarındaki farklılıklar

Özellik	CLSI M38-A2	EUCAST E.Def 9.2
Inokulum	$0.4-5 \times 10^4$ hücre ml ⁻¹	$1-2.5 \times 10^5$ hücre ml ⁻¹
Inokulum standardizasyonu	Spektrofotometrik	Hemositometrik
Besiyeri	RPMI 1640	RPMI 1640 %2 glukoz
Mikroplak	U tabanlı	Düz tabanlı
İnkübasyon süresi	48h	24-48h

*7 Nolu kaynaktan çevrilmiştir